



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**FACULTAD DE INGENIERIA PESQUERA**

**INFORME FINAL DE INVESTIGACION**

## **DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR DE ANOMALIAS GENÉTICAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA USANDO INDICADORES MUTAGÉNICOS**

**AUTOR: DR. NESTOR HERMINIO PURIZAGA IZQUIERDO**

**COAUTORES:**

**DR.OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA**

**MG.ALBERTO ORDINOLA ZAPATA**

**ING.TESSY PERALTA ORTIZ**

**ASESOR:MG. BENOIT DIRINGER**

**TUMBES 2014**

1.- Título: Diagnóstico biomolecular de anomalías genéticas asociadas a Fibrosis Quística usando indicadores mutagénicos.

2.- Responsable: Dr. Néstor Herminio Purizaga Izquierdo, Médico Patólogo-Clinico, Profesor Principal Universidad Nacional de Tumbes.

3.- Corresponsables: Dr (c). Oscar Augusto Mendoza Neyra, Profesor Principal Universidad Nacional de Tumbes.

Mg. Alberto Ordinola Zapata, Profesor Asociado. Universidad Nacional de Tumbes.

Ing. Tessy Peralta Ortiz, Profesora Auxiliar. Universidad Nacional de Tumbes.

Dra. Ana Protzel Pinedo, Médico Pediatra - Genetista, Jefa del Servicio de Genética, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins – EsSALUD.

Dra. Milagros Dueñas Roque, Médico Genetista, Servicio de Genética, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins – EsSALUD.

Dr. Juan Rivera Medina, Médico Pediatra- Gastroenterólogo, Jefe Unidad de Desarrollo de Investigaciones. Instituto Nacional de Salud del Niño.

Dr. Hugo H. Abarca-Barriga, Médico-Genetista, Servicio de Genética, Instituto Nacional de Salud del Niño..

Cecilia Nestarez Del Río, Obstetra. Presidenta de la Asociación de Padres de niños con Fibrosis Quística (FIQUI Perú).

Ph.D. Dr. Claude Ferec, Profesor de Genética y Jefe de Servicio de Genética Molecular y de Histocompatibilidad del CENTRO HOSPITALERO UNIVERSITARIO de Brest (Francia).

4.- Asesor: M.Sc. Benoit Diringer, Coordinador de proyectos de Investigación (Inca´Biotec SAC).

5.-Área de investigación: Ciencias de la Vida y Biotecnologías.

Línea de investigación: Salud Pública y Prevención de Enfermedades Endémicas

6.- Localidad e instituciones:

Universidad Nacional de Tumbes (Facultad de Ciencias de la Salud, Facultad de Ingeniería Pesquera).

Hospital de Nivel IV Rebagliatti Martins. EsSalud.

Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN)

Asociación de Padres de niños con Fibrosis Quística (FIQUI PERÚ).

Centro Hospitalero Universitario (CHU) de Brest. (Francia)  
Inca´Biotec SAC. (IB)

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>iii</b>
<b>I.- INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
<b>III.- MATERIAL Y METODOS</b>	<b>6</b>
<b>IV.- RESULTADOS</b>	<b>10</b>
<b>V.- DISCUSIÓN</b>	<b>15</b>
<b>VI.- CONCLUSIONES</b>	<b>21</b>
<b>VII.- RECOMENDACIONES</b>	<b>22</b>
<b>VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>23</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>27</b>

## **RESUMEN**

### **Diagnóstico biomolecular de anomalías genéticas asociadas a Fibrosis Quística usando indicadores mutagénicos.**

Pacientes diagnosticados con Fibrosis Quística provenientes del Instituto de Salud del Niño del Ministerio de Salud del Perú y del Hospital IV E. Rebagliatti Martins (Seguridad Social), fueron evaluados durante el segundo semestre del 2013 con la finalidad de detectar mutaciones del Gen C.F.T.R. (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Mediante el método de la A.R.M.S-P.C.R ( Reacción en Cadena de la Polimerasa- Sistema de amplificación de la Mutación Refractaria), se analizaron 28 muestras, encontrándose que en el 21,42% estaban presente dos mutaciones y el 32,21% una mutación. La prevalencia de DF508 en Perú, es relativamente baja (31,3%) en comparación con el promedio latinoamericano (43,54%)

## **ABSTRAC**

### **Biomolecular diagnosis of genetic abnormalities associated with cystic fibrosis using mutagenic indicators.**

Patients diagnosed with Cystic Fibrosis from the Institute of Child Health, Ministry of Health of Peru and E. Rebagliatti Martins Hospital (Social Security), were evaluated during the second half of 2013 in order to detect mutations in the CFTR gene (Transmembrane Conductance Regulator of Cystic Fibrosis). By the method of the ARMS-PCR (Chain Reaction Polymerase-system amplification refractory mutation), 28 samples were analyzed, finding that the two mutations were 21.42% and 32.21% this mutation . The prevalence of DF508 in Peru is relatively low (31.3%) compared to the Latin American average (43.54%)

## I.- INTRODUCCION

La Fibrosis Quística (F.Q.) es la enfermedad genética letal más frecuente y es provocada por mutaciones recesivas en el gen de la C.F.T.R. (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Este gen codifica una proteína transmembrana que controla el transporte de cloro y regula indirectamente el intercambio de sodio entre la célula y el medio extracelular.

La F.Q. se expresa solo en los pacientes que posean los 2 alelos del C.F.T.R. mutados (generalmente heredados de los padres). Los defectos de la C.F.T.R. inducen la acumulación de cloro y sodio en las células epiteliales de los órganos que producen secreciones mucosas como pulmones, páncreas, hígado, intestinos, canales deferentes y glándulas sudoríparas. Las importantes concentraciones en iones intracelulares inducen la entrada de agua en las células por ósmosis, resultando un muco deshidratado y espeso en estos órganos.

Esta contexto provoca disfunciones digestivas severas, y acumulación de moco en las vías respiratorias lo que se traduce en faltas de crecimiento y ganancias de peso, bronquitis, rinitis, cirrosis, diabetes, esterilidad y una importante disminución de la función pulmonar. En consecuencia, los pacientes con F.Q. exhiben un promedio de vida de 38 años en los Estados Unidos o la Unión Europea y raramente superan algunos años sin tratamientos adecuados (Hoffman, 2013). Según las prevalencias disponibles para Latinoamérica, entre 60 y 150 niños nacen cada año con F.Q. en el Perú.

En el Perú, dos hospitales situados en Lima atienden a todos los pacientes con F.Q. del país, el Instituto Nacional de Salud del Niño y el Hospital Nacional E.

Rebagliatti Martins. El servicio de seguimiento de F.Q. del Hospital Rebagliatti creado hace 12 años, solo cuenta con alrededor de 30 pacientes de los cuales apenas 3 son mayores de edad. En lo que concierne el Instituto Nacional de Salud del Niño, el servicio atiende a cerca de 30 pacientes que son menores de edad en su gran mayoría. Este demuestra que: 1) muchos pacientes con F.Q. no son identificados 2) que hasta ahora los pacientes mueren a temprana edad.

El diagnóstico inicial de la F.Q. puede realizarse con el análisis de la Tripsina inmunorreactivo (I.R.T.) en los recién nacidos. Los pacientes que presentan tasas anormalmente elevadas de tripsina en la sangre al nacer, o que muestran un cuadro clínico respiratorio o digestivo parecido a los mencionados son evaluados por la prueba del sudor. Esta prueba de referencia para el diagnóstico final analiza la concentración de sales en el sudor que es anormalmente elevada en los pacientes con F.Q.. Una vez diagnosticada la enfermedad, el análisis final de la F.Q. se realiza con la identificación por técnicas de biología molecular de las mutaciones del gen C.F.T.R. propias de cada paciente. La dificultad reside en que se han reportadas más de 1900 mutaciones y que sus prevalencias varían en función de los orígenes étnicos del paciente además de mutaciones específicas a ciertas regiones (Dequeker *et al*; 2009). La ausencia de laboratorio de diagnóstico de F.Q. y de enfermedades genéticas en general representa un atraso importante para el país y para los pacientes.

La Fibrosis Quística es una enfermedad que no tenía cura hasta el 2012, hasta la puesta en venta del Ivacaftor (VX 770) en los países del norte. Este medicamento de primera generación es un potenciador de la C.F.T.R., su eficiencia es específica a ciertas mutaciones y eficaz entre el 0.1 y 4% de los

pacientes con F.Q. Otro producto, el VX 809 debe corregir el defecto de la principal mutación del C.F.T.R. (del508) (Gorret *al*; 2011). Este fármaco está en ensayo clínico de nivel III y si demostrara su eficacia, mejoraría la vida de hasta el 50-60% de los pacientes con F.Q.. Finalmente otros fármacos están siendo evaluados clínicamente en Francia para averiguar su efector corrector sobre las mutaciones relacionadas a la aparición de un codón stop (de tipo G542X, W1282X, R553X, R1162X). Estos datos demuestran la importancia de la identificación de las mutaciones del C.F.T.R. para los pacientes.

El presente trabajo de investigación se propuso implementar biotecnologías médicas en la Universidad Nacional de Tumbes, utilizando la Fibrosis Quística como modelo para desarrollar tecnologías de diagnóstico de anomalías genéticas. Así como Implementar Técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa-*Amplification Refractory Mutation System* (P.C.R-A.R.M.S.) en el Diagnóstico de Fibrosis Quística, e identificar las mutaciones del gen C.F.T.R con técnicas de HRM (*High Resolution Melt*) por PCR en tiempo Real en los pacientes con Fibrosis Quística en el Perú.

