

Identificación de la mutación $\Delta F508$ en afectados con íleo meconial

Drs. Alisandra Morales de Machín, Jesús Fernández, Wilmer Delgado, Francisco Álvarez, Ana Bracho, María Luisa Hernández, Ernesto Solís, Lic. Karile Méndez, Lic. Lisbeth Borjas

Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

RESUMEN

Objetivo: Identificar la mutación $\Delta F508$ en pacientes con íleo meconial.

Ambiente: En el Instituto de Investigaciones Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. Maracaibo.

Métodos: Se estudiaron diez pacientes con íleo meconial. La detección de la mutación $\Delta F508$ se realizó a partir de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de un segmento del gen de fibrosis quística de 98 pares de bases que contiene el codón que codifica a la fenilalanina en la posición 508 y el cual está ausente en los que tienen la mutación.

Resultados: Se detectó la mutación $\Delta F508$ en ambos alelos del gen de la fibrosis quística en tres pacientes, en un solo alelo en cinco y en dos no se identificó el alelo $\Delta F508$ en su patrón molecular.

Conclusión: El íleo meconial fue el marcador que sugirió el diagnóstico de fibrosis quística y permitió el asesoramiento genético de las familias al confirmar la presencia de la mutación $\Delta F508$.

Palabras clave: Íleo meconial. Fibrosis quística. Mutación $\Delta F508$. Asesoramiento genético.

SUMMARY

Objective: To perform $\Delta F508$ mutation in patients with meconium ileus.

Setting: In the Genetic Research Institute of the Faculty of Medicine. University of Zulia. Maracaibo.

Methods: We studied 10 patients with meconium ileus. Detection of the mutation was performed from the amplification of a 98 pair of bases cystic fibrosis gene segment which contains the codon that encodes phenylalanine in the 508 position by polymerase chain reaction. This amplified product is absent in those who have the mutation.

Results: The $\Delta F508$ mutation was detected in both alleles of the cystic fibrosis gene in 3 patients, 5 were heterozygous for this mutation and in two patients were undetectable.

Conclusion: Meconium ileus was the marker that suggested the diagnosis of cystic fibrosis and allowed the genetic counseling in this family to confirm the presence of the $\Delta F508$ mutation.

Key words: Meconium ileus. Cystic fibrosis. $\Delta F508$ mutation. Genetic counseling.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (CF) es la enfermedad autosómica recesiva (AR) severa más frecuente en la población caucásica. Con una incidencia de uno en cada 2 000 – 3 500 recién nacidos (RN) vivos y

*Especialistas en Obstetricia y Ginecología y en Disfunción y Cirugía Reconstructiva del Piso Pélvico. Universidad Central de Venezuela.

**Especialista en Cirugía General y Ginecología. Universidad Central de Venezuela. Jefe de Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de Caracas.

una frecuencia de portador de uno en 25 (1).

La CF, se caracteriza por ser una enfermedad generalizada de las glándulas exocrinas y cursa acompañada de un incremento de la viscosidad del moco en distintos órganos, con síntomas de carácter predominantemente gastrointestinal, pulmonar obstructivo crónico y genitourinario, manifestándose en la piel por sudor con alto contenido en sal. Es una enfermedad con variabilidad fenotípica (2).

El íleo meconial (MI), es el signo más precoz y severo en aproximadamente 10 % a 20 % de afectados con CF en el período pre y posnatal inmediato (1), en Venezuela se ha reportado en 10 % de pacientes con CF (3). Se caracteriza por contenido intestinal muy espeso, meconio de alta viscosidad causado por escasez de enzimas pancreáticas y deshidratación, de difícil propulsión y ocluye la luz causando una obstrucción que empieza de manera típica en el íleon terminal. La impactación de meconio se produce a nivel de los últimos 10 a 30 cm de íleon. El intestino proximal a la obstrucción suele estar dilatado. El intestino distal a la obstrucción es estrecho y contiene meconio de color grisáceo que forma esferas a modo de cuentas de rosario y existe microcolon por desuso, con escaso meconio en su interior (1).

