

T
1202

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124324



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“CARACTERIZACIÓN DE GENES MODIFICADORES RELACIONADOS
CON LA EXPRESIVIDAD VARIABLE DE LA FIBROSIS QUÍSTICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. EN C. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ SALDAÑA

CODIRECTORA: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
CODIRECTORA: DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO
ASESOR: DR. DAVID CRUZ ROBLES
SINODAL: DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES
SINODAL: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

MÉXICO

DICIEMBRE, 2010

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

La realización de esta tesis se logró con el apoyo económico de CONACyT al proyecto con número de registro SALUD-2003-C01-066 y con la beca No. 89745 otorgada a la M. en C. Margarita Dolores Chávez Saldaña con matrícula 206383791.


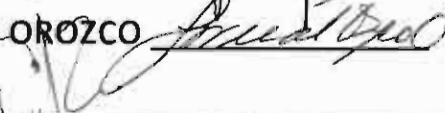



El Jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de Las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó:

M. EN C. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA

Matrícula: **206383791**

El día 8 de diciembre del año 2010.

JURADO:

CODIRECTORA:	DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ	
CODIRECTORA:	DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO	
ASESOR:	DR. DAVID CRUZ ROBLES	
SINODAL:	DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES	
SINODAL:	DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ	

Este trabajo fue realizado en la Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría S.S. bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco y de la Dra. Marisol López y la asesoría del Dr. David Cruz Robles.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud por las facilidades otorgadas durante la realización del Doctorado y por la oportunidad de presentar este proyecto.



A mis hijos Moisés Sebastián y Sofía Adoración:

Con todo mi amor y cariño, por ser el motivo de mi vida, por su profundo amor y comprensión incondicional hasta en los momentos más difíciles.

A mis Padres:

Que me dieron la vida y han estado conmigo siempre con todo su amor y entusiasmo por salir adelante.

A Guillermo Ruiz:

Por todo su amor y cariño y llegar a mi vida en el momento preciso, por compartir su aprendizaje de vida, su gran deseo y tenacidad para cada día vivirlo y disfrutarlo plenamente.

A Rosy:

Por su gran amistad, por su apoyo y confianza.

A mis hermanos Juan Ramón, Mario Alberto y Laura Rosa:

Con mucho cariño por los mejores tiempos.

A Lorena Orozco:

Por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su amistad, apoyo, confianza y cariño en mi formación profesional, hasta éste logro tan importante.

A Mónica, Marisa y Sandra:

Que con su amistad siempre he recibido su apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros:

Oscar, Julio, Edgar y Pedro por su valiosa colaboración y amistad.

A la familia Chávez Cáceres:

Por su apoyo en todos los momentos importantes en mi vida.

A Ulises Ruiz:

Por compartir los mejores y más divertidos momentos.

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes, a sus padres y su esperanza, porque sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A mis tutores Dra. Lorena Orozco, Dra. Marisol López y Dr. David Cruz, por su tiempo, dedicación, estímulo y amistad.

A mis Sinodales el Dr. Edmundo Bonilla y el Dr. Carlos Cruz por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la Coordinación del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana.

A Emiy Yokoyama, quien estuvo conmigo en todo el desarrollo de este trabajo como una gran compañera y amiga

A la Asociación Mexicana de Fibrosis quística y al Dr. José Luis Lezana, por su participación esencial en este trabajo.

Al la Dra. Sara Frías y la Dra. Bertha Molina por las facilidades en el desarrollo de la primera etapa de este trabajo.

A mis estudiantes motivo de mi constante superación.

Resumen.

Antecedentes. La fibrosis quística (FQ, OMIM 219700) es una enfermedad autosómica recesiva, multisistémica, distribuida mundialmente con una alta frecuencia en la población caucásica y una incidencia de 1 en 2,000 a 4,000 recién nacidos vivos. Se ha visto que la frecuencia y distribución varía dependiendo del origen étnico de la población. En México su incidencia es desconocida, aunque en el Instituto Nacional de Pediatría se registran aproximadamente 20 casos nuevos por año. La FQ es ocasionada por mutaciones en el gen *CFTR*, (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) y a la fecha se han reportado más de 1,800 mutaciones diferentes. El cuadro clínico clásico de este padecimiento es muy variable. Los estudios de correlación genotipo-fenotipo muestran que la función pancreática correlaciona directamente con el genotipo, mientras que el resto de las manifestaciones varían ampliamente, aún en pacientes con el mismo genotipo, incluso entre hermanos enfermos que comparten el mismo ambiente. Por ello, se postula que existen otros factores genéticos que no son los directamente responsables de la enfermedad, pero que influyen sobre su gravedad. Estudios recientes han documentado la existencia de genes modificadores en FQ como *TNF- α* , *MBL*, *α 1-AT*, *α 1-ACT*, *β -2AD*, *IL-10*, entre otros. **Objetivo.** En este trabajo nos propusimos caracterizar las mutaciones presentes en el gen *CFTR* e identificar variantes en genes modificadores que se asocian con la gravedad de las manifestaciones pulmonares en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de fibrosis quística. **Material y Métodos.** Se estudiaron un total de 230 pacientes referidos del Instituto Nacional de Pediatría, Hospital Infantil de México y de la Asociación Mexicana de FQ, de los cuales 133 fueron casos nuevos y 97 pacientes provenían de un estudio previo. Para evitar un posible sesgo al estimar las frecuencias de las mutaciones *CFTR* en nuestra población, de este último estudio se incluyeron tanto los pacientes totalmente caracterizados (n=35) como los pacientes con al menos un alelo sin caracterizar (n=62). En una primera etapa, se obtuvo el DNA de sangre periférica de cada uno de los pacientes y se genotipificaron las mutaciones en el gen *CFTR* mediante una combinación de estrategias: mutagénesis sitio-dirigida, *dot blot* reversa (Kit *CFTR/36* INNOGENETICS), polimorfismo conformacional de cadenas sencillas (SSCP) y secuenciación

directa de DNA. Posterior a la genotipificación de *CFTR* se seleccionaron 130 pacientes con manifestaciones pulmonares y se dividieron en dos grupos: leve y grave, con base en los siguientes parámetros: cultivo positivo para *Pseudomonas aeruginosa*, edad del primer cultivo para *Pseudomonas*, caída anual de la FEV* e índice de Brasfield. A estos pacientes se les realizó el análisis de 17 variantes alélicas o SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido), alelo S (T2313A), alelo Z (G4627A), -15Thr-Ala (G<A), 3'enhancer G1237A, Leu55Pro (T<C), MBL2D (Arg52Cys), MBL2B (Gly54Asp), MBL2C (Gly57Glu), MBL2G>C-221, MBL2G>C-550, IL10-G1082A, NOS3-894G/T, GSTP1-Ile105Val (A313G), ADRβ2 Arg16Gly (A46G), ADRβ2 Gln27Glu (C79G), TNFαG-308A y TNFαG-238A), de los genes: $\alpha 1$ -ACT, $\alpha 1$ -AT, MBL, IL10, NOS3, GSTP1, β -2AD y TNFα. La discriminación alélica de estos SNPs se realizó mediante el método fluorescente 5' exonucleasa (Taq-Man). El análisis bivariado se apoyó con el programa SPSS 15.0®. Se realizó prueba exacta de Fisher para variables categóricas y U de Mann-Whitney para variables numéricas. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. **Resultados.** En este trabajo se logró caracterizar el 77.7% de las mutaciones responsables de FQ en la población mexicana, incluyendo 12 que no habían sido reportadas en nuestra población (p.R334W, p.A455E, c.3120+1G>A, c.3272-26A>G, c.711+1G>T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X y p.R347P, p.D1152H y p.T1036N). Con estas mutaciones y las 34 previamente reportadas (Orozco, et al.) se alcanzó la caracterización de un total de 46 mutaciones.

Por otra parte, las frecuencias de las variantes alélicas de los SNPs analizados en este estudio fueron similares a lo reportado en la literatura para otras poblaciones. Cuando se compararon los pacientes con manifestaciones pulmonares graves y leves se observó una diferencia significativa en la edad de inicio de los síntomas ($p=0.044$), la edad de primer cultivo para *Pseudomonas* ($p=0.0001$) y la edad de fallecimiento ($p=0.009$), los cuales se relacionan con el fenotipo pulmonar grave. Así también, se observó que la variante alélica MBL2G>C-550 confiere un mayor riesgo de presentar un fenotipo pulmonar grave ($p=0.016$); en tanto que la variante Arg16Gly (A46G) del gen y ADRβ2, se muestra como una variante de protección ($p=0.029$). **Conclusiones.** Este reporte muestra que México presenta uno de los espectros mutaciones *CFTR* más amplios a nivel mundial. El

conocimiento de la distribución étnica y geográfica de las mutaciones de *CFTR* en esta población permitirá el desarrollo de métodos más eficaces para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Además, con el análisis de discriminación alélica, se observó que el genotipo homocigoto GG de la variante MBL2G>C-550, la cuál conduce a la disminución de los niveles de MBL, se asocia con infección por *Pseudomonas aeruginosa* a edades más tempranas, lo cual repercute en la gravedad y por ende, en el inicio de presentación del resto de las manifestaciones clínicas, como la edad de inicio de síntomas y la edad del diagnóstico. Por otra parte la variante ADR β 2 Arg16Gly (A46G) se detecta como una variante de protección como se reporta previamente en la literatura, ya que la gran mayoría de los pacientes clasificados como graves presentan el alelo ancestral en forma homocigota (GG) mientras que los pacientes con fenotipo pulmonar leve presentan con mayor frecuencia el genotipo de protección (AA), sugiriendo que este polimorfismo tiene un efecto positivo en la función de ADR β 2.

Discusión. Estos hallazgos sugieren que los genes *MBL2* y ADR β 2 muestran una importante influencia genética que modifica la gravedad de la enfermedad pulmonar en pacientes mexicanos con FQ.

Finalmente, la determinación de la presencia de las diferentes variantes alélicas de estos y otros genes modificares, contribuirá a incrementar nuestro entendimiento sobre la fisiopatología de la FQ, y muy posiblemente, serán de gran utilidad para predecir el fenotipo a partir del genotipo tanto de *CFTR* como de los genes modificadores de la afección pulmonar, lo que ayudará sin duda, a mejorar las estrategias de prevención de las complicaciones pulmonares y de tratamiento, mejorando así, la calidad de vida de los pacientes.