## II.- ANTECEDENTES

El campo del diagnóstico ha evolucionado en los últimos años con el avance tecnológico. Desde 1988, año del descubrimiento de la primera mutación de la C.F.T.R. (del 508) se ha determinado más de 1900 mutaciones (Castellani *et al;* 2008). Una amplia mayoría de los estudios han sido realizados en países del Norte (Estados Unidos y Unión Europea). Las investigaciones demostraron que existe una gran variabilidad de prevalencia de las mutaciones en función del origen étnico, con algunas mutaciones que son específicamente locales y hasta presentes solamente en los miembros de una sola familia. Muy pocas publicaciones tratan de la identificación y de la prevalencia de las mutaciones en América latina y son generalmente restringidas a números no mayores a 30 mutaciones ofrecidas por los kits comerciales (Raskin *et al;* 1993, Morales-Machin *et al;* 1997, Restrepo *et al;* 2000, Morales-Machin *et al;* 2004, Keyeux *et al;* 2003, Valle *et al;* 2007, Moya-Quiles *et al;* 2009, Lay-Son *et al;*, 2011.). Estos kits comerciales son diseñados para identificar hasta el 90% de las mutaciones en poblaciones norte europeas o norte americanas pero identifican difícilmente más del 50% de las mutaciones Latinoamericanas (Pérez *et al;* 2007).

Existen 2 grandes vías para identificar las anomalías del gen C.F.T.R:

La primera consiste en buscar mutaciones específicas conocidas. Las primeras investigaciones, iniciaron con la utilización de técnicas de tipo Reacción en Cadena de Polimerasa (P.C.R.) y secuenciación o variantes (Sherlock *et al;* 1998, Dekeker *et al;* 2009). Rápidamente otras técnicas las suplantaron (Tomaiuolo *et al;* 2003), en particular la P.C.R.-*Amplification Refractory Mutation System* (A.R.M.S-P.C.R) (Ashavaid *et al;* 2005, Grody *et al;* 2007). Esta última

técnica es particularmente interesante por ser rápida, barata y requerir equipamientos básicos de biología molecular. Esta técnica está implementada como rutina en el diagnóstico de primera línea de las mutaciones más comunes en numerosos laboratorios de referencia. El presente trabajo se propuso implementar Técnicas de A.R.M.S-P.C.R. en el Diagnóstico de Fibrosis Quística en la Universidad Nacional de Tumbes.

La segunda vía consiste en técnicas de barrido del gen C.F.T.R, lo que permite identificar las mutaciones más raras. La mejor opción residiría en la secuenciación completa del gen C.F.T.R, sin embargo el importante tamaño de este gen (4,5 Kb post episaje) y el costo elevado de la secuenciación son limitantes a corto plazo. Una alternativa ventajosa reside en el análisis de alta resolución de la curva de disociación (H.R.M.) que permite encontrar la posición de la mutación en el gen C.F.T.R. y secuenciar una región limitada (Chou *et al*; 2005, Montgomery *et al.*, 2007, Krenkova *et al*; 2009). Los especialistas de esta técnica ahora mundialmente diseminada son equipos Franceses, notamente del Dr. Ferec que participó en el presente proyecto (Audrezet *et al*; 2008).

### III.- MATERIAL Y METODOS

Para tomar contacto con los pacientes, en un primer momento, se realizó una sensibilización de los pacientes y padres de pacientes con F.Q. a través reuniones y conferencias en Lima en el Hospital Nacional E. Rebagliati en presencia de los padres de pacientes y médicos pediatras. Luego se reveló la información a través de las redes sociales, del sitio web de la asociación Fibrosis Quística Perú (F.I.Q.U.I.- PERÚ) y de los médicos que contactaron directamente los pacientes y les explicaron sobre la importancia de participar.

Durante todo el proyecto, un gran esfuerzo fue mantenido para preservar las normas éticas así como los derechos de los pacientes con F.Q. Por ello se elaboraron cartas de información y de compromiso de participación, así como consentimientos informados para participaren el estudio.

Muestra y Muestreo: El análisis fue dirigido exclusivamente a los pacientes con F.Q. diagnosticados por el cuadro clínico característico y un diagnóstico positivo a la prueba del sudor. Todos estos pacientes eran conocidos de los hospitales participantes debido que ellos son los dos únicos del país, que atienden pacientes con F.Q.

Las muestras consistieron en 2-4 ml de sangre fresca colectadas en tubos *vacutainer* con anticoagulante Etilen Diamino Tetra Acético (E.D.T.A.) y conservadas a 4°C hasta su procesamiento. Estas muestras fueron analizadas “a ciego”, o sea que llevaron con el código propio de cada paciente al laboratorio mixto UNT-Inca´Biotec SAC. El hospital donde se tomó la muestra tiene la relación código-paciente. Las extracciones de sangre fueron realizadas en duplicados por cada paciente y analizadas por espectrofotometría. Las

muestras que mostraban las mejores concentraciones y cualidades de A.D.N fueron retenidas para el diagnóstico molecular. Al finalizar el análisis, los resultados fueron enviados a los médicos que se encargan de entregarlos a los pacientes.

La primera etapa de muestreo se inició en la última semana de diciembre del 2013 y terminó la tercera semana del mes de enero. El segundo muestreo inicio desde el 15 de febrero en ambos hospitales.

Compra y adquisición de equipamientos: Debido a problemas administrativos - logísticos, los primeros insumos llegaron y fueron retirados el 3 de octubre 2013, o sea 4 meses después del inicio del proyecto.

Sin embargo, todos los insumos, materiales y equipamientos pudieron ser adquiridos localmente, a excepción del *Kit* de A.R.M.S.- P.C.R. que no existe en el país. Se realizaron los contactos, cotizaciones con las 2 empresas extranjeras que comercializan el *Kit* y con posibles proveedores nacionales que podrían realizar el servicio de importación. Por lo tanto, este *kit* siendo destinado al diagnóstico humano y no estando registrado en DIGEMIN, no fue factible su importación directa. En consecuencia, se consideró para la viabilidad del proyecto, abandonar la compra de este *kit*, y reutilizar el monto de esta partida para diseñar un *kit* propio de la universidad con la asesoría del equipo técnico y asesores. Para la elaboración del kit de diagnóstico de la UNT se adaptó protocolos obtenidos del CHU de Nantes (Francia), de Perone et al., (2012) y Ferrie et al., (1992). Cada reacción fue optimizada para obtener un resultado confiable. Los protocolos finales están presentados en anexos.

La totalidad de las muestras fueron evaluadas con un control positivo que permitió evaluar la calidad del ADN extraído (control interno) o también por algunas mutaciones mediante un ADN control obtenido de un centro de referencia de F.Q. en Francia que cargaba una mutación conocida (DF508, G551D, G542X, N1303K) lo que permitió validar el diagnóstico. Los tamaños de los amplicones obtenidos fueron estimados gracias al uso de marcadores de peso moleculares (M.P.M) y fueron del tamaño esperado.

Es importante añadir que algunos equipos como la máquina Termociclador de la Facultad Ingeniería Pesquera -que fue considerado en el proyecto inicial-, así como el transformador eléctrico de la Facultad Ingeniería Pesquera estuvieron inoperativos antes (septiembre 2013) y durante el proyecto (enero 2014) respectivamente. Por esa razón gran parte de las análisis fueron realizados en los ambientes de la empresa colaboradora Inca' Biotec con el fin de no atrasar el proyecto.

#### Desarrollo de las pruebas moleculares

La identificación de las mutaciones se realizó en 2 etapas: 1) la extracción de ADN y 2) la amplificación de la región de A.D.N. de interés.

#### Protocolo de extracción de muestras sanguíneas

Existen varios protocolos de extracción de A.D.N., pero todos comprenden etapas de lisis celular, purificación (separación del A.D.N. de los otros compuestos celulares), precipitación y recuperación del A.D.N. total.

La evaluación, estandarización y validación de estos protocolos se realizó con muestras de sangre colectadas al azar. Se evaluaron 2 protocolos. El protocolo

de extracción N°1 permitió la obtención de un “pellet” de A.D.N visible, atestando del éxito de la extracción. (Este protocolo esta presentado en Anexos). La cualidad del A.D.N obtenido fue evaluada mediante espectrofotometría Ultravioleta V. Este análisis se realizó en los ambientes de IB en Guayaquil debido a que la Universidad Nacional de Tumbes no dispone de este equipo. Las concentraciones medida así como los ratios de absorción 230/260 y 260/280 fueron excelentes atestando de una buena concentración del A.D.N, y de su pureza (ausencia de contaminantes y residuos).

Se realizó una prueba adicional de almacenar la sangre a 4°C por 1, 18 y 25 días antes de realizar la extracción con el fin de evaluar la evolución de la cualidad del A.D.N y así definir la ventana de muestreo de los pacientes con F.Q. en los hospitales de Lima.

Análisis por A.R.M.S.- P.C.R.: La A.R.M.S- PCR o P.C.R de sistema refractario de amplificación de mutación es una técnica que permite detectar una mutación puntual de A.D.N. y está basada en el uso de sondas específicas capaz de reconocer la versión normal o mutada del alelo investigado. El análisis de cada mutación evalúa en paralelo la presencia de la secuencia de A.D.N. mutada y normal en 2 reacciones distintas, o sea una reacción para averiguar si está presente la secuencia mutada y una reacción para amplificar la secuencia normal. Existen *kits* comerciales que permiten evaluar de forma simultánea la presencia de varias mutaciones (Multiplex A.R.M.S- P.C.R.). Estos *kits* permitirían evaluar de forma simultánea hasta 32 mutaciones para diagnosticar el 57% de las mutaciones encontradas en Latinoamérica. La mayoría de estas mutaciones siendo ausentes o a prevalencias inferiores al 0.1%.