El MI puede conducir a un área localizada de isquemia resultando en estenosis o atresia, la hiperperistalsis puede conducir a un vólvulo, la necrosis isquémica del vólvulo puede producir un pseudoquistes, el cual puede finalmente formar una atresia con calcificaciones (4).

El MI puede sospecharse in útero por ecografía, a partir de la semana 18 de gestación, a través del hallazgo ultrasonográfico de intestino hiperecogénico (5,6). Se presenta al nacimiento, con distensión abdominal progresiva, vómitos biliosos y falta o retardo en la eliminación de meconio. La radiografía de abdomen suele evidenciar asas intestinales dilatadas, con áreas de aire mezcladas con meconio deshidratado, habitualmente en el cuadrante inferior derecho. En ocasiones pueden verse imágenes de calcificación (6).

El gen de la CF está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, banda 31 (7q31) (7-10). Codifica para una glicoproteína transmembrana, esta proteína funciona como un canal de cloro y se denomina regulador de la conductancia transmembrana de CF (CFTR) (11-13).

Esta enfermedad es debida a mutaciones en el gen de CF. Se han identificado alrededor de 2007 mutaciones (14). Estas mutaciones condicionan la pérdida total o parcial de la función de la proteína y

causan un defecto en el transporte de electrolitos en la membrana apical de las células epiteliales alterando la función secretoria en diferentes órganos y tejidos (1).

La mutación más frecuente es la $\Delta F508$, que consiste en la delección de tres pares de bases (pb) en el gen, resultando en la delección del aminoácido fenilalanina en la posición 508 de la proteína. Es una mutación que afecta el procesamiento postraduccional, es decir, defecto en el plegamiento y movilización de la proteína, resultando en acúmulo de la proteína mutada en el retículo endoplasmático, sobre el cual la proteína es degradada (15). Esta asociada con fenotipo severo, con insuficiencia pancreática (PI). Su frecuencia a nivel mundial es de 70 % (10). En Venezuela, la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ es de 26,76 % a 54 % (16-20).

Orozco y col. (21) citan que la presencia de las diferentes mutaciones en el gen *CFTR* explica solo parcialmente la heterogeneidad clínica de la CF, por tanto se ha propuesto la participación de genes modificadores, por lo que aunque no participen en la etiología de la enfermedad, tienen un gran impacto en la gravedad de las manifestaciones clínicas. Existen evidencias de que estos genes contienen polimorfismos, cuyas variantes alélicas son responsables de la diferencia en la expresividad de la gravedad entre pacientes con un mismo genotipo (21).

Existen estudios que asocian el MI a un locus del cromosoma 19 (19q13.2) (22,23). El estudio de análisis de ligamiento de Blackman y col. (24), reportó loci modificadores sugestivos, ya sea, como predisponentes para MI en 4q35.1, 8p23.1 y 11q25 o como protectores para MI en 20p11.22 y 21q22.3 y ellos concluyeron de estos resultados, que múltiples loci con pequeños efectos son los determinantes de MI (24).

Otro estudio, a través de análisis de ligamiento generó evidencia de un locus de MI en (12p13.3), el cual fue segregado en 80 % de familias con MI, con al menos un afectado, en este locus se ha relacionado al gen *ADIPOR2* con MI. Este gen, codifica uno de 2 receptores de adiponectina, la cual está envuelta en un amplio rango de procesos metabólicos incluyendo el metabolismo de lípidos y glucosa, jugando un factor antiinflamatorio, debido a la amplia expresión del gen *ADIPOR2* en varios tejidos y la presencia de adiponectina circulando en sangre, no está claro como la vía de señalización de adiponectina podría afectar MI. Una posibilidad es que la disrupción de la actividad antiinflamatoria de adiponectina podría contribuir a un riesgo incrementado de MI (25).

IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$

El objetivo de este trabajo fue identificar la mutación $\Delta F508$ en pacientes con íleo meconial.