ABSTRACT

Background. The Cystic fibrosis (CF; OMIM 219700) the most common autosomal recessive disorder, globally distributed with a high frequency in the Caucasian population and an incidence of 1 in 2,000 to 4,000 live new borns. It has been seen that the frequency and distribution varies according to the ethnic origin of the population. In Mexico, its incidence is unknown, although there are around 20 new cases each year in the Instituto Nacional de Pediatría. The CF is caused by mutations in the *CFTR* gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) and to this date, there have been more that 1,800 different mutations. The classic clinical is very variable. The genotype-phenotype correlation studies show that the pancreatic function directly correlates with the genotype, while the rest of the manifestations vary widely, even in patients with the same genotype, even between sick siblings that share the same environment. For that, it is believed that other genetic factors exist that are not directly responsible for the disease, but that alter its gravity. Recent studies have documented the existence of modifier genes in CF like *TNF- α* , *MBL*, *α 1-AT*, *α 1-ACT*, *β -2AD*, *IL-10*, among others. **Objective.** In this work we proposed to characterize the present mutations in the *CFTR* gen and identify allelic variables on modifier genes that associate with the gravity of the pulmonary manifestations in Mexican patients with clinical diagnosis of the CF. **Materials and Methods.** A total of 230 referred patients whit clinical diagnosis CF of the Instituto Nacional de Pediatría, Hospital Infantil de Mexico and of the Asociación Mexicana de Fibrosis quística, of which 133 were new cases and 97 patients came from a previous study. To avoid a possible bias to estimating the *CFTR* mutation frequencies in our population, from this last study the totally characterized patients (n=35) like the patients with at least one allele without being characterized (n=62) were included. In the first stage, the DNA of periphery blood of each patient was obtained, and the mutations on the *CFTR* gen were genotyped through a combination of strategies: site-directed mutagenesis, reverse dot blot (Kit CFTR/36 INNOGENETICS), single strand conformation

polymorphism (SSCP) analysis and abnormal band shift electrophoretic patterns were direct DNA sequenced using the ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing reaction kit. Prior to the genotyping of the CFTR 140 patients with pulmonary manifestations were selected and divided in two groups: mild and severe, based on the following parameters: positive culture for *Pseudomonas aeruginosa*, age of the first culture for *Pseudomonas*, annual drop of the FEV* AND Brasfield index. The 17 allelic variables analysis or SNPs (single nucleotide polymorphism) was realized on these patients, allele S (T2313A) allele Z (G4627A), -15Thr-Ala (G<A), 3'enhancer G1237A, Leu55Pro (T<C), MBL2D (Arg52Cys), MBL2B (Gly54Asp), MBL2C (Gly57Glu), MBL2G>C-221, MBL2G>C-550, IL10-G1082A, NOS3-894G/T, GSTP1-Ile105Val (A313G), ADR β 2 Arg16Gly (A46G), ADR β 2 Gln27Glu (C79G), TNF α G-308A and TNF α G-238A), of the genes : α 1-ACT, α 1-AT, MBL, IL10, NOS3, GSTP1, β -2AD y TNF α . The allelic discrimination of these SNPs was realized through the fluorescent method 5' exonuclease (Taq-Man). The analyses bivariate was supported with the SPSS 15.0[®] program. An exact Fisher test was realized for categoric variables and U of Mann-Whitney for numeric variables. A significant value of p<0.05 was considered. **Results.** On this work it was achieved to characterize the 77.7% of the responsible mutations for CFTR on the Mexican population, including 12 that had never been reported in our population (p.R334W, p.A455E, c.3120+1G>A, c.3272-26A>G, c.711+1G>T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X y p.R347P, p.D1152H and p.T1036N). With these mutations and the 34 previously reported (Orozco, et. al.) resulting in a total of 46 different mutations detected in the Mexican population sampled. On the other hand, the frequencies of the allelic variables of the SNPs analyzed on this study were similar to the reported on the literature for other publications. When the patients with mild and serious pulmonary manifestations were compared, a significant difference on the beginning age of the symptoms (p=0.044) was observed, the age of the first culture for *Pseudomonas* (p=0.0001) and the age of death (p=0.009), of which are related to the serious pulmonary phenotype. Also, the allelic variable were observed MBL2G>C-550, confer a greater risk to present a serious pulmonary phenotype (p=0.016). While allelic variable Arg16Gly (A46G) of the ADR β 2 gen show as variant of protection (p=0.029).

Conclusions. This report shows that Mexico present on of the widest mutation spectrum *CFTR* at a global level. The knowledge of the ethnic and geographic distribution of *CFTR* mutations in this population will allow the growth of more efficient methods for the diagnostic and treatment of the sickness. Also, with the analysis of allelic discrimination, it was observed that the homozygous GG genotype of the *MBL2*G>C-550 variable, which conducts the decline of the MLB levels, it is associated with the infection by *Pseudomona aeruginosa* to early ages, which impact in the gravity and therefore, in the beginning of the presentation of the rest of the clinic manifestations, like the beginning age of symptoms and the age of the diagnostic. On the other hand, *ADRβ2* Arg16Gly (A46G) were detected like a protection variable like reported previously on literature, since the great majority of the patients classified as severe present the ancestral allele in form of homozygous (GG) while the patients with mild pulmonary phenotype present with greater frequency the protection phenotype (AA), suggesting that this polymorphism has a positive effect on the *ADRβ2* function.

Discussion. These findings suggest that the *MBL2* and *ADRβ2* genes show an important genetic influence that modifies the gravity of the pulmonary sickness on Mexican patients with CF.

Finally, the determination of the presence of different allelic variables of these and other modifier genes, will contribute to increase our understanding about the patophysiology of the CF, and maybe they will be of great use to predict the phenotype beginning with the genotype of the *CFTR* like of the modifier genes of the pulmonary affection, which without a doubt will help, to improve prevention strategies of the pulmonary complications and treatment, improving the quality of life of the patients.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 ANTECEDENTES	1
I.2 ALTERACIONES PATOLÓGICAS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	2
I.3 HERENCIA	4
I.4 DIAGNÓSTICO	5
I.5 GEN <i>CFTR</i>	5
I.6 LA PROTEÍNA <i>CFTR</i>	7
I.7 MUTACIONES EN EL GEN <i>CFTR</i>	8
I.8 BASES MOLECULARES DE LA DISFUNCIÓN DEL CANAL <i>CFTR</i>	10
I.9 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	12
I.10 GENES MODIFICADORES	13
A) BASES DE LA VARIACIÓN GENÉTICA	16
B) GEN ALFA1-ANTITRIPSINA ($\alpha 1$ -AT)	16
C) GEN ALFA1-ANTIQUIMOTRIPSINA ($\alpha 1$ -ACT)	21
D) GEN LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (<i>MBL2</i>)	22
E) GEN OXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS)	23
F) GEN GLUTATIÓN-S TRANSFERASA (<i>GST</i>)	23
G) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (<i>TNF-α</i>)	24
I.11. MEDICIONES DEL FENOTIPO PULMONAR	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
IV. OBJETIVOS	28
V. HIPÓTESIS	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO	29
2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	29
3. CRITERIOS DE SELECCIÓN	
A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES	29
B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	30
4. ESTRATEGIA GENERAL	30
5. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	
A) EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA	33
B) PURIFICACIÓN DE DNA	33
C) CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE DNA	34
D) ANÁLISIS DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIADA POR PCR	35
F) DETECCIÓN DE MUTACIONES CONOCIDAS	36
G) TAMIZAJE DEL GEN <i>CFTR</i> MEDIANTE SSCP	39

H) ANÁLISIS DE SSCP	39
I) ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN	40
J) VALORACIÓN CLÍNICA	42
K) ANÁLISIS DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA	43
6. DEFINICIONES OPERACIONALES	44
7. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	46
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
9. CONSIDERACIONES ÉTICAS	50
10. FACTIBILIDAD	50
VII. RESULTADOS	51
VIII. DISCUSIÓN	68
IX. CONCLUSIONES	78
X. BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Representación esquemática de la producción de sudor y del transporte de electrolitos en una glándula sudorípara normal	2
FIGURA 2. Localización del gen <i>CFTR</i> en el cromosoma 7	6
FIGURA 3. Representación hipotética del gen <i>FQ</i> y de la proteína <i>CFTR</i>	8
FIGURA 4. Distribución de las mutaciones en el gen <i>CFTR</i>	10
FIGURA 5. Esquematización de la contribución de <i>CFTR</i> a la variación en a enfermedad en órganos y sistemas afectados en fibrosis quística	15
FIGURA 6. DNA extraído de linfocitos de sangre periférica	34
FIGURA 7. Detección de mutaciones conocidas mediante el kit, Inno-Lipa <i>CFTR</i> 36	38
FIGURA 8. Método de fluorescencia de 5' exonucleasa (TaqMan®)	43
FIGURA 9. Frecuencia de cultivos positivos para <i>pseudomonas</i> en los diferentes grupos etarios	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Genes modificadores de fenotipo pulmonar en pacientes con FQ	14
TABLA 2. Variante alélicas de α 1-AT	17
TABLA 3. Gen α 1-AT como modificador del fenotipo pulmonar en pacientes con FQ	19
TABLA 4. Variantes del gen α 1-ACT	22
TABLA 5. Parámetros tomados en cuenta para determinar la relación de genes modificadores y enfermedad pulmonar en pacientes con fibrosis quística	24
TABLA 6. Oligonucleótidos o iniciadores utilizados para PSM	35
TABLA 7. Programa de PCR para PSM para el análisis de la mutación S549N	36
TABLA 8. Agrupación de variables	42
TABLA 9. Sistema de puntuación radiológico- escala de Brasfield	44
TABLA 10. Relación de las diferentes variables a analizar	46
TABLA 11. Características de las variables independientes	46
TABLA 12. Características de las variables dependientes.- Fenotipo pulmonar	48
TABLA 13. Otras variables a analizar	49
TABLA 14. Frecuencia de mutaciones del gen <i>CFTR</i> en 230 pacientes mexicanos	53
TABLA 15. Comparación de las mutaciones más frecuentes del gen <i>CFTR</i> en 230 pacientes mexicanos (460 cromosomas) y otras poblaciones	55
TABLA 16. Correlación genotipo-fenotipo de la mutación p.F508del	58
TABLA 17. Correlación genotipo fenotipo en pacientes suficientes e insuficientes pancreáticos	59
TABLA 18. Frecuencia de colonización de <i>Pseudomonas</i> en los diferentes grupos etarios	60
TABLA 19. Características de los 140 pacientes con fibrosis quística, de acuerdo al fenotipo pulmonar leve o grave de la función pulmonar	62
TABLA 20. Prevalencia de genotipos polimórficos de acuerdo a la gravedad del fenotipo pulmonar	63
TABLA 21. Correlación de las características clínicas de los 140 pacientes con fibrosis quística, de acuerdo al genotipo de la variante alélica MBL2-550	66
TABLA 22. Correlación de las características clínicas de los 140 pacientes con fibrosis quística, de acuerdo al genotipo de la variante alélica arg16gly del gen <i>ADRβ2</i> .	67