## IV.-RESULTADOS

**Cuadro 1: Prevalencia de las mutaciones más frecuentes del gen CFTR en América latina.**

Tipo de Mutación	Prevalencia de la mutación		
	América latina	Chile	Ecuador
<b>DF 508</b>	46,70%	39,30%	31,40%
<b>621+1G&gt;T</b>	0,16%	NA	NA
<b>G551D</b>	0,14%	NA	NA
<b>N1303K</b>	1,65%	1,80%	1%
<b>G542X</b>	5,10%	5,53%	2%
<b>3659 del C</b>	0,09%	NA	NA
<b>1717-1G</b>	0,30%	NA	NA
<b>W1282X</b>	1,13%	3,17%	NA
<b>R553X</b>	0,50%	NA	NA
<b>R1162X</b>	0,01%	1,20%	NA
	<b>55,9%</b>	<b>51,0%</b>	<b>34,4%</b>

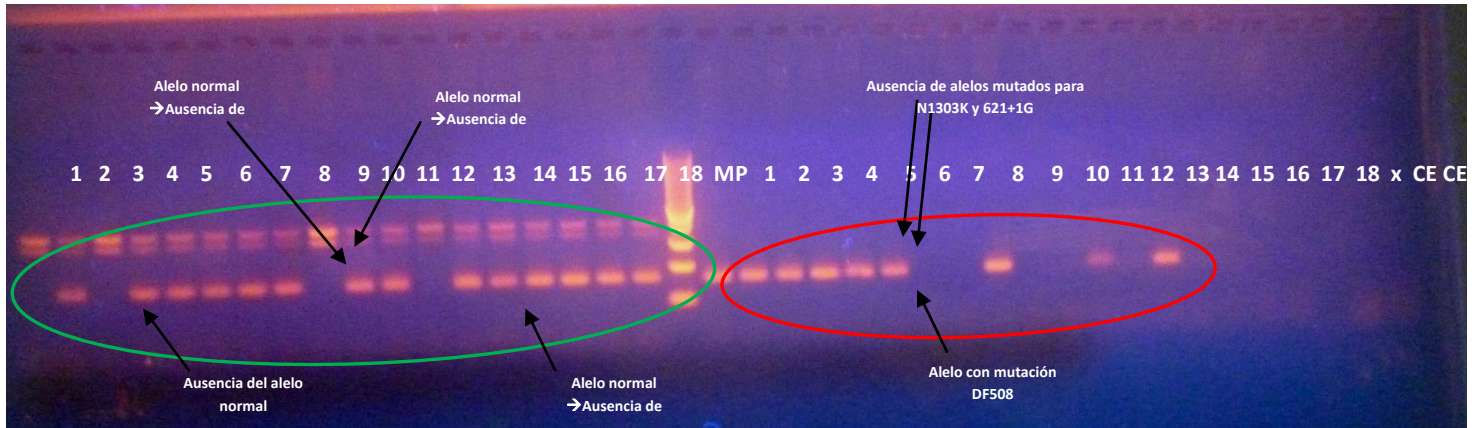
NA: No analizado o igual a 0.

Para cumplir con los objetivos del proyecto se ha seleccionado, basado en la literatura, las 10 mutaciones puntuales más representadas de las mutaciones encontradas en Latinoamérica y en los países vecinos directos al Perú. Como se puede apreciar las 10 mutaciones seleccionadas permiten en teoría identificar 55,9% de las mutaciones en comparación con el kit comercial de 30 mutaciones que permite determinar 57% de las mutaciones. Ello debido a que muchas mutaciones presentan prevalencia de menos de 0.1%.

**Cuadro 2: Mutaciones del CFTR de los pacientes peruanos con Fibrosis Quística diagnosticados al extranjero.**

Paciente	Mutación Alelo 1	Mutación Alelo 2
1	DF508	R1162X
2	DF508	p.Q220X
3	DF508	G551D.
4	DF508	F57L
5	No comunicado	No comunicado

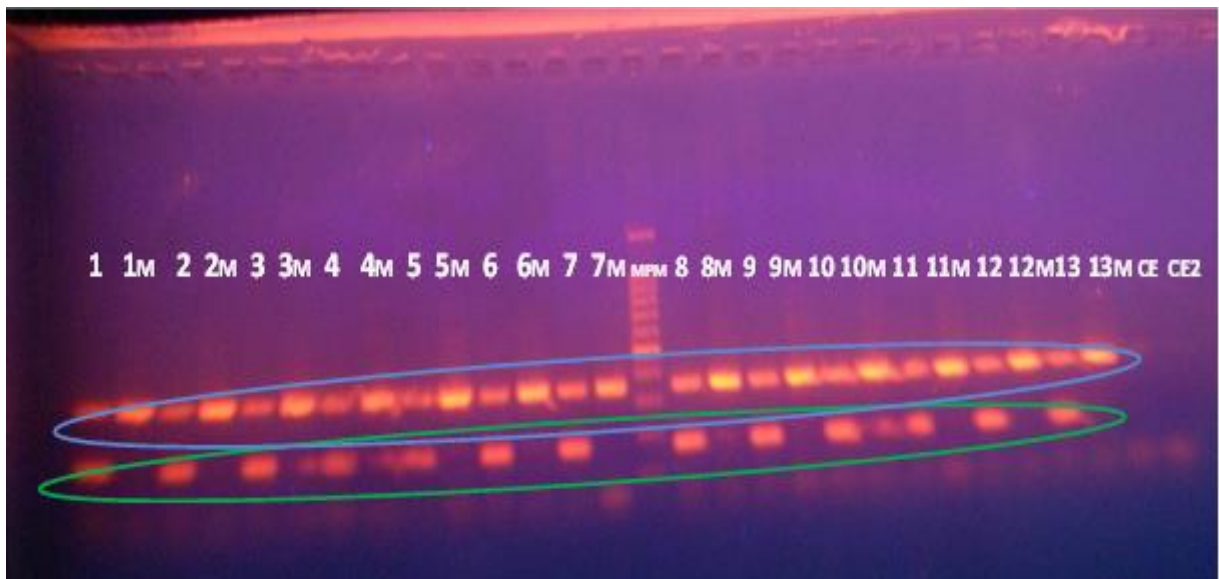
**Foto 1: Resultados de análisis de 18 pacientes con fibrosis quística por ARMS PCR para las mutaciones DF508, N1303K y 621+1G  $\square$ T.**



CE: control negativo de extracción, X: pocillo sin muestra depositada

La foto 1 ilustra los resultados de diagnóstico con la mutación W1282X. Para esta mutación se integró un control interno cuya presencia (círculos azules) sirve como control de calidad del análisis. En el círculo verde solo aparece 1 banda de 2 que corresponde a la forma normal del gen. Los vacíos corresponden a la ausencia de la forma mutada del gen.

**Foto 2: Resultados de análisis de 13 pacientes con Fibrosis Quística por ARMS PCR para la mutación W1282X**



CE: control negativo de extracción

**Cuadro 03: Resumen del diagnóstico de los 28 pacientes analizados para las 10 mutaciones evaluadas.**

Código de la muestra (sangre)	Resultado Alelo 1	Resultado Alelo 2
211105 EPG	DF508	DF508
3000109-GCS 14/01/14	DF508	G542X
210305 BVC	DF508	DF508
231004 SHJ	DF508	ND
08032011-MVA	DF508	ND
060204 JGR	DF508	ND
050606-PARA	ND	ND
061200 WCA	ND	ND
040812 MMF	DF508	DF508
291002-CVN	ND	ND
16092010-CAQ	ND	ND
140101-CRC	DF508	DF508
23098 FDO	ND	ND
24062001-PDR 7/01/2014	DF508	ND
050701 REV	ND	ND
MLS 161195	ND	ND
AXMC 230403	ND	ND
F. A. A.	G542X	ND
Female NBMF 291011	ND	ND
Female TRKA 310702	DF508	ND
Female RQGA 230308 27/01/2014	ND	ND
Male GPNN 10061985 T.M 11/02/14	ND	ND
APGM 27062005 DOB:Q 7/Jun./2005 05/Feb./14	ND	ND
LDPL100304 DOB 10/03/04 T.M:22/01/14	DF508	ND
M. C. V. V. 03/02/14	DF508	G542X
S. P. A. .V 03/02/14	G542X	ND
Á. F. R. 20/02/14	ND	ND
25051000 GSJ	G542X	ND
<b>TOTAL</b>	<b>15/28</b>	<b>6/28</b>

ND: No determinado

El cuadro anterior representa el resumen del diagnóstico de los 28 pacientes. De las 10 mutaciones evaluadas, 2 fueron encontradas, la DF508 y la G542X.

Pudimos encontrar las 2 mutaciones en 6 de 28 pacientes (21,42%) y al menos una mutación en 9 de 28 (32,21%) pacientes. El cuadro representa el resumen del diagnóstico de los 28 pacientes. De las 10 mutaciones evaluadas, 2 fueron encontradas, la DF508 y la G542X. Puesto en análisis por cromosoma hemos analizado 56 alelos diferentes.