MÉTODOS

Desde el año 1996 al 2014, fueron referidos desde la unidad de cuidados intensivos pediátricos del Hospital Universitario de Maracaibo al Instituto de Investigaciones Genéticas de la Universidad del Zulia (IIG-LUZ), diez pacientes afectados con MI complicado.

Se contó con el consentimiento informado de los padres de los afectados estudiados y la aprobación del Comité de Bioética del IIG-LUZ.

El MI fue definido como la falta de excreción de meconio durante las primeras 48 horas de vida, asociado con signos clínicos de obstrucción intestinal y hallazgos radiológicos característicos (26).

Para el análisis molecular de la mutación $\Delta F508$ se extrajo a 13 individuos, 3 mL de sangre periférica, anticoagulada con EDTA 5 mM, a la cual se le extrajo el ácido desoxirribonucleico (DNA) genómico según la técnica Fenol Sevag (27); distribuidos en: diez afectados, un control negativo (C-) sin patología de CF, con dos cloruros en sudor normales, con patrón molecular sin la mutación $\Delta F508$; un control positivo (C1+), obtenido de un afectado con CF homocigoto para la mutación $\Delta F508$ y un control positivo (C2+), obtenido de un afectado con CF heterocigoto compuesto para la mutación $\Delta F508$, también se utilizó un control de sistema (CS) o mezcla de reacción sin DNA.

La detección de la mutación $\Delta F508$, se realizó a través de la amplificación de parte del exón 10 del gen de CF mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 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'. Estos iniciadores limitan un segmento de 98 pb, en cuyo interior se localiza el codón que codifica para la fenilalanina en la posición 508 de la proteína. El montaje del PCR se realizó de acuerdo al método descrito previamente (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 Puc 19 digerido con *AluI*. El gel se coloreó con una solución de 5 mg/mL

de bromuro de etidio, se observó un transiluminador de luz ultravioleta (Hoefer Mod. UVTM-25).

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 2 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 dos alelos.

En los casos heterocigotos compuestos $\Delta F508/No \Delta F508$ y en los casos que no se detectó la mutación en su patrón molecular, se sugirió realizar después de iniciar la alimentación enteral, electrólitos en sudor por la técnica de iontoforesis con pilocarpina en dos oportunidades.

RESULTADOS

Todos los niños nacieron en el Estado Zulia, en un caso, se detectó consanguinidad parental (primos segundos), en dos recurrencia familiar de MI.

Siete fueron productos de embarazo simple a término y tres de embarazo pretérmino, siete de sexo masculino y tres femenino, con peso al nacer entre 2 200 a 3 400 g y talla entre 43 y 54 cm (Cuadro 1).

Todos los RN, tuvieron diagnóstico posoperatorio de MI y microcolon, cinco de ellos, además presentaron: uno atresia ileal y cuatro atresia yeyunal, uno de ellos además presentó vólvulo. Tres resultaron homocigotos $\Delta F508/\Delta F508$ y se confirmó el diagnóstico de CF; cinco heterocigotos compuestos $\Delta F508/No \Delta F508$ y en dos no se detectó la mutación $\Delta F508$ (Cuadro 2) y (Figura 1), por lo que fue necesario realizar electrólitos en sudor por la técnica de iontoforesis con pilocarpina, se confirmó el diagnóstico de CF en cuatro, debido a que el resultado fue mayor de 60 mEq/L; en un caso se descartó debido a que fue menor de 30 mEq/L y en dos ni se confirmó ni se descartó porque no se realizó dicho examen, debido a que fallecieron.

La frecuencia del alelo $\Delta F508$ en los pacientes con MI y CF fue de 71,4% (Cuadro 3).