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES

La fibrosis quística o mucoviscidosis (FQ; OMIM #219700) es el padecimiento autosómico recesivo más frecuente en la población caucásica, donde se presenta con una incidencia de 1 en cada 2,000-4,000 recién nacidos vivos y se estima que 1 de cada 25 individuos es portador asintomático de la enfermedad¹. Este padecimiento muestra una frecuencia variable entre las poblaciones.^{1,2} En Latinoamérica la incidencia de la FQ es desconocida, sin embargo en México, la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ) estima que es aproximadamente 1 en 8,000 nacidos vivos (comunicación personal AMFQ), aunque es posible que ésta se encuentre subestimada, ya que en ocasiones la FQ se enmascara con otros padecimientos comunes en nuestro país como la desnutrición, problemas gastrointestinales y afecciones respiratorias,³⁻⁵. A consecuencia de esto, la expectativa de vida de los pacientes con FQ en nuestro país es de apenas 8 años, mientras que en los países desarrollados es alrededor de 35 años.⁶

Este padecimiento es ocasionado por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembranal e la FQ (*CFTR*, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), el cual codifica para una proteína transmembranal cuya función más importante es la de canal de cloro (Cl⁻). La pérdida de la función de esta proteína causa un defecto en el transporte de electrolitos en la membrana apical de las células epiteliales alterando la función secretoria en diferentes órganos y tejidos. Este defecto conduce a la producción de secreciones exocrinas anormalmente viscosas y conlleva a una enfermedad multisistémica y progresiva con expresividad muy variable, la FQ.⁷ En la década de los noventas, la clonación del gen responsable permitió un enorme progreso en el conocimiento de la función de la CFTR y en la caracterización de las mutaciones responsables de la enfermedad, cuya repercusión en el manejo integral del paciente con FQ no tiene precedente. Sin duda, estos avances han conducido a mejorar las estrategias preventivas, de diagnóstico y de tratamiento.

I.2. ALTERACIONES PATOLÓGICAS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La FQ tiene una expresividad muy variable y es progresiva; con disfunción de los sistemas respiratorio, digestivo y genitourinario así como de las glándulas sudoríparas.

A) Glándulas sudoríparas

El signo más consistente de la FQ es la concentración elevada de Cl^- , Na^+ y K^+ en la secreción de las glándulas sudoríparas. Gracias a los estudios de gran valor clínico, realizados en 1953 por Di Sant'Agnese, quién observó que los pacientes con FQ perdían una gran cantidad de sal a través del sudor,⁸ se desarrollo una prueba para el diagnóstico de la enfermedad: la determinación de cloruros en sudor. Estas concentraciones pueden medirse a través de un iontofotómetro después de la estimulación con pilocarpina y un valor mayor a los 60mEq/l, es sugestivo de que el paciente presenta fibrosis quística.⁵ La elevación de cloro en el sudor de los pacientes con FQ se debe a la falla en la reabsorción del ión cloro en los ductos de las glándulas sudoríparas, lo cual puede ser riesgoso en caso de pérdida salina excesiva, ya que ocasiona alcalosis hipoclorémica e hiponatémica, sobre todo en presencia de vómito, diarrea o exposición prolongada al sol⁹ (Fig. 1)

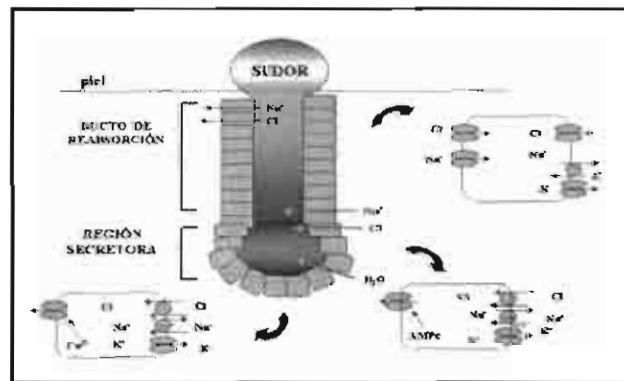


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PRODUCCIÓN DE SUDOR Y DEL TRANSPORTE DE ELECTROLITOS EN UNA GLÁNDULA SUDORÍPARA NORMAL. Se muestra el mecanismo celular del transporte de electrolitos en las células epiteliales del ducto y el tallo de la glándula sudorípara.⁹

B). Sistema respiratorio

La afección del tracto respiratorio y las infecciones persistentes son las principales causas de muerte entre la primera y la cuarta décadas de la vida,¹⁰ es la primera causa de morbilidad y es la responsable del 95% de la mortalidad de los pacientes con FQ.^{11,12} Se caracteriza por la obstrucción de las vías aéreas debida a exceso de secreciones mucosas viscosas y espesas con una mayor capacidad de adherencia que se acumulan en el lumen de las vías respiratorias que provocan un proceso inflamatorio localizado, así como infecciones crónicas y recurrentes por microorganismos oportunistas, como *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Este proceso genera bronquiectasias, que conducen a un cuadro restrictivo-obstrutivo en las vías respiratorias con hipertensión arterial pulmonar y posteriormente *cor-pulmonale* crónico.¹¹

C). Sistema Digestivo

Otras manifestaciones relevantes en FQ son las alteraciones que comprometen al tracto gastrointestinal y glándulas anexas. El 85% de los pacientes sufre de insuficiencia pancreática (IP) y el resto muestra una función pancreática suficiente (SP) para permitir una digestión normal. La clasificación de los pacientes se basa en la presencia (IP) o ausencia (SP) de esteatorrea secundaria a la mala digestión y mala absorción de las grasas. La IP puede conducir a desnutrición y cuadros carenciales de vitaminas A, D, E, K, zinc, etc.^{13,14} En contraste con la afección pulmonar, el páncreas muestra una respuesta inflamatoria muy pobre. Los hallazgos patológicos pueden ser evidentes desde el último trimestre de la gestación y conforme la dilatación de los acinos progresa, la fibrosis del páncreas se hace más aparente y en estados más avanzados el tejido pancreático es reemplazado por tejido adiposo y fibroso. De hecho, la apariencia patológica distintiva de este órgano condujo a Dorothea Anderson a denominar esta enfermedad "fibrosis quística del páncreas".¹⁵ En la segunda década de la vida la función endocrina del páncreas se encuentra afectada en el 27-42% de los pacientes, aunque sólo el 8% de los casos desarrolla diabetes insulino-dependiente. Otra alteración del aparato digestivo es la afectación hepática que se ha encontrado en el 25% en las autopsias de los pacientes con

FQ, pero sólo del 2 al 15% desarrolla cirrosis biliar.¹⁶ Aproximadamente el 20% de los recién nacidos con FQ presenta *íleo meconial* causado por el acumulo de meconio en la región distal del intestino, probablemente por insuficiencia enzimática temprana.^{2,17}

D). Tracto genitourinario

Aproximadamente el 99% de los varones con FQ presenta infertilidad por azoospermia, con alteración de las estructuras Wolffianas y la consecuente obstrucción, atrofia o ausencia de los conductos deferentes, epidídimo y vesículas seminales. Estos cambios anatómicos explican la ausencia de espermatozoides durante la eyaculación, a pesar de que en estos pacientes existe una espermatogénesis normal¹⁸. La esterilidad por azoospermia obstructiva aislada puede ser la expresión mínima de una FQ atípica, por lo que esta entidad debe considerarse en el diagnóstico diferencial de cualquier individuo con esterilidad por azoospermia obstructiva. En las mujeres con FQ la esterilidad es poco frecuente (3-5%) y puede deberse a alteraciones en el moco cervical, amenorrea o ciclos de anovulación debidos a la gravedad del cuadro clínico o al estado nutricional.¹⁸ En las pacientes fértiles la mayoría de los embarazos ha tenido un curso normal.

I. 3. HERENCIA

La FQ presenta un patrón de herencia autosómico recesivo, afecta a ambos sexos y su transmisión es horizontal, es decir generalmente sólo hay individuos afectados en una generación. En el individuo con FQ las mutaciones se encuentran en ambos alelos del gen *CFTR*; se les denomina homocigotos cuando éstos portan mutaciones idénticas y heterocigotos compuestos cuando la mutación en cada uno de los alelos es diferente.

Una pareja de portadores (un alelo afectado y uno normal: heterocigotos sanos) en cada embarazo tiene un riesgo de tener hijos afectados del 25%, hijos portadores del 50% e hijos sanos del 25%. Este padecimiento, como todos los autosómicos recesivos, se presenta con mayor frecuencia en las poblaciones con un alto índice de endogamia y consanguinidad. En una población, los portadores de una mutación en un gen recesivo siempre son más frecuentes que los afectados (principio de Hardy-Weinberg).¹⁹

I.4. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico se realiza con base en la presencia de al menos dos criterios clínicos y la evidencia de disfunción de la proteína CFTR. Los criterios clínicos se basan en la presencia de enfermedad pulmonar con colonización o infecciones persistentes y recurrentes, alteraciones gastrointestinales, síndrome de pérdida de sal, azoospermia obstructiva, así como el antecedente de un hermano con FQ. La evidencia de disfunción de la proteína se demuestra a través de una concentración elevada de cloruros en sudor y/o la identificación de mutaciones en el gen *CFTR* causantes de la enfermedad.²

I.5. GEN *CFTR*.