**Cuadro 04: Comparación de las prevalencias de las mutaciones del gen C.F.T.R de los pacientes peruanos diagnosticadas en la UNT con las prevalencias de pacientes de Chile, Ecuador y América latina.**

Tipo de Mutación	Prevalencia de la mutación			
	América latina	Chile	Ecuador	Perú
DF 508	46,70%	39,30%	31,40%	28,6% (16/56)
621+1G>T	0,16%	NA	NA	0%
G551D	0,14%	NA	NA	0%
N1303K	1,65%	1,80%	1%	0%
G542X	5,10%	5,53%	2%	8,9% (5/56)
3659 del C	0,09%	NA	NA	0%
1717-1G	0,30%	NA	NA	0%
W1282X	1,13%	3,17%	NA	0%
R553X	0,50%	NA	NA	0%
R1162X	0,01%	1,20%	NA	0%
Cobertura	<b>55,9%</b>	<b>51,0%</b>	<b>34,4%</b>	<b>37,5%</b>

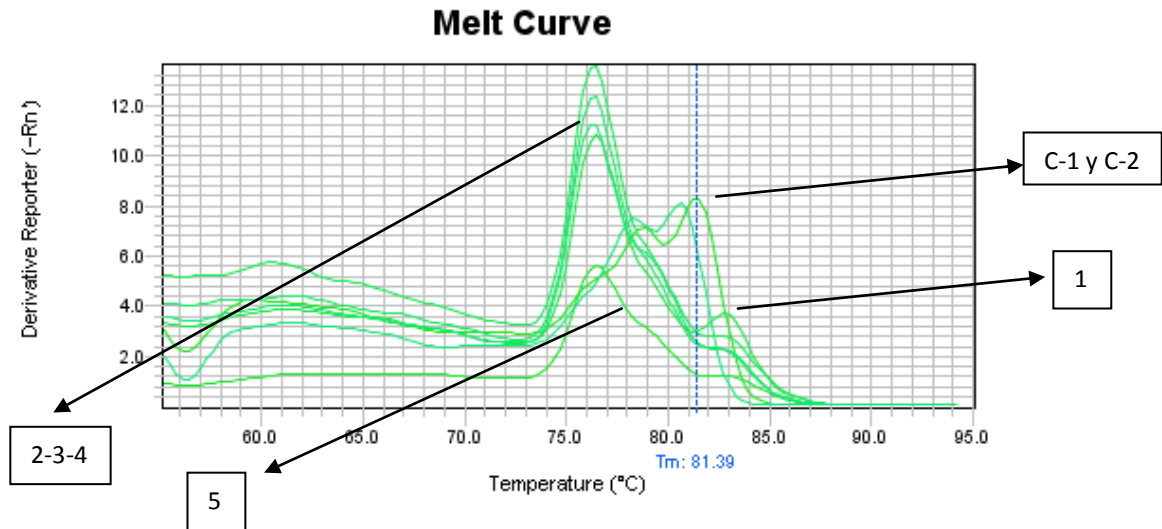
NA: No analizado o igual a 0.

**Cuadro 05: Comparación de las prevalencias de las mutaciones del gen CFTR de los pacientes peruanos diagnosticadas con las prevalencias de pacientes de Chile, Ecuador y América latina.**

Tipo de Mutación	Prevalencia de la mutación			
	América latina	Chile	Ecuador	Perú
DF 508	46,70%	39,30%	31,40%	31,3% (20/64)
621+1G>T	0,16%	NA	NA	0%
G551D	0,14%	NA	NA	0,16% (1/64)
N1303K	1,65%	1,80%	1%	0%
G542X	5,10%	5,53%	2%	7,8% (5/64)
3659 del C	0,09%	NA	NA	0%
1717-1G	0,30%	NA	NA	0%
W1282X	1,13%	3,17%	NA	0%
R553X	0,50%	NA	NA	0%
R1162X	0,01%	1,20%	NA	0,16% (1/64)
Cobertura	<b>55,9%</b>	<b>51,0%</b>	<b>34,4%</b>	<b>42,2%</b>

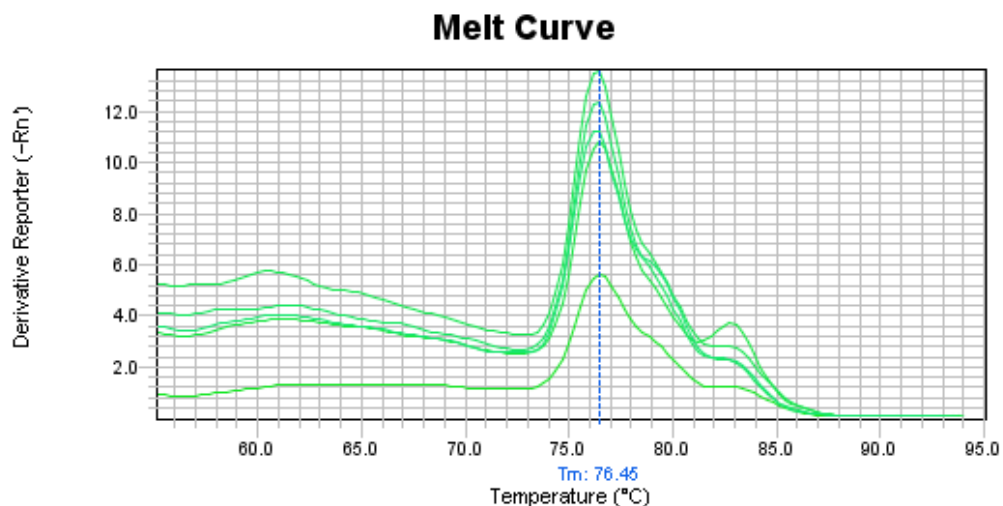
NA: No analizado o igual a 0.

**Grafico 1: Perfiles de las temperaturas de disociación de ADN; controles, normal, heterocigotos y homocigotos para la mutación DF508 del de la CFTR adquiridas por HRMA.**



La muestra 1 corresponde a 1 paciente que carece de la mutación DF508; Las muestras 2, 3, 4 corresponden a ADN de pacientes homocigotos con la mutación DF508; la muestra 5 corresponde a un ADN de paciente heterocigoto (una mutación DF508 y un alelo normal). Se puede apreciar las diferencias de perfiles entre las muestras negativas, las muestras homocigotas y la muestra heterocigota.

**Grafico 2: Perfiles de las temperaturas de disociación de ADN; normal, heterocigotos y homocigotos para la mutación DF508 del de la CFTR adquiridas por HRMA.**



Para facilitar la lectura, se removió del programa los 2 controles negativos obteniendo el grafico. Las pequeñas diferencias observadas en la parte derecha del grafico corresponden a ligeras diferencias de temperaturas de desnaturalización.

## V.- DISCUSION

La Fibrosis Quística (F.Q.) es una enfermedad compleja, multidisciplinaria por requerir especialistas en campos de Genética, Patología-Clínica, Microbiología, Fisioterapia, nutrición y es sujeta a intensas investigaciones en el mundo. Además, la F.Q. es una enfermedad mal diagnosticada y mal tratada en el Perú en comparación con los países del Norte o con países vecinos como Argentina, Brasil y Chile. El atraso del país resalta por su carencia en; 1) unidades de diagnóstico genético para identificar los pacientes y 2) de equipos y personal especializados en Patología Clínica y Microbiología asociada a F.Q. Dos componentes esenciales para prevenir la enfermedad y alargar la esperanza de vida de los pacientes. Para cumplir con los objetivos del proyecto se ha seleccionado, basado en la literatura, las 10 mutaciones puntuales más representadas de las mutaciones encontradas en Latinoamérica y en los países vecinos directos al Perú. Como se puede apreciar las 10 mutaciones seleccionadas permiten en teoría identificar 55,9% de las mutaciones en comparación con el kit comercial de 30 mutaciones que permite determinar 57% de las mutaciones. Ello debido a que muchas mutaciones presentan prevalencia de menos de 0.1%.

Las prevalencias pueden variar fuertemente de un país al otro como podemos apreciar en el caso del Ecuador con 34,4% de las mutaciones identificadas. Ello se debe a que existe una gran variabilidad geográfica-étnica de las mutaciones. A la fecha no existen publicaciones científicas realizadas en el Perú, y solo se han realizado análisis puntual de un grupo de mutaciones; Vela

(2002) y Aguire (2001) analizaron la incidencia de una sola mutación (DF508) en 3 pacientes y 12 pacientes respectivamente.

La totalidad de las muestras fueron evaluadas con un control positivo que permite evaluar la cualidad del A.D.N. extraído (control interno) o por algunas mutaciones un A.D. control obtenido de un centro de referencia de F.Q. en Francia que cargaba una mutación conocida (DF508, G551D, G542X, N1303K) que permite validar el diagnóstico.

Los tamaños de los amplicones obtenidos fueron estimados gracias al uso de marcadores de peso moleculares (MPM) y fueron del tamaño esperado.

Los resultados mostraron que la población total de pacientes con F.Q. atendida en el Perú está compuesta de 49 pacientes. De estos pacientes, 5 habían realizados sus análisis de mutaciones en el extranjero (EE.UU., Chile y Francia).

Se logró recuperar 28 muestras de sangres de los 49 pacientes con F.Q. presentes en el Perú. Los pacientes faltantes no entregaron muestras por las siguientes razones: no viajaron a Lima durante el proyecto (pacientes de provincias), no mostraron interés en participar, o no se logró contactarlos. Este kit pudo encontrar las 2 mutaciones en 6 de los 28 pacientes (21,42%) y al menos 1 mutación en 9 de 28 (32,21%) pacientes. Al contrario, no se pudo diagnosticar mutaciones en 13 de 28 pacientes (46,4%).

A nivel de alelos, pudimos haber diagnosticado 27 de 64 alelos o sea el 42,2% de los alelos totales. Los resultados de análisis y resultados de encuestas indica que la mutación la más común es la DF508 con 31,3% (20/64), la G542X con 7,8%, y luego las mutaciones G551D, R1162X, F57L y p.Q220X con

0,16%. Es importante resaltar que las mutaciones G551D, R1162X diagnosticadas en otros laboratorios eran contempladas dentro del kit de A.R.M.S- P.C.R de la Universidad Nacional de Tumbes.

Si comparamos con los países latinoamericanos vecinos, el Perú tiene una prevalencia de DF508 relativamente baja en comparación con el promedio latinoamericano (43,54%) o particularmente con países como Argentina (59,15%), Uruguay (56,58%), Brasil (43,06%) o Chile (39,30%). Perú tiene una prevalencia de DF508 similar a Cuba (34,03%), Ecuador (31,37%) y muy superior a Costa Rica (22,92%). Al contrario, el Perú muestra una prevalencia superior de G542X comparando con Argentina (4,9%), Brasil (5,33%), Chile (5,55%) Ecuador (1,96%), similar a la de Uruguay (7,89%) y muy inferior a Costa Rica que presenta una tasa record a nivel mundial de 25% (Perez *et al.*, 2007).