Cuadro 1
Características clínicas de afectados con fíleo meconial

Caso	Sexo	Peso al nacer (g)	Talla al nacer (cm)	Edad gestacional (Semanas)	Fallecido (Días)	Edad de intervención (Días)
1	M	2.200	48	36	45	3
2	F	3.300	51	38		10
3	M	3.340	51	38	18	4
4	M	3.000	49	38	70	5
5	M	2.500	48	38	10	5
6	M	3.100	48	38		5
7	M	3.300	54	38	26	4
8	M	2.200	43	34	16	11
9	F	2.500	44	37	11	6
10	F	3.400	49	38	2	

g: gramos

cm: centímetros

Cuadro 2
Diagnóstico posoperatorio y molecular de afectados con fíleo meconial

Caso	Diagnóstico posoperatorio	Genotipo	Fibrosis quística
1	MI. Microcolon	$\Delta F508/\Delta F508$	SI
2	MI. Microcolon	$\Delta F508/\Delta F508$	SI
3	MI. Microcolon. Atresia Ileal	$\Delta F508/\Delta F508$	SI
4	MI. Microcolon	$\Delta F508/No\Delta F508$	SI
5	MI. Microcolon	$\Delta F508/No\Delta F508$	SI
6	MI. Microcolon. Atresia yeyunal. Vólculo	$\Delta F508/No\Delta F508$	SI
7	MI. Microcolon	$\Delta F508/No\Delta F508$	¿
8	MI. Microcolon. Atresia yeyunal	$\Delta F508/No\Delta F508$	SI
9	MI. Microcolon. Atresia yeyunal	$No\Delta F508/No\Delta F508$	NO
10	MI. Microcolon. Atresia yeyunal	$No\Delta F508/No\Delta F508$	¿

MI: ileo meconial

¿: Falleció sin confirmar o descartar fibrosis quística

Cuadro 3
Diagnóstico molecular de afectados con fíleo meconial y fibrosis quística

Genotipos	Pacientes		Alelos n	Alelos $\Delta F508$		Alelos No $\Delta F508$	
	n	%		n	%	n	%
Homocigoto $\Delta F508/\Delta F508$	3	42,9	6	6	42,9	0	0
Heterocigoto $\Delta F508/No\Delta F508$	4	57,1	8	4	28,5	4	28,5
Total	7	100	14	10	71,4	4	28,5

IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$

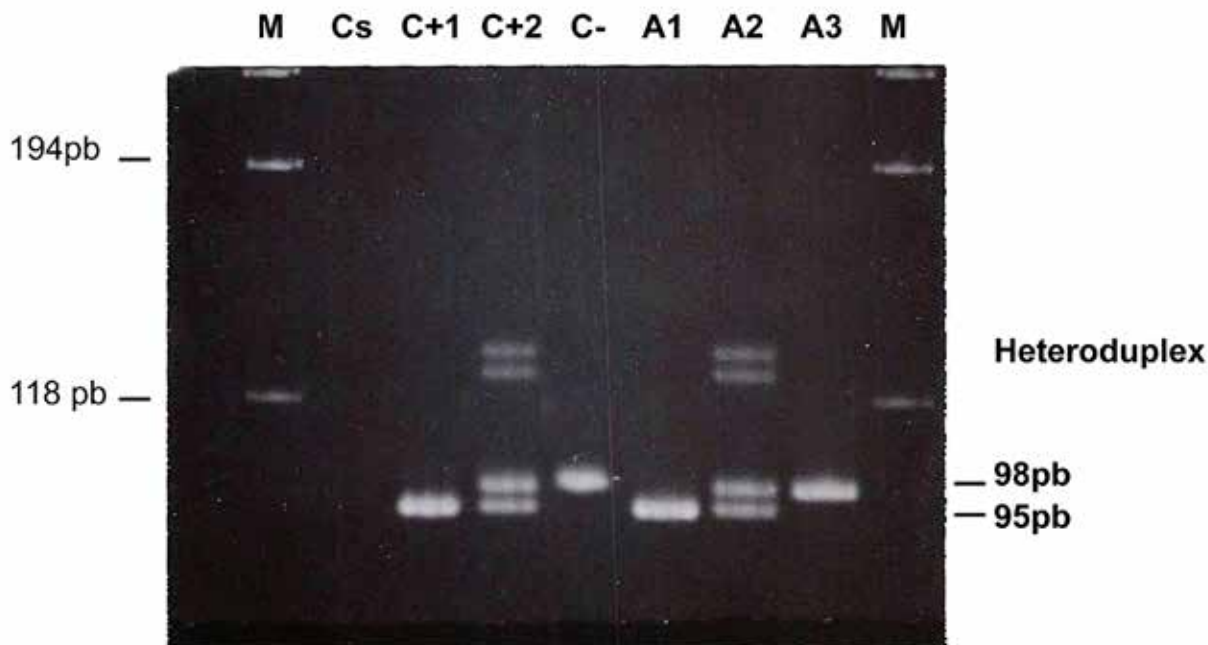


Figura 1. Diagnóstico molecular de la mutación $\Delta F508$ en afectados con íleo meconial. M: Marcador de peso molecular (pac 19 agenda AV). Cs: Control de sistema (mezcla de reacción sin DNA) C+1: Control positivo 1 afectado con fibrosis quística, homocigoto $\Delta F508/\Delta F508$. C+2: Control positivo 2 (afectado con fibrosis quística, heterocigoto compuesto $\Delta F508/\text{No } \Delta F508$). C-: Control negativo (individuo sin fibrosis quística). A1: Patrón molecular de afectado con fibrosis quística, homocigoto $\Delta F508/\Delta F508$. A2: Patrón molecular de heterocigoto $\Delta F508/\text{No } \Delta F508$. A3: Patrón molecular sin la mutación $\Delta F508$ ($\text{No } \Delta F508/\text{No } \Delta F508$). Heterocigoto dos barras de mayor tamaño, las cuales son el resultado del apareamiento de 95 y de 98 pb.

DISCUSIÓN

El trabajo en equipo y el avance tecnológico han permitido en nuestro medio el diagnóstico cada vez más precoz de enfermedades genéticas.

Según nuestro código genético, las instrucciones del DNA son traducidas a proteínas que serán las encargadas de ejecutarlas, las mutaciones en el DNA se traducen en proteínas anómalas con la correspondiente pérdida o alteración de funciones. Las complejas reacciones de estas proteínas en el metabolismo, inducen las manifestaciones clínicas (29).

La presencia de MI es un indicador de diagnóstico presuntivo de CF y se correlaciona con mutaciones que se caracterizan por determinar PI y afectación severa (10,26). En general, los pacientes con PI son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos

mutaciones graves, las mutaciones $\Delta F508$, G542X y 621+1G>T, están asociadas a una expresión severa de la enfermedad, ellas conducen a la pérdida completa de la función de la proteína y se les ha asociado con MI (30,31).

Debido a que el MI, se asocia aproximadamente a 30 % de resultados falsos negativos en el análisis de tripsina inmunorreactiva (IRT), situación que es más crítica después de la cirugía, observándose que los niveles de IRT aumentan gradualmente varios días después de haber retornado a la alimentación enteral y además recolectar sudor a esta edad puede, en ocasiones, resultar difícil (32). A todo RN con MI se le debe realizar análisis molecular (33) de al menos la mutación $\Delta F508$ y confirmar el diagnóstico de CF.

En RN con MI, la CF se ha confirmado en aproximadamente 90 % de los casos (5,6). La frecuencia de CF en los pacientes con MI, en este

estudio fue de 87,5 % (7/8).

Los resultados de este estudio tienen implicaciones para el manejo de estos RN y para el asesoramiento genético de sus familiares. En los casos, en los cuales se detecta la mutación $\Delta F508$ en ambos alelos, se confirma la CF; en los casos donde se detecta la mutación en un solo alelo o no esta presente en su patrón molecular, no es posible confirmar o negar la enfermedad por lo que se sugiere, cuando se retira la alimentación parenteral se debe realizar electrólitos en sudor, utilizando para la recolección de sudor la técnica de iontoforesis con pilocarpina y si es posible análisis de otras mutaciones consideradas severas, tales como las mutaciones G542X y 621+1G>T. Esto va a permitir asesoramiento genético adecuado en estas familias, a través del cual se maneja información médica a los padres tal como el diagnóstico de CF en estos pacientes, se asesora acerca de que es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, en donde los padres son portadores sanos y por ello el riesgo de recurrencia en cada embarazo es de 25 %, se informa del pronóstico, tratamiento y de esta manera se realiza prevención primaria, ya que evitar la patología va a depender que la pareja decida no tener más hijos, adoptar o utilizar técnicas de reproducción asistida a través de inseminación artificial heteróloga, fertilización *in vitro*, diagnóstico genético preimplantacional.