En 1989 se clonó el gen responsable de la FQ (*CFTR/ABCC7*, OMIM #602421) mediante las estrategias de caminata y salto cromosómico (clonación posicional), a partir de marcadores genómicos: D7515, MET y D758, estrechamente ligados al gen *CFTR* (Fig 2).^{20,21} Posteriormente se dilucidó su secuencia completa, se caracterizaron algunas mutaciones responsables de la enfermedad y se dedujo la secuencia de su producto proteico. Así, el gen *CFTR* se localiza en la banda q31 del cromosoma 7, contiene 250 kb, consta de 27 exones y se transcribe en un mRNA de 6.5kb (Figura 1).^{22,23} La identidad del gen se confirmó por la presencia de una mutación, del tipo delección, de tres pares de bases en el exón 10 (mutación $\Delta F508$) de los pacientes con FQ que no se observó en individuos normales.²⁴ La región 5' de este gen se caracteriza por un gran contenido de G-C (aproximadamente un 65%) y no presenta caja TATA, de tal manera que el promotor del gen *CFTR* es similar al de los genes con expresión constitutiva, sin embargo, la expresión del gen parece estar altamente regulada y confinada a ciertos tejidos.^{25,26} Al parecer, los niveles de expresión del gen están modulados por cAMP, PKA, PKC y esteroides de forbol. Los patrones de expresión tejido específico de *CFTR* son similares entre las diferentes especies de mamíferos, sugiriendo la presencia de elementos reguladores conservados evolutivamente, aunque se han reportado múltiples sitios de iniciación en el gen que parecen ser especie-tejido-específico.²⁷

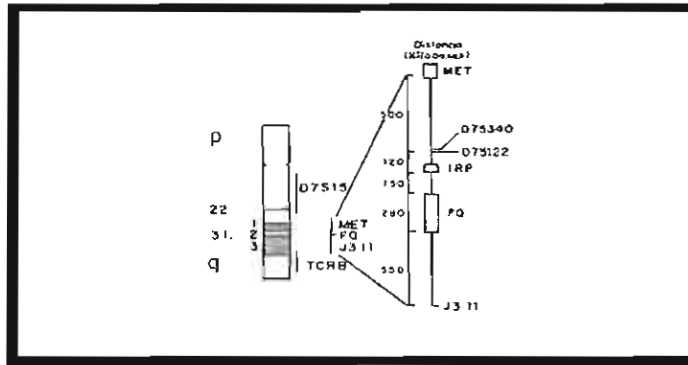


FIGURA 2. LOCALIZACIÓN DEL GEN *CFTR* EN EL CROMOSOMA 7. A la izquierda se muestra un diagrama del cromosoma 7 y a la derecha la región q31-33 donde se localiza el gen *CFTR* y los marcadores genéticos aledaños.²¹

En múltiples estudios realizados tanto en tejidos de individuos normales como de individuos con FQ se ha logrado identificar, además del mensajero completo de *CFTR*, varias moléculas de mRNA que han perdido los exones 4, 9 o 12. El transcrito más común es aquél en el que se ha perdido el exón 9 (transcrito 9') que, aunque genera un mRNA con marco de lectura abierto, no se traduce en una proteína funcional y parece no estar conservado entre las especies.²⁸ Este transcrito se encuentra en una proporción que varía de 10-92%, dependiendo de la presencia de un polimorfismo que consiste en tres variantes alélicas de un tracto de politimidinas (5T, 7T y 9T) localizado en el sitio aceptor de *splicing* en el intrón 8; por ejemplo los homocigotos 5T producen mayores niveles del mRNA sin el exón 9 (89-92%) que los homocigotos 7T (50%) y 9T (8-10%). La eficiencia del *splicing* del exón 9 parece ser tejido específica, ya que la proporción del transcrito 9' es mayor en células de los vasos deferentes, independientemente del número de timidinas.²⁹ Aunque el significado biológico de estos procesamientos alternativos aún no está claro, en algunas poblaciones se ha observado una asociación entre el alelo 5T y la ausencia bilateral de conductos deferentes (CBAVD), azoospermia obstructiva y bronquiectasias.³⁰

I.6. LA PROTEINA CFTR

El gen *CFTR* codifica para una glicoproteína transmembranal de 1,480 aminoácidos y 170 kDa. Esta proteína funciona como un canal de cloro y por su papel fisiológico se denomina proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ o CFTR (del inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).²² Se expresa en una gran variedad de tejidos especialmente: pulmón, páncreas, glándulas sudoríparas, intestino, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales y tracto reproductivo. La proteína CFTR presenta una gran homología estructural con la familia de proteínas ABC (*cassette* de unión a ATP), que son proteínas integrales de membrana que contienen dos segmentos repetidos constituidos por dos dominios transmembranales (TMD1 y TMD2) y dos dominios que interaccionan con ATP (NBD1 y NBD2). A diferencia de las otras proteínas de la familia ABC, CFTR contiene además, un dominio regulador (dominio R) (Figura 3).^{22, 25}

La proteína CFTR está anclada a la membrana citoplasmática por los dos TMDs, cada uno organizado en 6 segmentos (TM1-TM12) que atraviesan la membrana formando un poro que constituye el canal de cloro. Con base en los efectos que producen algunas mutaciones encontradas en pacientes con FQ, se ha deducido la presencia de varios residuos de aminoácidos en los dominios TMs de la proteína CFTR, los cuales son particularmente importantes para la conductancia de iones, como es el caso de los residuos de arginina y asparagina.³²

Los dominios NBDs presentan secuencias que se encuentran conservadas en las proteínas que unen e hidrolizan ATP. Interesantemente las estructuras primarias de los dos dominios NBDs sólo presentan un 29% de homología entre sus aminoácidos y parece ser que NBD1 y NBD2 contribuyen de manera diferente a la regulación del canal. Se ha propuesto que el NBD1 se fosforila después de una fosforilación parcial del dominio R, lo que permite la apertura del canal, mientras que la fosforilación completa del dominio R, conduce a la fosforilación de NBD2 causando el cierre del canal; de tal manera que el grado de fosforilación del dominio R regula la actividad del canal.^{31,32} Existen evidencias experimentales que demuestran que la CFTR, además de ser un canal de cloro

dependiente de cAMP, puede tener otras funciones, por ejemplo el transporte de bicarbonato y la regulación de otros canales endógenos de cloro y calcio.^{33,34}

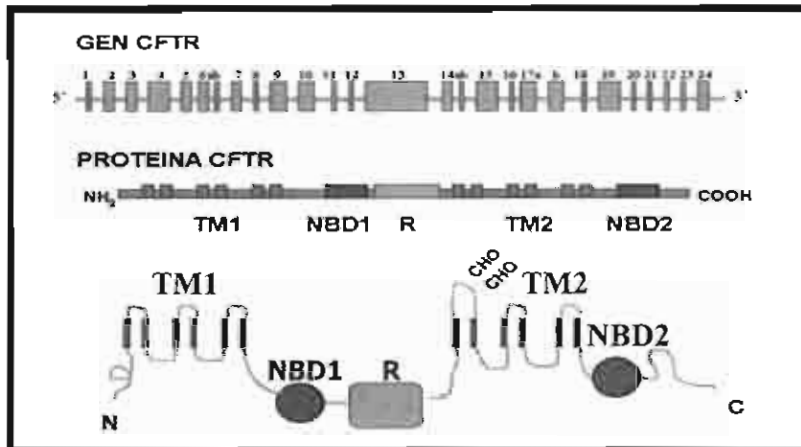


FIGURA 3. REPRESENTACIÓN HIPOTÉTICA DEL GEN FQ Y DE LA PROTEÍNA CFTR. a) Estructura del gen FQ; los rectángulos verticales representan los 27 exones del gen CFTR. b) estructura primaria de la proteína CFTR y sus dominios principales. c) Modelo de la estructura secundaria de la proteína.³⁵

I.7. MUTACIONES EN EL GEN *CFTR*

Actualmente el Consorcio Internacional de FQ (CFGAC - www.genet.sickkids.on.ca) ha reportado más de 1,800 mutaciones diferentes y alrededor de 200 polimorfismos en el gen *CFTR* (Figura 4). Su distribución en el gen no parece ser al azar, ya que se ha detectado una alta frecuencia de mutaciones en ciertos exones como el 4, 7, 11, 17b y 20.³⁶

En general, la naturaleza de las mutaciones es diversa: cerca de la mitad son de sentido erróneo y el resto son mutaciones sin sentido, pequeñas deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura, mutaciones que afectan los sitios de *splicing*, grandes deleciones y otras clasificadas como complejas (Figura 4).³⁶ Adicionalmente ciertas mutaciones puntuales en realidad son polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que potencialmente podrían afectar la expresión de *CFTR*. Algunos de ellos interfieren con las

señales de *splicing* mientras que otros ocurren en regiones codificadoras del gen; de estos últimos, alrededor del 50% dan lugar a sustituciones de aminoácidos.³⁷⁻³⁹

Se ha observado una gran heterogeneidad en el espectro de las mutaciones del gen *CFTR*, particularmente en el Sur de Europa y América Latina. La mutación más frecuente es la $\Delta F508$, una delección de tres pares de bases en el exón 10 que elimina el codón para la fenilalanina en la posición 508 de la proteína. Esta mutación se ha detectado en el 66% de todos los cromosomas FQ, sin embargo, en las diferentes poblaciones su frecuencia varía entre el 17.9% y 87.5% de los alelos afectados.⁴⁰

Estudios realizados en diferentes regiones de México han mostrado una frecuencia de la mutación $\Delta F508$ de 45% en la región Norte, 34.4% en el Occidente y 40.7% en la región Centro.⁴¹⁻⁴³ Estas frecuencias son significativamente menores a las reportadas a nivel mundial (66%), en población caucásica (77%) y española (52.7%),^{36,40} pero muy similares a las observadas en poblaciones latinas de Estados Unidos (46%), Brasil (47.7%), Colombia (35.4%) y Venezuela (29.6%).⁴⁰ Las otras mutaciones en el gen *CFTR* son poco comunes, y aunque algunas son frecuentes en ciertas poblaciones, la mayoría se presentan en menos del 1% de los cromosomas FQ. Inclusive, la segunda mutación más común (G542X), se detecta sólo en el 2.4% de los alelos *CFTR* afectados, aún cuando en México, Colombia, España y las Islas Canarias, se ha detectado en una proporción más alta (6.1, 6.3, 8 y 25% respectivamente).⁴⁴⁻⁴⁶ Es importante señalar que la detección de las mutaciones en el gen *CFTR* es sumamente compleja en poblaciones con una alta heterogeneidad genética. En la población mexicana el 51% de los genes son de origen amerindio, el 45% europeos y el resto africanos (3.7%).^{47,48} De hecho, nuestra población es una de las que ha mostrado mayor número de mutaciones,⁴³ incluso siete de ellas sólo se han documentado en México: 2055del9→A, 1924del7, W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG y 297-1G→A.⁴³ Así, mientras que en la población mexicana apenas se identificaron cerca del 75% de todos los cromosomas afectados (con la identificación de 34 mutaciones),⁴³ en otras poblaciones como la caucásica, la búsqueda de las 5 mutaciones más frecuentes ($\Delta F508$, G542X, N1303K, R553X y G551D), logra la detección

de hasta 95%. Por lo que se observa que la complejidad del espectro de las mutaciones observada en nuestros pacientes demuestra la gran heterogeneidad de nuestra población.