La cobertura total del kit utilizado en esta investigación presenta una prevalencia muy bajas si consideramos que el mismo kit de 10 mutaciones permitiría identificar 87,8% de las mutaciones en el norte de Europa. Estos resultados confirman que muchas mutaciones presentes en la población Peruana son probablemente muy raras y difíciles a diagnosticar sin usar técnicas de barrido de A.D.N.

Para completar esta información, las muestras con mutaciones raras serán enviadas al CHU (Centro Hospitalero Universitario) de Brest en Francia que confirmará nuestros resultados y identificará las mutaciones faltantes. Este organismo oficial podrá también emitir un informe que será entregado a los médicos y a los pacientes.

Las extracciones de sangre fueron realizadas en duplicados por cada paciente y analizadas por espectrofotometría. Las muestras que mostraban las mejores concentraciones y cualidades de ADN fueron retenidas para el diagnóstico molecular.

Las fotos obtenidas representan ejemplos de resultados de análisis. La primera foto representa los resultados de multiplex ARMS PCR con las mutaciones DF508, N1303K y 621+1G□T. Los círculos rojos representan las amplificaciones específicas a las mutaciones, y en verde los controles correspondientes a la forma no mutada. La ausencia de bandas en el círculo verde de los pacientes 1, 3, 9, 12 indica que estos pacientes carecen de la forma normal del gen y son homocigotos DF508.

La A.R.M.S- P.C.R. es una técnica simple que permite detectar mutaciones específicas. Por lo tanto esta herramienta no conviene para la búsqueda de mutaciones raras, o nuevas. Para este tipo de diagnóstico se utiliza una técnica más sofisticada y delicada conocida como H.R.M. que se realiza sobre un equipo de tipo P.C.R. en tiempo real.

La qP.C.R o P.C.R. en tiempo real es una variante de la P.C.R. utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el fragmento amplificado. Considera el mismo principio que la P.C.R. pero se le adiciona una sustancia fluorescente sola o acoplada a una sonda que emite una luz bajo ciertas condiciones de excitación. La cantidad de luz emitida es proporcional a la aparición de los fragmentos amplificados. La medición de esta luz en un termociclador equipado de sensores para medir fluorescencia permite cuantificar el fragmento en tiempo real, o sea mientras aparecen.

Algunos termocicladores en tiempo real permiten realizar análisis de H.R.M. o sea analizar la curva de disociación en alta resolución. Esta técnica consiste en monitorear las pequeñas variaciones en la desaparición de la fluorescencia durante la fase de desnaturalización (cuando se incrementa la temperatura en el termociclador para abrir las cadenas de A.D.N.). En efecto, una mutación representa un cambio, una adición o una pérdida de nucleótidos en una región de A.D.N. dada. Así, una variación en la secuencia del alelo mutado pueda requerir más o menos calorías para abrirse que su homóloga normal. El análisis del H.R.M. del gen C.F.T.R. consiste en amplificar las 27 regiones codantes del gen (2 sondas por región) y de analizar los perfiles térmicos de los fragmentos amplificados. Las anomalías son detectadas y su perfil permite identificar la mutación. Se recomienda secuenciar la región sospechosa por seguridad.

El objetivo del presente proyecto era demostrar que esta técnica es aplicable localmente en la Universidad Nacional de Tumbes. Para ello se consideró realizar una amplificación utilizando como modelo la mutación DF508 como prueba de concepto.

## **VI.- CONCLUSIONES**

1.- Es factible desarrollar las biotecnologías en la Universidad Nacional de Tumbes utilizando la Fibrosis Quística como modelo para desarrollar tecnologías de diagnóstico de anomalías genéticas.

2.- Se encontraron 2 mutaciones en 6 de los 28 pacientes (21,42%) y al menos 1 mutación en 9 de 28 (32,21%) pacientes. Al contrario, no se pudo diagnosticar mutaciones en 13 de 28 pacientes (46,4%).

3.- El Perú tiene una prevalencia de DF508 relativamente baja (31,3%) en comparación con el promedio latinoamericano (43,54%)

## **VII.- RECOMENDACIONES**

- 1.- Continuar con la detección de mutaciones, que puedan estar presentes en la población raras.
- 2.- Al mejorar la capacidad diagnóstica se podrá establecer un programa de prevención a través del tamizaje familiar de los futuros padres.
- 3.- Transferir la tecnología desarrollada a los centros asistenciales para poder diagnosticar la Fibrosis Quística

## VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aguire I., SD. Fibrosis quística en el Perú. *Pneumologia pediátrica* p 52.

[Ashavaid T.F.](#), [Kondkar A.A.](#), [Dherai A.J.](#), [Raghavan R.](#), [Udani S.V.](#), [Udwadia Z.F.](#), [Desai D.](#), 2005 Application of multiplex ARMS and SSCP/HD analysis in molecular diagnosis of cystic fibrosis in Indian patients. [Mol. Diagn.](#); Vol.9, No.2:59-66.

[Audrezet M.P.](#) [Dabricot A.](#), [Le Marechal C.](#), [Ferec C.](#), 2008. Validation of High-Resolution DNA Melting Analysis for Mutation Scanning of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. *J. Mol. Diagn.*; Vol.10, No.5: 424–434.

[Baris I.](#), [Battaloglu E.](#), 2009. A multiplexed ARMS-PCR approach for the detection of common MECP2 mutations. [Genet. Test. Mol. Biomarkers.](#); Vol.13, No.1: 19-22.

[Castellani C.](#), [Cuppens H.](#), [Macek M.](#), [Cassiman J.J.](#), [Kerem E.](#), [Durie P.](#), [Tullis E.](#), [Assael B.M.](#), [Bombieri C.](#), [Brown A.](#), [Casals T.](#), [Claustres M.](#), [Cutting G.R.](#), [Dequeker E.](#), [Dodge J.](#), [Doull I.](#), [Farrell P.](#), [Ferec C.](#), [Girodon E.](#), [Johannesson M.](#), [Kerem B.](#), [Knowles M.](#), [Munck A.](#), [Pignatti P.F.](#), [Radojkovic D.](#), [Rizzotti P.](#), [Schwarz M.](#), [Stuhrmann M.](#), [Tzetis M.](#), [Zielenski J.](#), [Elborn J.S.](#), 2008. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. [J. Cyst.Fibros.](#); Vol.7, No.3: 179–196.

[Dequeker E.](#), [Stuhrmann M.](#), [Morris M.A.](#), [Casals T.](#), [Castellani C.](#), [Claustres M.](#), [Cuppens H.](#), [Des Georges M.](#), [Ferec C.](#), [Macek M.](#), [Pignatti P.F.](#), [Scheffer H.](#), [Schwarz M.](#), [Witt M.](#), [Schwarz M.](#), [Girodon E.](#), 2009. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations. *Eur. J. Hum. Genet.*; Vol.,17 No.1: 51–65.

[Duchesneau P.](#), [Wong A.P.](#), [Waddell T.K.](#), 2010. [Optimization of Targeted Cell Replacement Therapy: A New Approach for Lung Disease](#). *Mol Ther.*; Vol.18, No.10: 1830–1836.

[Er T.Z.](#), [Chang T.G.](#), 2012. High-resolution melting: Applications in genetic disorders. [Clinica Chimica Acta.](#); Vol.414, No.24: 197–201.

[Ferrie R.M.](#), [Schwarz M.J.](#), [Robertson N.H.](#), [Vaudin S.](#), [Super M.](#), [Malonej G.](#), [Little S.](#), 1992. Development, Multiplexing, and Application of ARMS Tests for Common Mutations in the CFTR Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 51:251-262, 1

Gomes-Alves,P. Penque,D., 2010.- Proteomics uncovering posible key players in F508del-CFTR processing and trafficking.- *Expert.Rev.Proteomics.*; Vol.7, No.,4: 487-494.

Goor F.V., 2011, Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigation al drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.108*, 18843–18848.

[Grody W.W.](#), [Cutting G.R.](#), [Watson M.S.](#), 2007. The Cystic Fibrosis mutation "arms race": when less is more. [Genet. Med.](#); Vol.9, No.11: 739-44.

Hoffman L.R., Ramsey B.W., 2013. Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest. Vol.1*; No.143(1):207-13.

Keyeux G., Rodas C., Bienvenu T., Garavito P., Vidaud D., Sanchez D., Kaplan J.C. and Aristizabal G., 2003. CFTR mutations in patients from Colombia: implications for local and regional molecular diagnosis programs. *Hum. Mutat.*; Vol.22 No.3: 259.

Kingsmore S., 2012. Comprehensive carrier screening and molecular diagnostic testing for recessive childhood diseases. *PLoS.Curr.*; Vol.2 No.4: 9877-9889.

[Krenková P.](#), [Norambuena P.](#), [Stambergová A.](#), [Macek M.](#), 2009. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the CFTR gene. [Folia Biol. \(Praha\)](#); Vol.55 No.6:238-42.

Lay-Son G., Puga A., Astudillo P. and Repetto G.M., 2011.- Cystic fibrosis in Chilean patients: Analysis of 36 common CFTR gene mutations.- *J Cyst.Fibros.*, Vol. 10 No.,1: 66-70.

[Montgomery J.](#), [Wittwer C.T.](#), [Kent J.O.](#), [Zhou L.](#), 2007. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. [Clin.Chem.](#); Vol.53, No.11:1891-8.

Morales-Machin A., Borjas-Fajardo L., Pineda-Del Villar L., Prieto-Carrasquero M., González S., Gutiérrez M., Delgado-Luengo W., Alvarez F., Barrera-Saldana H., 1997. Diagnostico molecular prenatal de fibrosis quística. Reporte de tres casos *Invest.Clin.*;38, No.3: 145-53.