Ante nuevo embarazo sugerir diagnóstico prenatal (34) y según el resultado, si es feto sano, permite disminuir la ansiedad en la pareja y en los casos reportados con CF, permite tomar decisiones informadas, conducta obstétrica adecuada en institución con equipo multidisciplinario que ofrezca atención adecuada a la madre y al niño, mejorar calidad de vida o interrupción del embarazo en los países en los cuales este permitido.

La frecuencia del alelo $\Delta F508$ en pacientes con MI y CF ha sido reportada en 55 % a 91,7% (10,26,35). La frecuencia en este trabajo fue de 71,4 %. La diferencia en los resultados es probablemente secundaria a la heterogeneidad poblacional y de diseño metodológico.

Se ha reportado frecuencia incrementada de CF en RN con atresia Jejuno-ileal, en un rango de 9 % a 14 % (4). La frecuencia en este estudio fue de 45,8 % (3/7).

Algunos autores asocian la presentación de MI con un fenotipo más severo y un peor pronóstico de la enfermedad (30,35-37). En este estudio, fallecieron entre diez y 70 días, cinco (5/7) pacientes con MI y CF.

Agradecimiento: A Enrique Alejandro Machín Morales por toda la ayuda prestada.

REFERENCIAS

1. Welsh M, Ramsey B, Accuso F, Cutting G. Cystic fibrosis. En: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editores. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ª edición. New York: McGraw-Hill Co; 2001.p.5121-5188.
2. Dean M, Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. Hum Genet. 1994;93:364-368.
3. Morales de Machín A. Identificación molecular de las mutaciones más frecuentes causantes de fibrosis quística. [Tesis Doctoral] Maracaibo: LUZ; 1999.
4. Roberts H, Cragan J, Cono J, Khoury M, Weatherly M, Moore C. Increased frequency of cystic fibrosis among infants with jejunoileal atresia. Am J Med Genet. 1998;78:446-449.
5. Rodríguez C, Alencar A, Halpern L. Evaluación ultrasonográfica del aparato digestivo fetal. En: Califi D, Mejides A, Sepúlveda W, editores. Ultrasonografía en obstetricia y diagnóstico prenatal. Argentina: Ediciones Journal; 2003.p.295-319.
6. Davidson A. Gastrointestinal and pancreatic disease in cystic fibrosis. En: Hodson M, Geddes D, editores. Cystic Fibrosis. Great Britain: Chapman & Hall; 1995.p.259-280.
7. Tsui L, Buetow K, Buchwald M. Genetic analysis of cystic fibrosis using linked DNA markers. Am J Hum Genet. 1986;39:720-728.
8. Rommens J, Zengerling S, Burns J, Melmer G, Kerem B, Plavsic N, et al. 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.
9. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. Research Articles. 1989;1059-1065.
10. Kerem B, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. Science. 1989;245:1073-1080.
11. Riordan J, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989;245:1066-1080.
12. Riordan J, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun S. The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) superfamily. Adv Exp Med Biol. 1991;290:19-29.

IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$

13. Anderson M, Gregory R, Thompson S, Souza D, Paul S, Mulligan R, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 1991;253:202-205.
14. Cystic Fibrosis genetic Analysis Consortium; 2016. Disponible en: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
15. Cheng S, Gregory R, Marshall J, Paul S, Souza D, White G, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990;63:827-834.
16. Morales-Machín A, Borjas L, Pineda L, González S, Delgado W, Zabala W, et al. Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en pacientes venezolanos afectados con fibrosis quística. *Invest Clin*. 2004;45(2):121-130.
17. Restrepo C, Pineda L, Rojas A, Gutierrez C, Morales A, Gómez Y, et al. CFTR mutations in three latin american countries. *Am J Med Genet*. 2000;91:277-279.
18. Rolo M, Baeta M, Martínez J, Osorio L, Moreno N. Fibrosis quística en pacientes de la región Centro-Occidental venezolana: Identificación de focos geográficos. *Comunidad y Salud*. 2012;10(2):22-34.
19. Torres E, Martínez J, Rolo M, Baeta M, Sánchez S, Meza J, et al. Indagación de la mutación $\Delta F508$ en pacientes con fibrosis quística, atendidos en el Servicio de Neumonología Pediátrica de la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera". *Salus*. 2004; 8(3):10-16.
20. Arias S, Rolo M, González N, Navas A, Ruggeri G. La mutación $\Delta F508$ constituye el 54% de los alelos patogénicos de CF en 49 familias Venezolanas estudiadas desde 1978 (Resumen). *Memorias del VI Congreso Venezolano de Genética*. Sociedad Venezolana de Genética. 1995. Caracas. Venezuela.
21. Orozco L, Chávez M, Saldaña Y, Velázquez R, Carnevale A, González del Ángel A, et al. Fibrosis quística: la frontera del conocimiento molecular y sus aplicaciones clínicas. *Rev Invest Clin*. 2006;58(2):139-152.
22. Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nature Genet*. 1999;22:128-129.
23. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-Phenotype correlation in cystic fibrosis: The role of modifier genes. *Am J Med Genet*. 2002;111:88-95.
24. Blackman S, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, et al. Relative contribution of genetic and non genetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2006;131:1030-1039.
25. Dorfman R, Li W, Sun L, Lin F, Wang Y, Sandford A, et al. Modifier gene study of meconium ileus in cystic fibrosis: Statistical considerations and gene mapping results. *Hum Genet*. 2009;126:763-778.
26. Oliveira M, Reis F, Monteiro A, Penna F. Effect of meconium ileus on the clinical prognosis of patients with cystic fibrosis. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:31-38.
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.p.10-12.
28. Rojas A, Martínez R, Vásquez R, Gustincich S, Cantú J, Barrera H. Genética molecular de la fibrosis quística: el alelo $\Delta F508$ en familias mexicanas. *Bol Méd Hosp Infant Méx*. 1992;49:335-343.
29. Pámpols T. Diagnóstico prenatal de las enfermedades metabólicas hereditarias. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 3ª edición. Madrid: Editorial Ergon; 2010.p.25-42.
30. De Braekeleer M, Allard CH, Leblanc J, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in five cystic fibrosis patients homozygous for the 621+1GCTT mutation. *J Med Genet*. 1997;34:788-792.
31. Doull I. Recent advances in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2001;85:62-66.
32. Goodchild M, Watson E. Diagnostic methods and screening. En: *Cystic Fibrosis*, editores. Hodson M, Geddes D. Great Britain: Chapman & Hall; 1995.p.179-211.
33. Boczar M, Sawicka E, Zybert K. Meconium ileus in newborns with cystic fibrosis. Results of treatment in the years 2000-2014. *Dev Period Med*. 2015;1:32-40.
34. Morales-Machín A, Borjas L, Pineda L, Prieto M, González S, Gutiérrez M, et al. Diagnóstico molecular prenatal de Fibrosis Quística. Reporte de tres casos. *Invest Clin*. 1997;38(3):145-153.
35. De Braekeleer M, Allard CH, Leblanc J, Aubin G, Simard F. Is meconium ileus genetically determined or associated with a more severe evolution of cystic fibrosis? *J Med Genet*. 1998;35:262-264.
36. Lai H, Cheng Y, Cho H, Kosorok M, Farrell P. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol*. 2004;159:537-546.
37. Evans A, Fitzgerald D, McKay K. The impact of meconium ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2001;18(5):784-789.