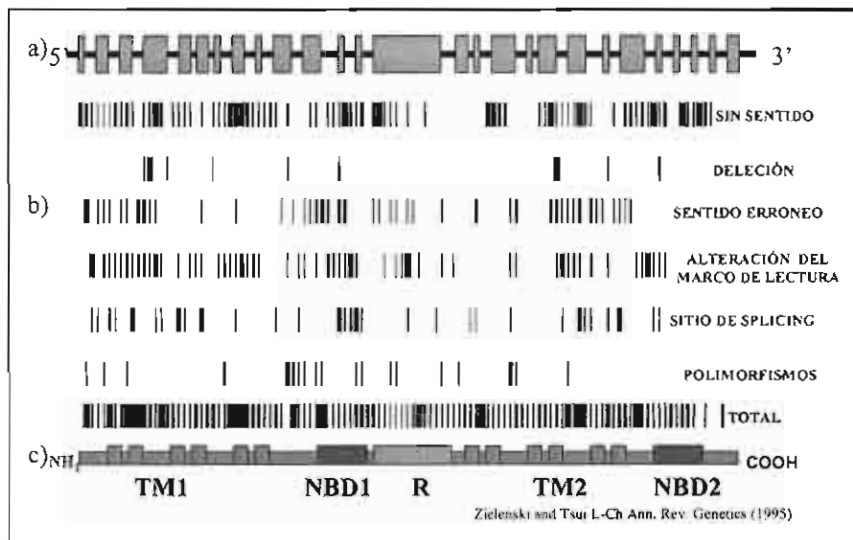


FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *CFTR*. a) Gen FQ. b) Las líneas verticales representan cada una de las mutaciones caracterizadas. c) Dominios de la proteína.²⁸

I.8. BASES MOLECULARES DE LA DISFUNCIÓN DEL CANAL CFTR

Con la finalidad de entender más acerca de la fisiopatología de la FQ, las mutaciones se han clasificado en cinco clases de acuerdo con la alteración que se genera en la proteína.

Clase I: mutaciones que bloquean la síntesis de la proteína. Cerca de la mitad de las mutaciones en el gen *CFTR* que pertenecen a este grupo conducen a la formación de proteínas truncadas y no funcionales. Entre ellas se encuentran aquellas que generan codones de terminación (18%), corrimiento del marco de lectura (22%) y las que afectan el *splicing* del mRNA (8%). Las dos primeras generalmente causan ausencia total de la proteína.²⁸

Clase II: mutaciones que afectan el procesamiento postraduccional. La biosíntesis de la proteína CFTR requiere pasos de maduración complejos, por lo que algunas mutaciones, como la $\Delta F508$, afectan este proceso y generan péptidos anormales que quedan atrapados en el retículo endoplásmico (RE) donde son degradados por el sistema ubiquitina-proteosoma (vida media de 0.5h).^{49,50}

Clase III: mutaciones que afectan la regulación del canal de cloro. Las mutaciones clasificadas en esta categoría son aquellas que generan proteínas que parecen estar correctamente localizadas en la membrana apical, pero que no funcionan adecuadamente como un canal iónico. Algunas de estas mutantes afectan los dominios NBDs y el dominio R (Figura 4).⁵¹ El grado de alteración puede variar desde una leve reducción de la actividad del canal (mutaciones G551S, G1244E y G1349D) hasta la pérdida grave de su función (mutaciones G551D y S1255P).⁵²

Clase IV: mutaciones que afectan la conductancia del canal de cloro. Estas mutaciones se localizan en regiones del gen que codifican para algunos de los segmentos TMs de la proteína;⁵³ por ejemplo la R117H en la región TM2, la G314E y G314Q en TM5 y la R334W, R347P y R347H en TM6. En estos casos aunque la regulación del canal es adecuada, su conductancia es anormal. Estudios recientes mostraron que algunas mutaciones del dominio R también pertenecen a este grupo.⁵⁴

Clase V: mutaciones que causan reducción en la síntesis de la proteína. Las mutaciones de esta clase incluyen aquellas localizadas en el promotor y que reducen la transcripción y las mutaciones puntuales que conducen a un *splicing* erróneo o a sustituciones de aminoácidos como la P574H y la A455E. Las proteínas mutantes tienen

una actividad normal tanto en regulación como en conductancia, sin embargo su procesamiento postraduccional es ineficiente.²⁸

I.9. CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO.

Existe una clara variabilidad en la presencia o gravedad de cada una de las manifestaciones clínicas de la FQ y parece ser que esto, en parte, es la consecuencia del gran espectro de las mutaciones en el gen *CFTR*.⁵⁵ El análisis de la funcionalidad de algunas mutaciones expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, reveló que la corriente de cloro generada se encuentra reducida en el siguiente orden: silvestre > mutante con función residual > mutante no funcional,⁵⁶ lo cual sugiere que existe correlación entre el genotipo y la función del canal de cloro. Diversos estudios han tratado de encontrar las características clínicas que comparten los pacientes con FQ que portan un mismo genotipo (correlación fenotipo-genotipo) y han logrado clasificar a las mutaciones en graves (clase I, II, o III) y leves (clases IV o V), donde las primeras ocupan aproximadamente el 92% de todas las mutaciones.^{57,58}

De todos los síntomas analizados, sólo la función pancreática correlaciona directamente con el genotipo de los pacientes. En general, los pacientes con IP son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones graves, mientras que los pacientes con SP son homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones con función residual. Como en todas las enfermedades recesivas, las mutaciones leves son dominantes sobre las graves.⁵⁷⁻⁶⁰

I.10. GENES MODIFICADORES.

Con excepción de la función pancreática, el resto de las manifestaciones clínicas de la FQ varía incluso entre hermanos que comparten el mismo ambiente. Así, la presencia de las diferentes mutaciones en el gen *CFTR* explica sólo parcialmente la heterogeneidad clínica de la FQ, por lo que se ha propuesto la participación de genes modificadores, que aunque no participan en la etiología de la enfermedad, tienen un gran impacto en la gravedad de las manifestaciones clínicas (Figura 5).^{61,62} Existen evidencias de que estos genes contienen polimorfismos, principalmente SNPs, cuyas variantes alélicas son las responsables de la diferencia en la expresividad de la gravedad entre pacientes con un mismo genotipo *CFTR*.

Un *locus* modificador es un rasgo genético, distinto al que produce la enfermedad, que promueve una diferencia cuantitativa o cualitativa en cualquier aspecto del fenotipo de la enfermedad. En FQ, basándose en la secuencia y la variabilidad de la gravedad de las manifestaciones pulmonares, los genes modificadores incluyen canales de iones de cloro no-*CFTR*, así como genes involucrados en la defensa del huésped, inflamación, reparación epitelial, producción de mucina y respuesta de la vía aérea.⁶³

En esta enfermedad la gravedad de la afectación pulmonar y la susceptibilidad a infecciones por microorganismos oportunistas puede estar modificada por diversos genes que participan en la respuesta inmune, tales como: HLA Clase II, α_1 -antitripsina (α_1 -AT), α_1 -antiquimotripsina (α_1 -ACT), lectina de unión a manosa (*MBL*), factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- α*), algunas citocinas y sus receptores, glutatión S-trasnsferasa (*GST-M1*), factor de crecimiento transformante β -1 (*TGF- β 1*), óxido nítrico sintetasa (*NOS3*),

receptor β_2 adrenérgico (*ADR β_2*), entre otros (TABLA 1).^{64,65} Por otro lado, el *ileo meconial* ocurre sólo en pacientes con IP, sin embargo se ha documentado que la presencia de esta manifestación se asocia a un *locus* del cromosoma 19 (19q13.2),⁶⁶ aunque aún no se han logrado caracterizar genes modificadores en esta región. Otra de las manifestaciones clínicas que parece estar influenciada por genes modificadores es la afectación hepática, donde se ha observado que ciertos SNPs del gen *MBL2* confieren un mayor riesgo de presentar problemas hepáticos graves.⁶⁷

TABLA 1. Genes modificadores de fenotipo pulmonar en pacientes con FQ.

Gen candidato	Efecto en el fenotipo pulmonar de FQ	Referencia
<i>A1-AT</i>	Mutaciones que producen deficiencia de leve a moderada de α 1-AT, parecen estar asociados con una enfermedad pulmonar menos grave cuando se compara con aquellos pacientes FQ con actividad normal.	68
<i>A1-ACT</i>	Las concentraciones reducidas en plasma de α 1-ACT resultan de dos mutaciones puntuales Leu55Pro y Pro229Ala; ambas están asociadas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.	68-70
<i>HLA CLASE II</i>	Se ha detectado una asociación significativa con los alelos DR4 y DR7, con atopia y con la colonización crónica por <i>Pseudomonas</i> .	71
<i>MBL2</i>	Se ha observado una relación entre los niveles de la lectina de unión a manosa (MBL) y la severidad pulmonar, al igual que riesgo a infección por <i>Burkholderia cepacia</i> .	72

CITOCINAS	La respuesta inflamatoria mediada por citocinas en FQ se caracteriza por la disminución de IL-10, e incrementos en la producción de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8.	65
-----------	--	----

Así, la heterogeneidad clínica observada en los pacientes con FQ parece ser la consecuencia de la interacción entre alelos *CFTR* mutados, un gran número de variantes en otros genes y el ambiente (figura 5).