Morales-Machin A., Borjas-Fajardo L., Pineda L., Gonzalez S., Delgado W., Zabala W., Fernandez E., 2004.- Frecuencia de la mutación F508 en pacientes venezolanos afectados con fibrosis quística.- *Invest.Clin.*; Vol. 45, No.2: 121-130.

- Moya-Quiles M.R., Glover G., Mondejar-Lopez P., Pastor-Vivero M.D., Fernandez-Sanchez A., Sanchez-Solis M., 2009.- CFTR H609R mutation in Ecuadorian patients with cystic fibrosis.- J.Cyst.Fibros., Vol. 8 No.4: 280-281.
- Penque,D., 2009.- Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery.- Proteomics. Clin. Appl.; Vol.3: 155–172.
- Perez M.M., Luna M.C., Pivetta O.H., Keyeux G., 2007.- CFTR gene analysis in Latin American CF patients: heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent.- J. Cyst.Fibros.; Vol.6, No.,3: 194-208.
- Perone C., Medeiros G.S., del Castillo D.M., De Aguiar M.J.B., Januário J.N., 2010. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening; Braz J Med Biol Res, Volume 43(2) 134-138
- Prickett M., Jain M., 2013. Gene therapy in cystic fibrosis. Transl. Res. 2013, In Press.
- Raskin S., Phillips J.A., Krishnamani M.R., Vnencak-Jones C., Parker R.A., Rozov T., Cardieri J.M., Marostica P., Abreu F., Giugliani R., 1993. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. Am. J. Med. Genet.; Vol.46, No.6: 665-9.
- Restrepo C.M., Pineda L., Rojas-Martinez A., Gutierrez C.A., Morales A., Gomez Y., Villalobos M.C., Borjas L., Delgado W., Myers A., Barrera-Saldana H.A., 2000.- CFTR mutations in three Latin American countries.- Am. J. Med. Genet.; Vol. 91, No.4: 277-279.
- [Scotet V.](#), [Duguépéroux I.](#), [Saliou P.](#), [Rault G.](#), [Roussey M.](#), [Audrézet M.P.](#), [Férec C.](#), 2012. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. Orphanet. J. Rare Dis.; Vol.7: 14.
- Sherlock J., Cirigliano V., Petrou M., Tutschek B., Adinolfi M., 1998. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. Ann. Hum.Genet.; Vol.62, No.1: 9-23.
- Silva C., 2008. Mutaciones más frecuentes en el gen CFTR de pacientes diagnosticados con fibrosis quística del Instituto Especializado de Salud del Niño. Tesis para optar el título profesional de Químico farmacéutico. Universidad Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 77P.
- Stoltz D.A., Meyerholz D.K., Pezzulo A.A., Ramachandran S., Rogan M.P., Davis G.J., Hanfland R.A., Wohlford-Lenane C., Dohrn C.L., Bartlett J.A.,

Nelson G.A., Chang E.H., Taft P.J., Ludwig P.S., Estin M., Hornick E.E., Launspach J.L., Samuel M., Rokhlina T., Karp P.H., Ostedgaard L.S., Uc A., Starner T.D., Horswill A.R., Brogden K.A., Prather R.S., Richter S.S., Shilyansky J., McCray P.B., Zabner J., Welsh M.J., 2010. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci.Transl.Med.*; Vol.2, No.29: 29-31.

Sun X., Sui H., Fisher J.T., Yan Z., Liu X., Cho H.J., Soo Joo N., Zhang Y., Zhou W., Yi Y., Kinyon J.M., Lei-Butters D.C., Griffin M.A., Naumann P., Luo M., Ascher J., Wang K., Frana T., Wine J.J., Meyerholz D.K., Engelhardt J.F., 2010. Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J Clin Invest.*; Vol.1, No.120(9): 3149–3160.

[Tomaiuolo R.](#), [Spina M.](#), [Castaldo G.](#), 2003. Molecular diagnosis of cystic fibrosis: comparison of four analytical procedures. [Clin. Chem. Lab. Med.](#); Vol.41, No.1: 26-32.

Torres Vela D., 2002. ESTUDIO CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA EN EL INSTITUTO DE SALUD DEL NIÑO, Lima 1991 – 2001. *Paediatrica.*; Vol.4, No.3: 7-15.

[Tricarico R.](#), [Crucianelli F.](#), [Alvau A.](#), [Orlando C.](#), [Sestini R.](#), [Tonelli F.](#), [Valanzano R.](#), [Genuardi M.](#), 2011. High resolution melting analysis for a rapid identification of heterozygous and homozygous sequence changes in the MUTYH gene *BMC. Cancer.*; Vol.11: 305.

Tucker T.A., Fortenberry J.A., Zsembery A., Schwiebert L.M., Schwiebert E.M., 2012. [The  \$\Delta F508\$ -CFTR mutation inhibits wild-type CFTR processing and function when co-expressed in human airway epithelia and in mouse nasal mucosa.](#) *BMC Physiol.*; Vol.12: 12.

Valle E.P., Burgos R.I., Valle J.R., Egas B.D., Ruiz-Cabezas J.C., 2007.- Analysis of CFTR gene mutations and cystic fibrosis incidence in the Ecuadorian population.- *Invest. Clin.*; Vol.48, No.1: 91-98.

## ANEXOS

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Hospital IV Edgardo Rebagliatti Martins. EsSalud.

#### INFORMACIÓN:

La Fibrosis Quística (F.Q.) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen C.F.T.R. (*Cystic fibrosis conductance regulator gene*), y caracterizada por la producción de sudor con alto contenido salino y secreción mucosa de viscosidad anormal, lo que conlleva a la producción de síntomas respiratorios, secundarios a bronquitis crónica e infección recurrente, síntomas digestivos y retardo del crecimiento.

Usted está siendo invitado a participar de esta investigación que tiene como objetivo identificar las mutaciones más frecuentes del gen C.F.T.R. y los principales patógenos que colonizan la vía respiratoria inferior en pacientes con F.Q. en el Perú. Para realizarlo, requerimos recolectar datos de la historia clínica de su hijo y/o de UD, así como obtener muestra de sangre. En la muestra de sangre se estudiará la causa genética de la enfermedad. Esta investigación podría beneficiar a muchas personas y aportar herramientas útiles para mejorar la calidad y expectativa de vida de los pacientes con F.Q. Así, si usted decide participar del estudio firme el Término de Consentimiento abajo, después de leerlo detenidamente y después de aclarar todas sus dudas sobre este asunto con el médico que lo(a) está atendiendo.

#### CONSENTIMIENTO:

Después de leer, entender y no teniendo ninguna duda sobre la Información que el investigador me ha proporcionado, doy mi consentimiento para participar en el estudio.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre del padre/apoderado: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre de la madre/apoderada: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Médico Tratante: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO PARA ANALISIS GENÉTICO

Hospital IV Edgardo Rebagliatti Martins. EsSalud.

Doy mi consentimiento para llevar a cabo la identificación de mutaciones del gen C.F.T.R. (Cystic Fibrosis Conductance Regulator Gene) en mí o en la persona de la cual soy responsable (apoderado).

Estoy de acuerdo con el registro de mis datos personales: nombre, fecha de nacimiento parentesco con otros miembros de la familia y, de ser requerido, información médica, en concordancia con la regulación de la protección de datos. También estoy de acuerdo que los resultados del análisis molecular puedan ser registrados en una base de datos para que sean transmitidos a mí o a mi médico tratante. Parte de los datos, en particular los resultados de análisis genéticas podrían ser utilizados para la realización de informes y publicaciones a carácter científicos. He sido ampliamente informado por mi médico sobre la enfermedad a ser analizada.

Además he sido informado sobre la importancia y consecuencias de la investigación planeada. He sido informado que, especialmente en el caso de la investigación genética familiar, es importante brindar la información correcta sobre la relación entre los miembros de la familia.

Estoy consciente que no obtendré ningún beneficio económico o de otra índole, más que el conocer la(s) mutación(es) causante(s) de la enfermedad.

Tengo conocimiento que si tuviese preguntas más adelante, puedo contactar a mi médico.

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Firma del paciente/apoderado

Además, estoy de acuerdo con el almacenamiento y uso anónimo del material genético para futuras investigaciones. Si ( ) No ( )

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Firma del paciente/apoderado

## DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO INFORMADO PARA ANALISIS GENÉTICO

Instituto Nacional de Salud del Niño

Queremos informarte sobre El Proyecto titulado “Desarrollo de herramientas moleculares para el diagnóstico de anomalías genéticas asociadas a la Fibrosis Quística como un modelo de biotecnología medica”, que se desarrollara en Lima, específicamente en los Hospitales: Hospital Nacional “Edgardo Rebagliati Martins”, Instituto Nacional de Salud del Niño (Ex Hospital del Niño) cuenta con la participación de las siguientes Instituciones: Universidad Nacional de Tumbes (Facultad de ciencias de la Salud y Facultad de Ingeniera Pesquera, Hospital Nacional EsSalud Edgardo Rebagliati Martins, Instituto Nacional de Salud del Niño, Asociación de Padres de niños con Fibrosis Quística (FIQUI), Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Brest. (Francia) y Inca´Biotec SAC.

Nuestro objetivo es brindar la información correcta y clara, para que puedas decidir si quieres participar en este estudio.

Cuando hayas comprendido la información que te damos, es necesario que firmes el documento de asentimiento para que puedas participar en este estudio, junto con el consentimiento informado que firmaran tus padres o tutores.

Se te dará una copia de este documento para que puedas guardarlo.

### ¿CUÁL ES EL PROPOSITO DEL ESTUDIO?

En este estudio identificaremos la alteración del Gen, que se asocia a la enfermedad llamada Fibrosis Quística (F.Q.).

Para ello, le pediremos a tus padres que te traigan para realizar una muestra de sangre que será enviada para ser analizada genéticamente.

## ¿EN QUE CONSISTE?

El proceso de análisis del proyecto se ejecutara en los ambientes del laboratorio de Biología Molecular y Inmunología de la Facultad de Ingeniera Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes y serán enviados a Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Brest. (Francia) .

Se le tomará una muestra de sangre para el diagnóstico de mutaciones. Estas muestras serán colectadas en el Hospital Rebagliati y Hospital del Niño en Lima.

## PARTICIPACION EN EL ESTUDIO

La participación en este estudio será una decisión libre de tu parte, es voluntaria, y tiene beneficios sobre tu enfermedad, que permitirá conocer más de ella.

## CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida de tu persona, será mantenida en estricta confidencialidad y conocida solo por el equipo investigador.

Si tienes alguna pregunta sobre este estudio, puedes comunicarte con nosotros.

## **Al firmar este formato, estoy de acuerdo en que:**

1. He revisado la información que ha sido entregada
2. He tenido oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio
3. He recibido respuestas satisfactorias
4. Entiendo que mi participación es voluntaria

Estoy de acuerdo en participar en este estudio, de acuerdo alas condiciones que me han señalado.

Los resultados obtenidos del estudio podrían ser publicados o comunicados a la comunidad científica, manteniendo mi anonimato

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

DNI: \_\_\_\_\_

Firma del apoderado

Nombre de la persona que explico el Asentimiento: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANALISIS GENÉTICO**

Instituto Nacional de Salud del Niño

Nos dirigimos a Ud., para informarle sobre el Proyecto titulado “Desarrollo de herramientas moleculares para el diagnóstico de anomalías genéticas asociadas a la Fibrosis Quística como un modelo de biotecnología medica”, que se desarrollara en Lima, específicamente en los Hospitales: Hospital Nacional “Edgardo Rebagliati Martins”, Instituto Nacional de Salud del Niño (Ex Hospital del Niño) cuenta con la participación de las siguientes Instituciones: Universidad Nacional de Tumbes (Facultad de ciencias de la Salud y Facultad de Ingeniera Pesquera, Hospital Nacional EsSalud Edgardo Rebagliati Martins, Instituto Nacional de Salud del Niño, Asociación de Padres de niños con Fibrosis Quística (FIQUI), Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Brest. (Francia) y Inca´Biotec SAC.

Nuestro objetivo es brindar la información correcta y clara, para que pueda evaluar si quiere o no que su hija/hijo participe en este estudio.

Para ello es necesario que ambos padres (o tutores) firmen el consentimiento informado.

Se le dará una copia de este documento para que usted lo conserve.

**¿CUÁL ES EL PROPOSITO DEL ESTUDIO?**

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad genética, muy agresiva, y frecuentemente es provocada por mutaciones recesivas en el gen de la CFTR (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística).

El diagnostico final de la FQ se realiza con la identificación por técnicas de biología molecular de las mutaciones del gen CFTR propias a cada paciente, lamentablemente no siempre es posible la realización de las pruebas que permitan esta identificación genética, y al momento no existen publicaciones científicas que identifiquen en grandes poblaciones, las mutaciones

relacionadas con esta enfermedad. El conocer estas mutaciones a la larga permitirá saber en quienes es posible los beneficios conseguidos con los nuevos potenciadores de la CFRT.

#### ¿EN QUE CONSISTE?

El proceso analítico del proyecto se ejecutara en los ambientes del laboratorio de Biología Molecular y Inmunología de la Facultad de Ingeniera Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes y serán enviados al Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Brest. (Francia)

Las muestras de sangre para el diagnóstico de mutaciones serán colectadas en el Hospital Rebagliati y Hospital del Niño en Lima.

#### PARTICIPACION EN EL ESTUDIO

La participación en este estudio será una decisión libre de su parte

Por los beneficios potenciales para la salud del niño y de los demás pacientes con FQ, no se contempla que usted perciba compensación económica directa por la participación de su hijo/a en este estudio.

#### CONFIDENCIALIDAD

Toda la información que se registrara de su hijo/a será confidencial, conforme a la Ley de Protección de datos personales nacional vigente.

Los resultados de este estudio, podrían ser publicados de forma global y nunca bajo ningún modo, en forma individualizada, con el objeto de garantizar los derechos que le asisten en cuanto a la confiabilidad de los datos personales de su hijo/a.

“Desarrollo de herramientas moleculares para el diagnóstico de anomalías genéticas asociadas a la Fibrosis Quística como un modelo de biotecnología medica”,

Yo \_\_\_\_\_ (nombres \_\_\_\_\_ y  
apellidos):.....

En calidad de .....doy mi consentimiento para llevar a cabo la identificación de mutaciones del gen CFTR (cystic fibrosis conductance regulator gene) en el menor de edad o hijo :.....

Estoy de acuerdo con el registro de sus datos personales: nombre, fecha de nacimiento parentesco con otros miembros de la familia y, de ser requerido, información médica, en concordancia con la regulación de la protección de datos.

Estoy de acuerdo, que a mi menor hijo, o menor del cual soy responsable, con diagnóstico de Fibrosis Quística, se le extraiga ml de sangre (extracción generalmente de uno de los miembros superiores) y de la importancia y consecuencias de la investigación planteada, he sido informado que, especialmente en el caso de investigación genética familiar, es importante brindar la información correcta sobre la relación entre los miembros de la familia

También estoy de acuerdo que los resultados del análisis molecular puedan ser registrados en una base de datos para que me sean referidos a mi persona. He sido ampliamente informado por mi médico sobre la enfermedad a ser analizada.

Estoy consciente que no obtendré ningún beneficio económico o de otra índole, más que el contribuir al estudio de la genética de la enfermedad.

Esta muestra no podrá utilizarse para ningún otro fin, sin mi consentimiento previo. Podré en cualquier momento solicitar por escrito al grupo de investigación, que mi expediente sea eliminado de todos los estudios y que mi ADN sea destruido.

Los resultados obtenidos deberán permitir la realización de al menos 1 publicación en 1 revista indexada de impacto internacional y dar lugar a conferencia en conjunto con los hospitales involucrados

Estoy de acuerdo en participar en este estudio de investigación. ( )

Me niego a participar en este estudio de investigación. ( )

Tengo conocimiento que si tuviese preguntas más adelante, puedo contactar a mi médico.

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del Padre/apoderado: \_\_\_\_\_

DNI: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre de la Madre/apoderado: \_\_\_\_\_

DNI: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Además, estoy de acuerdo con el almacenamiento y uso anónimo del material genético para futuras investigaciones. Si ( ) No ( )

Los resultados obtenidos del estudio podrían ser publicados o comunicados a la comunidad científica, manteniendo mi anonimato

Nombre de la persona que explico el Consentimiento: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## EXTRACCIÓN DE A.D.N EN SANGRE

- La sangre se recogió en tubos vacutainer que contienen anticoagulante E.D.T.A. Como en todos los fluidos corporales, la sangre representa un riesgo biológico potencial, por lo tanto se debe tener cuidado en todos los pasos que requieren la manipulación de la sangre. Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente para la extracción de A.D.N en el mismo día de trabajo o en el refrigerador para usos posteriores.
- Vertir 500 ul de sangre en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y añadir 1,000 ul de tampón de lisis de glóbulos rojos.
- Agitar suavemente el tubo de microcentrífuga (hasta homogeneización), luego girar durante 2 minutos a 7000 rpm.
- Desechar el sobrenadante y repetir los pasos 1-3 dos o tres veces para eliminar la hemoglobina. Es importante para la ruptura del sedimento por agitación con vórtex y se enjuaga bien en tampón de lisis de glóbulos rojos con el fin de limpiar las células blancas de la sangre desde los residuales de la hemoglobina.
- Colocar el tubo hacia abajo sobre el papel tisú unos pocos segundos. Tenga cuidado de la contaminación cruzada entre las diferentes muestras.
- Añadir 400 ul de tampón de lisis nucleico al tubo Eppendorf. Nota: si hay pellet formado, se debe pipetear el sedimento hasta disolverlo.
- Añadir 100 ul de NaCl saturado a (5 M) y 600 ul de cloroformo al tubo Eppendorf y se mezcla en un mezclador giratorio de sangre a temperatura ambiente, después se hace girar durante 2 minutos a 7000 rpm.
- Transferir 400 ul del sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- Agregar 800ul de etanol absoluto helado a (-20°C), agitar suavemente y luego vórtex.
- Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante un minuto a 12.000 rpm para precipitar, después eliminar el sobrenadante cuidadosamente y dejar que el tubo se seca completamente a temperatura ambiente (Coloque el tubo de Eppendorf invertido sobre el papel tisú).
- Añadir 50 ul de TE y después vórtex; mantener tubo Eppendorf de ADN en 4 ° C o -20 ° C para usos posteriores.

## REFERENCIAS

Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood Stored at 4°C for Long Period

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### 1. Stock de Tris Y EDTA

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	CANTIDAD	VOLUMEN FINAL	PH
Tris HCl	1 M	6,055 gr	50 ml	7,6
EDTA	0,5 M	9,305 gr	50 ml	8

- EDTA.- Ajustar el pH con hidróxido de sodio NaOH. Autoclavar a 15 p.s.i. por 15 min.
- Tris-HCL.- Ajustar el pH con ácido clorhídrico. Autoclavar a 15 p.s.i. por 15 min

### 2. Preparación del buffer lisis Red blood cell: (buffer lisis de glóbulos rojos):

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	CANTIDAD gr/ml	VOLUMEN FINAL
Tris-HCl pH 7.6	0.01 M	0,5 ml	50 ml
Sucrosa	320 mM	5,477 gr	
MgCl	5 mM	0,0505 gr	
Ajustar a pH 8 y luego agregar:			
Triton X 100	1%	0,5 ml	

Autoclavar a 15 p.s.i. Por 10 min. Azúcares a alta temperatura pueden causar caramelización (pardeamiento), que degrada los azúcares.