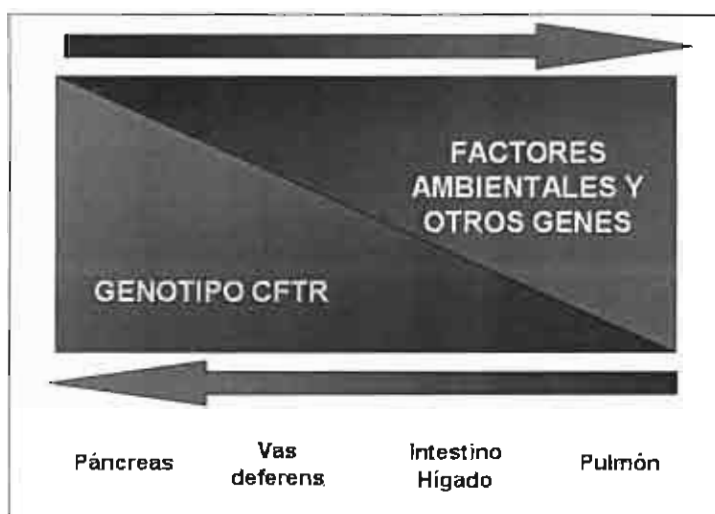


FIGURA 5. ESQUEMATIZACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE *CFTR* A LA VARIACIÓN EN LA ENFERMEDAD EN ÓRGANOS Y SISTEMAS AFECTADOS EN FIBROSIS QUÍSTICA.⁶¹

A) BASES DE LA VARIACIÓN GENÉTICA.

La secuencia de DNA de dos individuos no relacionados es aproximadamente 99.9% idéntico. El 0.1% restante contiene variaciones (polimorfismos) que pueden influir en la susceptibilidad o gravedad de una enfermedad, así como afectar la respuesta a fármacos. El término de polimorfismo se refiere a variantes genéticas comunes en la población general que ocurren con una frecuencia mayor al 1%. En éstas se incluyen variantes como deleciones o inserciones multi-base (polimorfismo inserción deleción), variaciones de repetidos (repetidos cortos en tándem) o con el cambio de un solo nucleótido (polimorfismo de un solo nucleótido o SNP), que recientemente han recibido una mayor atención por su alta prevalencia en el genoma y su implicación en diversas patologías.³⁴

B) GEN ALFA1-ANTITRIPSINA (α 1-AT).

En la vía aérea, el proceso de inflamación crónica implica la producción en exceso de proteasas destructivas, como la elastasa del neutrófilo (NE). La NE produce daño pulmonar al hidrolizar todas las proteínas importantes del tejido conectivo que cubren la matriz aérea y pulmonar.³⁴ Su exceso ha sido implicado en el daño pulmonar en pacientes fumadores y con FQ. En estos últimos, el resultado es el incremento de las secreciones y su interferencia con la eliminación de patógenos, particularmente de *Pseudomonas*.³⁴ En individuos sanos, la acción de la NE es controlada por la α 1-antitripsina (α 1-AT), una glucoproteína de fase aguda altamente polimórfica secretada por hepatocitos y monocitos, cuya función es inhibir la proteasa de serina que se une a la NE y por consiguiente, inhibe la ruptura del tejido elástico pulmonar. Se han reportado en pacientes con FQ niveles normales a elevados de α 1-AT, durante los cuadros de infecciones pulmonares.⁷³

Los pacientes con la forma hereditaria de deficiencia de α 1-AT están en riesgo de enfisema, por lo que se ha postulado que los pacientes con FQ que coexisten con

deficiencia de α 1-AT podrían tener un fenotipo pulmonar más grave. Sin embargo, los resultados han sido inconclusos ya que el tamaño de muestra es pequeño.

a. GEN α 1-AT Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.

El gen de α 1-AT está localizado en 14q24.3-q32.1 y está constituido por 10.4kb. Contiene 5 exones, de los cuales el exón 1, la porción 5' del exón 2 y la porción 3' del exón 5 son regiones no codificantes.⁷⁴ En este gen se han descrito más de 70 variantes alélicas, pero las más importantes clínicamente son los alelos S (Glu264Val) y Z (Glu342Lys), los cuales se encuentran en el 12% de la población del Reino Unido. Con base en el un análisis de haplotipos, se ha indicado que el alelo Z tiene un solo origen en población caucásica. Debido al gradiente de norte a sur observado en las frecuencias de Europa (5% en escandinavos, 4% en británicos, 1-2% en europeos del sur) se ha propuesto que el ancestro común se originó en el norte de Europa hace más de 6,000 años. Además, existe evidencia de que en la población blanca de Estados Unidos la frecuencia de heterocigotos es de 3% para este alelo, similar a lo detectado en población europea. Curiosamente la distribución de la variante S se observa de manera inversa, ya que se ha encontrado una frecuencia mayor en el sur (10%) y menor en el norte (5%) de Europa. En forma general, se considera que 1 de cada 10 individuos de origen europeo, es heterocigoto para cualquiera de estos alelos.⁷⁵ Así mismo, en Estados Unidos,⁶⁴ se realizó un estudio en el centro de investigación y tratamiento para pacientes con FQ en la Universidad de Carolina del Norte, donde se encontró una frecuencia del 8% para el alelo S y del 4% para el alelo Z (Tabla 2).

TABLA 2. Variante alélicas de α 1-AT

Variante alélica	Frecuencias	Genotipos	Efecto
Alelo S (Glu264Val)	8%*	MS-SS	↓ α 1-AT
Alelo Z (Glu342Lys)	4%*	MZ-ZZ	↓ α 1-AT
3' <i>Enhancer</i> (1237G>A)	Alelo A: 12%**	GA-AA	↑ α 1-AT

Existe otra variante puntual (1237G>A) en este gen, encontrada en un *enhancer* de la región no codificante hacia 3', que se asocia con una mejor función pulmonar en paciente con FQ. Esta variante tiene una frecuencia aproximada de 12.4% en un estudio de población general irlandesa.⁷⁷ En México, e incluso en población Latinoamericana, la frecuencia de las variantes alélicas de este gen, se desconocen.

b. EFECTOS EN LA PROTEÍNA EN DIFERENTES ESTUDIOS.

La actividad de la proteína α 1-AT, en presencia del alelo S (MS o SS) y Z (MZ o ZZ) está disminuida, encontrándose concentraciones plasmáticas del 60% y del 10%, respectivamente.⁶⁵ Döring y cols. (1994) fueron de los primeros que observaron una deficiencia de la proteína α 1-AT en pacientes con FQ que presentan infecciones a edades tempranas y de forma crónica por *Pseudomona aeruginosa* (Psa), aunque la función pulmonar no se alteró de forma significativa.⁷⁸ En controversia, en 1998 Mahadeva y cols. mostraron que aquellos pacientes con FQ y deficiencia de α 1-AT tenían mejor función pulmonar y su asociación con infección temprana por Psa no fue significativa, por lo que sugerían que estas variantes del gen α 1-AT eran un factor protector.⁷⁹ Además, estos mismos autores, posteriormente demostraron que las frecuencias de los alelos S y Z en pacientes con FQ fallecidos por complicación pulmonar y pacientes transplantados eran similares a aquellas reportadas previamente por Drumm y cols. en pacientes vivos con FQ.⁸⁰ Así mismo, Frangolias y cols. no encontraron relación entre la deficiencia de α 1-AT con la función pulmonar, edad de primer cuadro de infección por Psa y trasplante o muerte.⁷³

Un grupo de Irlanda reportó 16 pacientes (de 134) con una variante puntual (Alelo A - 1237G>A) localizada en un *enhancer* localizado hacia 3' del gen, que produce incremento de niveles séricos de α 1-AT y por lo tanto, se asocia a un mejor pronóstico en

los pacientes, ^{63, 68} aunque estudios posteriores no han encontrado una diferencia significativa entre esta variante puntual y su nivel plasmático en pacientes con FQ.^{77, 79} En la tabla 3 se resume la función de la proteína en relación con las variantes alélicas encontradas en los diferentes estudios.

TABLA 3. Gen α 1-AT como modificador del fenotipo pulmonar en pacientes con FQ

Gen	Variante s	Efecto de la variante	Grupos comparados (n)	Asociación	Referencia
A1-AT	S, Z	*Disminución de α 1-AT sérica	MM(137) vs. MS(12) y MM (137) vs. MZ(9).	NS para FEV1 (Prospectivo).	78
Casos: MS, MZ, SS, ZZ. Testigo: MM Alelos de riesgo			MM(102) vs. MS(9), MZ(8).	Inicio temprano de infección por Psa.	78
			MM (127) vs. MS(16), SS(1), MZ(3).	FEV1 elevado para MS, SS y MZ. NS para Psa.	79
			Pacientes fallecidos por complicación pulmonar (72) vs. población general	No incremento significativo en las frecuencias de alelos S y Z.	80
			MM(616) vs. MS(69),	NS entre deficiencia de α 1-AT y función	73

			SS(13), MZ(18).	pulmonar, edad de primer cuadro de Psa, transplante o muerte.	
A1-AT	G1237A	**Incremento en α 1-AT	GG(108) vs. GA, AA(16)	Menor progresión pulmonar, menor exacerbación infecciones, menor colonización Psa.	68
Casos: GA, AA Testigo: GG Alelo de protección			GG(122) vs. GA(20), AA(1)	NS para función pulmonar ni para edad de inicio de Psa.	79
			GG(614) vs. GA(95), AA(7)	Estado pancreático (suficiente vs. Insuficiente).	79
			GG(283) vs. GA(35), AA(2)	Mejoría de %predFEV1	77

Mahadeva y cols. no encontraron un efecto significativo de la variante menor en este enhancer de α 1-AT en 21 de 150 pacientes con FQ para enfermedad pulmonar grave y edad del primer cuadro de infección por Psa y de igual forma, Frangolias DD y cols. concluyeron que ésta no predice la gravedad de la enfermedad pulmonar y que tampoco está asociado con un resultado clínico más grave o edad de inicio de infección por Psa.^{40,46}

Sin embargo, en un estudio reciente Courtney y cols., encontraron que los pacientes con el alelo A de la variante presentaron una mejor función pulmonar (genotipo AA/AG: %predFEV1 70.8 +3.9 (media+ES); genotipo GG: %predFEV1 62.0 +1.4; con un valor de p = 0.037), aunque tampoco encontraron diferencia significativa de los niveles

séricos de α 1-AT entre el genotipo AA/AG (1.64 +0.06 g/l) y el genotipo GG (1.82 +0.08 g/l).⁷⁷

Dado los hallazgos controversiales aportados por estos estudios, es importante definir en nuestra población la relación de estas variantes con la presencia o ausencia de manifestaciones pulmonares en los pacientes con FQ.

C) GEN ALFA1-ANTIQUIMOTRIPSINA (α 1-ACT).

La α 1-antiquimotripsina (α 1-ACT) es una glucoproteína de cadena única que pertenece a la familia de los inhibidores de proteasas de serina, secretada por monocitos, hepatocitos y astrocitos. Es un inhibidor de catepsina G, la cual es otra proteasa de serina con actividad bactericida sobre gram-negativos. También inhibe a los mastocitos y está implicada en la modulación de funciones celulares e inmunológicas. Su deficiencia se ha asociado con enfermedad hepática e incremento del volumen residual en pruebas de función pulmonar.⁸⁰

En el humano, el nivel sérico normal de α 1-ACT es cerca de una décima parte de la concentración de α 1-AT, con la cual comparte homología en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos. Su deficiencia hereditaria es rara, estimándose en una frecuencia de 3 casos por cada 1,000 individuos de población europea y se asocia a disfunción hepática y pulmonar en población sueca.⁸¹

a. Gen α 1-ACT, sus variantes alélicas y efecto funcional sobre la proteína.

El gen de α 1-ACT se localiza en 14q31-q32.3, el cual se sobrelapa con el gen de α 1-AT en una región de 220kb, constituyendo un cluster génico. Las variante alélicas del gen α 1-ACT resultan de cambios de un solo nucleótido y por lo general producen disminución de su concentración plasmática.⁷⁰

La presencia de las variante -15Thr en el péptido señal de la proteína α 1-ACT disminuye la concentración de α 1-ACT en relación con -15Ala, lo cual se asocia con enfermedad pulmonar más grave. Los cambios de Leu55Pro reducen los niveles plasmáticos en heterocigotos hasta en un 59% de lo normal. Este se ha asociado con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).^{70,81} Las frecuencias alélicas se encuentran en la tabla 4.

TABLA 4. Variantes del gen α 1-ACT.

Variantes alélica	Frecuencias	Genotipos	Efecto
-15Thr>Ala G>A	*Thr: 0.43 Ala: 0.53	Ala/Ala vs. Ala/Thr y Thr/Thr	↓ α 1-ACT (Ala/Thr y Thr/Thr)
Leu55Pro T>C	Leu:?: Pro:?	TC-CC	↓ α 1-ACT

Existen pocos estudios sobre variantes alélicas en el gen de α 1-ACT en pacientes con fibrosis quística. Uno de estos es el de Mahadeva y cols.⁷⁹ quienes encontraron que el genotipo Ala/Ala del péptido señal del mismo gen, se asocia con un mejor porcentaje predictivo de la FEV1 ($p=0.004$) y por lo tanto, con una mejor función pulmonar.^{79, 80}

D) LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (*MBL2*)

La presencia de variantes alélicas en este gen se encuentra asociadas con mal pronóstico y muerte temprana de los pacientes con FQ; algunos polimorfismos en regiones reguladoras y estructurales del gen, conducen a una marcada variación en los niveles de MBL en suero²⁶. En este gen se han descrito SNPs en los codones 54 (*MBL2-B*), 57 (*MBL2-C*), 52 (*MBL2-D*) que colectivamente son llamados MBL2-0. En individuos heterocigotos para estas variantes, se ha encontrado 5 a 10 veces menos cantidad de las subunidades *MBL2* en circulación. Además, también existen polimorfismos localizados en el promotor de

MBL2 que pueden afectar la transcripción y desregular significativamente las concentraciones en suero de MBL.⁷²

E) OXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS): La producción de *NO* está catalizada por una familia de tres formas especializadas de *NOS*: *NOS*-neural (*NOS1*), *NOS* inducible (*NOS 2*) y *NOS* endotelial (*NOS3*), aunque la concentración relativa de cada isoforma en humanos no está bien caracterizada. Datos recientes sugieren que existe una asociación entre la concentración de *NO* en el aire exhalado (FENO) en sujetos con FQ y una variable de repetidos intrónicos en el gen polimórfico *NOS1*. De esta variable se han identificado 8 alelos diferentes que van de 9 a 16 repetidos del segmento AAT (> a 12). Sujetos con 8 repetidos de AAT demostraron concentraciones significativamente menores de FENO cuando se compararon con aquellos que tenían menos repetidos (< a 12).^{64,71}

F) GLUTATIÓN-S TRANSFERASA (*GST*):

Las glutatión S-transferasas pertenecen a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido ó GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. En mamíferos estas isoenzimas (*GSTs*) existen como homodímeros o como heterodímeros, tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero. Se clasifican en siete familias (alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta y zeta) que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico. Una de las isoformas de esta enzima está representada por un gen en el cromosoma 1 con 2 alelos activos, *GSTM1-A* y *GSTM1-B*, y un alelo no funcional, *GSTM1-O*. Polimorfismos como Ile105Val, en la Glutatión S transferasa P1 (*GSP1*), otro gen antioxidante de esta familia de genes, ha sido asociado con susceptibilidad a asma. Hay un estudio en donde reportan interacción entre *GSTM1* y *GSTP1*, aunque no es muy claro a cual de estos genes se puede atribuir la respuesta a la afección pulmonar.⁶⁴

G) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (*TNF- α*)

Se han descrito dos polimorfismos del gen *TNF- α* (6p21): *TNF1* (-238) y *TNF2* (-308) que se han relacionado con una elevada transcripción del gen. *TNF2* se ha asociado también con un elevado riesgo de ciertos desórdenes inflamatorios e infecciosos, incluyendo bronquitis crónica. Se ha descrito que pacientes con FQ que portan al menos una copia de *TNF2* presentan una enfermedad pulmonar más grave. Se ha discutido que la asociación de los alelos *TNF2* con enfermedad pulmonar más grave podría resultar del desequilibrio de ligamiento que existe entre el *locus TNF* con genes cercanos al complejo mayor de histocompatibilidad.⁷¹

I.11. MEDICIONES DEL FENOTIPO PULMONAR.

No existe una clasificación a nivel mundial para definir la gravedad del fenotipo pulmonar, sin embargo, diferentes autores han tomado en cuenta los parámetros que se muestran en la tabla 5 para definir a la enfermedad pulmonar en pacientes con fibrosis quística.

TABLA 5. Parámetros tomados en cuenta para determinar la relación de genes modificadores y enfermedad pulmonar en pacientes con fibrosis quística.

Referencia	FEV1	FVC	Psa	Brasfield	Recaídas
Döring G et al., 1994. <i>Pediatr Pulm.</i>	+	+	+	-	-
Mahadeva R et al., 1998. <i>Eur Resp J.</i>	+	-	+	+	-
Frangolias DD et al., 2003. <i>Am J Resp Cell Mol Biol</i>	+	+	+	+	+
Henry MT et al., 2001. <i>Eur J Hum</i>	+	-	+	+	+

Courtney JM et al., 2006. Pediatr Pulm.	+	+	+	+	-
Mahadeva R et al., 2001. Thorax.	+	-	+	+	-

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México no se conoce la incidencia de la FQ, aunque la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ) estima que es de aproximadamente 1 en 8,000 nacidos vivos. En el Instituto Nacional de Pediatría son atendidos aproximadamente 25 casos nuevos por año de toda la República Mexicana. El diagnóstico se realiza clínicamente, con el apoyo de la determinación de cloro en sudor y actualmente la sobrevida de los pacientes con FQ es de aproximadamente 10 años. Aunque no existe mucha información sobre el padecimiento en otras Instituciones del país, los obtenidos en el INP son una muestra de la situación de la enfermedad en México. No es posible esperar una sobre vida mayor en nuestros pacientes, si no se establece el diagnóstico y el tratamiento de manera oportuna, por esta razón es urgente reducir la brecha respecto a los países desarrollados, en los cuales la sobrevida de los pacientes con FQ es de 35 años.

A la fecha se han logrado grandes avances para entender las bases moleculares de la FQ. A pesar que desde hace varios años se está realizando el análisis molecular de detección de mutaciones en el gen *CFTR* en familias mexicanas con fibrosis quística, todavía existe un número importante de pacientes con mutaciones aún no identificadas. Esto puede ser debido a que la población mexicana es una de las que tiene más amplio espectro de mutaciones *CFTR*, lo que ha hecho la detección de mutaciones *CFTR* sumamente laboriosa y complicada. En estudios realizados en el norte, centro y occidente de México el análisis de las mutaciones más comunes (p.F508del, p.G542X, p.N1303K, p.R553X and p.G551D) ha permitido la caracterización de sólo el 50% de los cromosomas

afectados, mientras que en la población caucásica, la búsqueda de estas mismas mutaciones puede alcanzar la detección de hasta el 98% de los alelos afectados.

Así mismo, se sabe poco sobre la naturaleza de las mutaciones que afectan al gen en nuestra población y la forma en que influyen en las manifestaciones de este padecimiento. Los primeros resultados publicados en 1993 por nuestro grupo, mostraron una frecuencia de la mutación $\Delta F508$ de 39%, considerablemente menor a la reportada a nivel mundial e incluso a la de España. En un segundo análisis la mutación G542X, se encontró en el 7.2% de los cromosomas afectados, lo cual es similar a lo descrito en España, 8%. En el año 2000 se lograron caracterizar el 74.6% de las mutaciones que afectan 97 familias con FQ no relacionadas mediante el manejo de nuevas estrategias de búsqueda de mutaciones desconocidas como: polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), heteroduplex múltiple (mHET) y secuenciación automática, identificando así, 34 mutaciones diferentes, siete de ellas fueron mutaciones nuevas en el gen *CFTR*, exclusivas de la población mexicana: 2055del9→A, 1924del7, W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG y 297-1G→A. Desde entonces sabemos que el nivel de detección de las mutaciones FQ en la población mexicana es muy bajo en relación a lo observado en otras poblaciones con una frecuencia relativamente alta de la mutación $\Delta F508$, como las del norte de Europa. Este estudio y otros realizados por otros autores han demostrado que los pacientes mexicanos con FQ tienen un espectro de mutaciones diferente al descrito en otras poblaciones, probablemente como resultado de heterogeneidad de la población mexicana que resulta principalmente de la mezcla entre poblaciones amerindias y caucásicas del sur de Europa. Así, la caracterización de las mutaciones responsables de la FQ en poblaciones con una amplia heterogeneidad genética como la nuestra es indispensable para establecer estrategias de diagnóstico, detección de portadores y diagnóstico prenatal en pacientes con FQ.

Por otro lado, los estudios de correlación del genotipo con el fenotipo de los pacientes con FQ muestran que la función pancreática es la única manifestación que presenta una correlación con el genotipo *CFTR*, a diferencia de la función pulmonar donde no se ha encontrado una clara correlación. En particular, algunos pacientes con el mismo

genotipo *CFTR* muestran diferente evolución del daño pulmonar. Así mismo resulta importante destacar que la mayoría de las familias incluidas han sido referidas por la asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ), en donde se está llevando al cabo un estudio para evaluar la tasa anual de deterioro pulmonar del paciente con FQ. Resultados preliminares de esta evaluación muestran que el género, el íleo meconial, la IP, la colonización por Pa y la presencia de mutaciones graves en *CFTR* se relacionan con un mal pronóstico, pero no explican toda la variabilidad del cuadro pulmonar. Por esto, se ha sugerido la presencia de otros factores genéticos, conocidos ahora como genes modificadores, que influyen en la gravedad de las manifestaciones pulmonares.