### 3. Preparación del buffer lisis de nucleicos:

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	CANTIDAD gr/ml	VOLUMEN FINAL
Tris-HCl (pH 7.6)	0.01 M	0,5 ml	50 ml
Citrato de sodio	11.4 mM	0,147 gr	
EDTA (pH 8.0)	1 mM	0,1 ml	
SDS	1%	0,5 gr	

Ajustar pH 8.0 Autoclavar a 15 min a 15 p.s.i.

### 4. Preparación del buffer TE

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	CANTIDAD gr/ml	VOLUMEN FINAL
----------	---------------------	----------------	---------------

Tris-HCl pH 7.6	10 Mm	0,5 ml	50 ml
EDTA (pH 8.0)	1 Mm	0,1 ml	

Ajustar pH 8.0 y autoclavar a 15 min at 15. p.s.i.

### 5. Preparación del cloruro de sodio NaCl

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	CANTIDAD gr/ml	VOLUMEN FINAL
NaCl	5 M	14,6 gr	50 ml

## PROTOCOLO OPTIMIZADO ARMS MULTIPLEX PCR PARA LAS MUTACIONES; $\Delta$ F508, 621+1G $\rightarrow$ T, N1303K, G551D y G542X

### 1. MIX A

MIX PCR A1			
Reactivos/Primer	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
$\Delta$ F 508 normal : DFJ N	20pMol/ $\mu$ l	1,5 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
$\Delta$ F 508 común : DFC	20pMol/ $\mu$ l	1,5 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
621+1G $\rightarrow$ T:normal:621 J N	10pMol/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
621+1G $\rightarrow$ T:comun:621 C	10pMol/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
N1303K normal : NK N	40pMol/ $\mu$ l	2 $\mu$ M	1 $\mu$ L
N1303K común : NK C	40pMol/ $\mu$ l	2 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			9.028 $\mu$ L
Volumen final			

MIX PCR A2			
Reactivos/Primer	Concentración inicial	Concentración final	volumen

PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
G551D mutado : GdJ M	10pMol/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
G551D común : 11C	10pMol/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
G 542X mutado : GX M	10pMol/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			13.028 $\mu$ L
Volumen final			

## 2. MIX B

<b>MIX PCR B1</b>			
Reactivos/Primer	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
$\Delta$ F 508 mutado : DFw M	25pMol/ $\mu$ l	2 $\mu$ M	1,6 $\mu$ L
$\Delta$ F 508 común : DFC	25pMol/ $\mu$ l	2 $\mu$ M	1,6 $\mu$ L
621+1G $\rightarrow$ T:mutado :621r M	5pMol/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ M	1 $\mu$ L
621+1G $\rightarrow$ T:comun:621 C	5pMol/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ M	1 $\mu$ L
N1303K mutado : NK M	20pMol/ $\mu$ l	1 $\mu$ M	1 $\mu$ L
N1303K común : NK C	20pMol/ $\mu$ l	1 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			8.828 $\mu$ L
Volumen final			

<b>MIX PCR B2</b>			
Reactivos/Primer	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 µL
dNTP mixture	10 mM	86µM	0.172µl
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 µL
G551D normal : GDj <sub>2</sub> d <sub>3</sub> N	5pMol/µl	0.25 µM	1 µL
G551D común : 11C	10pMol/µl	0.5µM	1 µL
G 542X normal : GXe N	5pMol/µl	0.25 µM	1 µL
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/µL	1U	0,2 µL
Cantidad de ADN		≈ 100 ng/µL	1 µL
Agua libre de nucleasas			13.028 µL
Volumen final			

#### PROGRAMA DE PCR:

94° C	2 min	1 ciclo
94° C	30 seg	35 ciclos
61° C	30 seg	
72° C	30 seg	
72° C	10 min	1 ciclo
15° C	∞	

#### ELECTROFORESIS:

- Gel de agarosa al 2%.
- Migración.- 90 voltios.

#### LECTURA: Sobre UV

Primer	Tamaño en pb	Kit A	Kit B
621+1G→T	380 pb	N	M

N1303K	328 pb	N	M
G551D	285 pb	M	N
G 542X	256 pb	M	N
ΔF 508	157 pb	N	M

### MULTIPLEX ARMS PCR MIX C y D PARA LAS MUTACIONES

#### 3659 Del C normal y 1717-1G→A

#### 1. MIX C

<b>MIX PCR C</b>			
Reactivos/Primer	Concentración inicial	Concentración final	volume n
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 μL
dNTP mixture	10 mM	200μM	0.4μl
Magnesium Chloride	50 mM	1.5mM	0,6 μL
3659 Del C normal : DELC N	30pMol/μl	2 μM	1,3μL
3659 Del C común : DELC C	30pMol/μl	2 μM	1,3μL
1717-1G→A mutado ; 1717M	20pMol/μl	1.5μM	1,5 μL
1717-1G→A común ; 11C	20pMol/μl	1.5μM	1,5 μL
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/μL	1U	0,2 μL
Cantidad de ADN		≈ 100 ng/μL	1 μL
Agua libre de nucleasas			10,2 μL
Volumen final			

#### 2. MIX D

<b>MIX PCR D</b>			
Reactivos/Primer	Concentración inicial	Concentración final	volume n
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 μL
dNTP mixture	10 mM	200μM	0.4μl
Magnesium Chloride	50 mM	1.5mM	0,6 μL
3659 Del C mutado : DELC M	20pMol/μl	1,5μM	1,5 μL
3659 Del C común : DELC C	20pMol/μl	1,5 μM	1,5 μL
1717-1G→A normal :	5pMol/μl	0.5 μM	2 μL

1717N			
1717-1G→A común ; 11C	20pMol/μl	1,5 μM	1,5 μL
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/μL	1U	0,2 μL
Cantidad de ADN		≈ 100 ng/μL	1 μL
Agua libre de nucleasas			9,3 μL
Volumen final			

### 3. PROGRAMA

94° C	2 min	1 ciclo
94° C	30 seg	35 ciclos
65° C	30 seg	
72° C	30 seg	
72° C	10 min	1 ciclo
15° C	∞	

### 4. ELECTROFORESIS.-

- Gel de agarosa al 2%.
- Migración.- 90 voltios.

### 5. LECTURA: Sobre UV

Primer	Tamaño en pb	Kit C	Kit D
3659 Del C	294 pb	N	M
1717-1G→A	220 pb	M	N

## SINGLE ARMS PCR PARA LA MUTACION R553X

### 1. MIX A R553X

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
R553X COMUN	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
R553X NORMAL	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT1	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT2	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			12.028 $\mu$ L
Volumen final			

### 2. MIX B R553X

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
R553X COMUN	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
R553X MUTADO	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT1	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT2	23pMol/ $\mu$ L	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			12.028 $\mu$ L
Volumen final			

### PROGRAMA:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1

94°C	2 min	35
60°C	2 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	1

### **ELECTROFORESIS:**

- Gel de agarosa al 2%.
- Migración.- 90 voltios.

### **LECTURA:** Sobre UV

Primer	Tamaño en pb
R553X COMUN	291
R553X NORMAL	291
R553X MUTADO	291
AAT1	220
AAT2	220

## ASO ARMS PCR PARA LA MUTACION R1162X

### 1. MIX A R1162X

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mgcl	10X	1X	2.5µL
dNTP mixture	10 mM	0.2mM	0.5µl
Magnesium Chloride	50 mM	3mM	1.5 µL
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/µL	1.25U	0,3 µL
R1162X COMUN	100pMol/µL	10pMol/µl	2.5µL
R1162X NORMAL	100pMol/µl	10pMol/µl	2.5µL
Cantidad de ADN		≈ 100 ng/µL	1 µL
Agua libre de nucleasas			14.2µL
Volumen final			

### PROGRAMA DE PCR:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	1
95°C	1 min	35
63°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	10 min	1

### 2. MIX B R1162X

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2.5µL
dNTP mixture	10 mM	0.2mM	0.5µl
Magnesium Chloride	50 mM	3mM	1.5 µL
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/µL	1.25U	0,3 µL
R1162X COMUN	100pMol/µl	10pMol/µl	2.5µL
R1162X MUTADO	100pMol/µl	10pMol/µl	2.5µL
Cantidad de ADN		≈ 100 ng/µL	1 µL
Agua libre de			14.2µ

nucleasas			L
Volumen final			

**PROGRAMA DE PCR:**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	1
95°C	1 min	35
60°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	10 min	1

**ELECTROFORESIS:**

- Gel de agarosa al 2%.
- Migración.- 90 voltios.

**LECTURA:** Sobre UV

Primer	Tamaño en pb
R1162X COMUN	117
R1162X NORMAL	117
R1162X MUTADO	117

## SINGLE ARMS PCR PARA LA MUTACION W1282X

### 3. MIX A W1282X

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
W1282X COMUN	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
W1282X NORMAL	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT3	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT4	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			12.028 $\mu$ L
Volumen final			

### 4. MIX B W1282X

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	volumen
PCR Buffer, Minus Mg	10X	1X	2 $\mu$ L
dNTP mixture	10 mM	86 $\mu$ M	0.172 $\mu$ l
Magnesium Chloride	50 mM	1,5mM	0,6 $\mu$ L
Platinum® Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L	1U	0,2 $\mu$ L
W1282X COMUN	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
W1282X MUTADO	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT3	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
AAT4	23pMol/ $\mu$ l	0,86 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Cantidad de ADN		$\approx$ 100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas			12.028 $\mu$ L
Volumen final			

### PROGRAMA:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1
94°C	45 seg	35
60°C	45 seg	

72°C	45 seg	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

### **ELECTROFORESIS:**

- Gel de agarosa al 2%.
- Migración.- 90 voltios.

### **LECTURA:** Sobre UV

Primer	Tamaño en pb
W1282X COMUN	178
W1282X NORMAL	178
W1282X MUTADO	178
AAT3	360
AAT4	360