El identificar y caracterizar las mutaciones *CFTR* presentes en nuestros pacientes y definir el genotipo de diferentes variantes alélicas de diversos genes potencialmente modificadores de la FQ, que se asocian con la gravedad de la afección pulmonar en nuestros pacientes, permitirá entender mejor la fisiopatología de la enfermedad, establecer un pronóstico de la evolución clínica y diseñar estrategias de tratamientos individualizados con base en el genotipo de los pacientes. Es muy posible que en un futuro se logre mejorar la calidad y la sobrevivencia del paciente mexicano con FQ.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe relación entre la presencia de polimorfismos en los genes modificadores y la gravedad del fenotipo pulmonar en pacientes mexicanos con el mismo genotipo *CFTR* de fibrosis quística?

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar las mutaciones presentes en el gen *CFTR* e identificar si SNPs en genes modificadores que se asocian con la gravedad de las manifestaciones pulmonares en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de fibrosis quística.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el tipo y la frecuencia de las mutaciones *CFTR* en los pacientes con FQ diagnosticados en el INP, HIM y la AMFQ.
2. Realizar la correlación del genotipo *CFTR* con el fenotipo.
3. Caracterizar las variantes alélicas de los genes ($\alpha 1$ -*ACT*, $\alpha 1$ -*AT*, *MBL*, *IL10*, *NOS3*, *GSTP1*, β -*2AD* y *TNF α*) involucrados en el fenotipo pulmonar leve y grave de los pacientes con FQ atendidos en la AMFQ y en el INP y describir su frecuencia.
4. Determinar si existe asociación entre las variantes alélicas de los genes $\alpha 1$ -*ACT*, $\alpha 1$ -*AT*, *MBL*, *IL10*, *NOS3*, *GSTP1*, β -*2AD* y *TNF α* y la gravedad del fenotipo pulmonar.

V. HIPÓTESIS

Las mutaciones en el gen *CFTR* y las variantes alélicas en genes modificadores se asocian con la gravedad de las manifestaciones pulmonares en los pacientes mexicanos con fibrosis quística.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El estudio fue de tipo **observacional** ya que no se aplicó ningún tipo de intervención a los pacientes; se compararon 2 grupos de cada variante alélica de los diferentes genes modificadores, por lo que se considera **comparativo**; sólo se realizó una medición en el tiempo y por lo tanto es **transversal**; es **ambispectivo** ya que se obtuvieron los datos clínicos y las muestras de DNA tanto en los nuevos casos de fibrosis quística que acudieron a las instituciones mencionadas como en la revisión de casos y expedientes; y finalmente es **traslacional**, ya que se realizó un estudio tanto del área clínica como del área básica.

2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Población objetivo.

Pacientes mexicanos con diagnóstico de fibrosis quística.

Población elegible.

Pacientes con diagnóstico de fibrosis quística que hayan acudido o que acudan a recibir atención al Instituto Nacional de Pediatría, al Hospital Infantil de México, o a la Asociación Mexicana de FQ, a partir de julio de 1991 al año 2006.

3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES

En el estudio se incluyeron 230 pacientes no relacionados, con diagnóstico clínico de FQ, de estos pacientes 133 fueron casos nuevos y 97 pacientes correspondieron a un reporte previo (35 totalmente caracterizados y 62 con al menos un alelo sin caracterizar)⁴³. Los pacientes totalmente previamente caracterizados fueron incluidos en este trabajo con la finalidad de evitar un posible sesgo en la estimación de las frecuencias

de las mutaciones *CFTR* en nuestra población. Los pacientes fueron captados de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ), de la Consulta Externa del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y del Hospital Infantil de México y todos ellos son de origen mestizo mexicanos.

El diagnóstico se basó en la presencia de al menos de 2 de los siguientes parámetros: (1) cuantificación de cloruros en sudor mayor a los 60 mEq/l,⁸² (2) afección pulmonar grave con infecciones recurrentes y persistentes especialmente por *Pseudomona aeruginosa*, y (3) insuficiencia pancreática, valorando la concentración de grasa en heces (>7g/d).⁸³ El estudio se realizó con autorización y de acuerdo como lo estipulado en los Comités de Investigación y Ética del INP, con la firma de una carta de consentimiento informado de los padres y en su caso de asentimiento de los pacientes.

B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Se excluyeron temporalmente pacientes transfundidos en los últimos tres meses.

También fueron excluidos pacientes con padecimientos infecto-contagiosos como SIDA y hepatitis, por razones de seguridad de los estudiantes y personal de laboratorio.

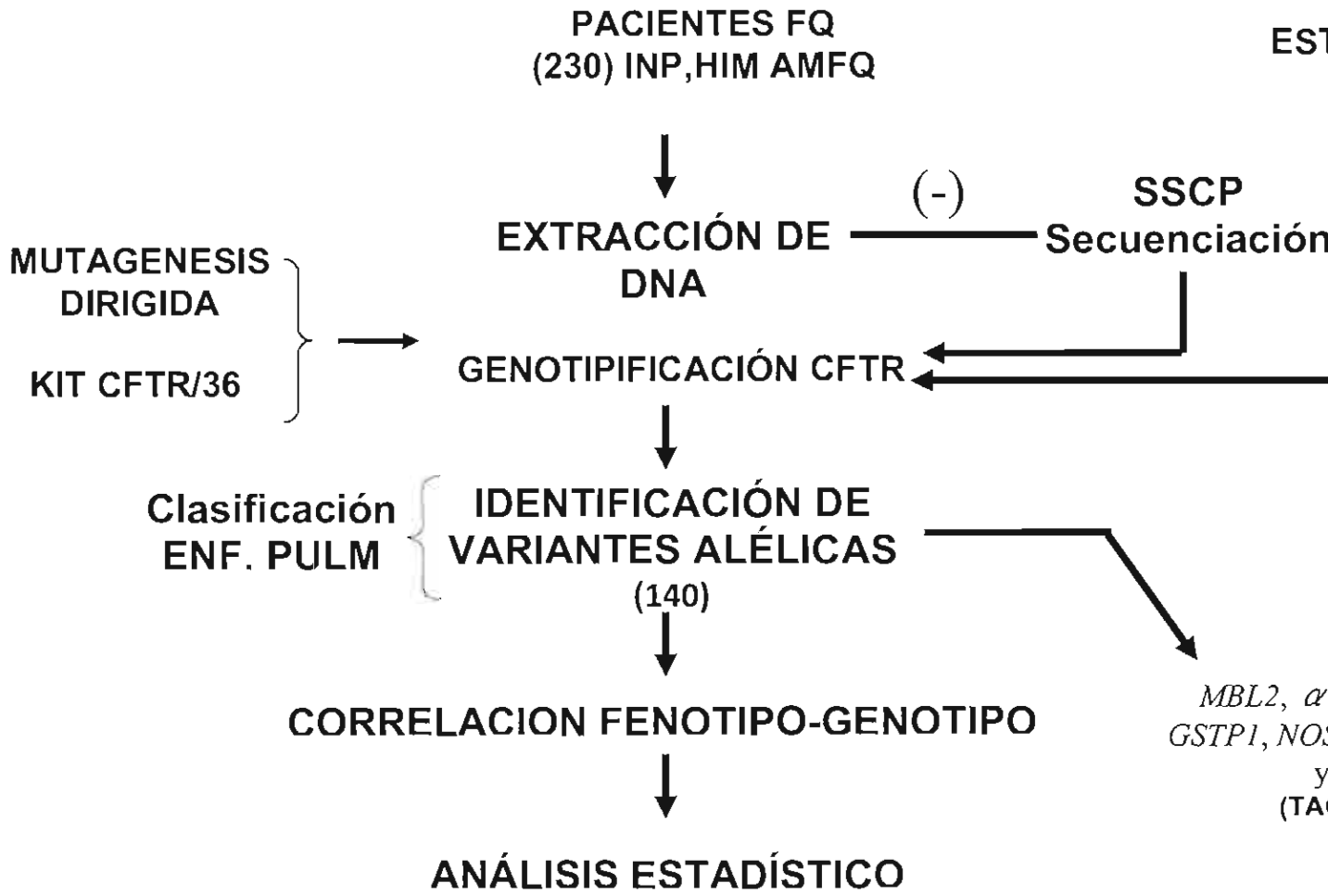
4. ESTRATEGIA GENERAL

Se incluyeron 230 casos índices no relacionados con diagnóstico clínico de FQ. El diagnóstico se estableció en base a la historia clínica y la determinación de cloruros en sudor por arriba de los 60 mEq/L. Los pacientes en los cuales no se confirmó el diagnóstico de fibrosis quística fueron excluidos del estudio. El estudio molecular partió de la obtención de DNA de sangre periférica y el tamizaje de mutaciones en el gen *CFTR*, mediante una combinación de estrategias: mutagénesis sitio-dirigida, *dot blot* reversa (Kit *CFTR/36 INNOGENETICS*), polimorfismo conformacional de cadenas sencillas (SSCP) y secuenciación directa de DNA. Posterior a la genotipificación de *CFTR*, se seleccionaron

140 pacientes, con los cuales contábamos con cantidad suficiente de DNA, tenían al menos un alelo caracterizado y presentaban antecedentes pulmonares, a ellos se les realizó el análisis de 17 variantes alélicas o SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) (alelo S (T2313A), alelo Z (G4627A), -15Thr-Ala (G<A), 3'enhancer G1237A, Leu55Pro (T<C), MBL2D (Arg52Cys), MBL2B (Gly54Asp), MBL2C (Gly57Glu), MBL2G>C-221, MBL2G>C-550, IL10-G1082A, NOS3-894G/T, GSTP1-Ile105Val (A313G), ADR β 2 Arg16Gly (A46G), ADR β 2 Gln27Glu (C79G), TNF α G-308A y TNF α G-238A)), de los genes: α 1-*ACT*, α 1-*AT*, *MBL*, *IL10*, *NOS3*, *GSTP1*, β -*2AD* y *TNF α* , mediante el método de discriminación alélica por el método de fluorescencia 5' exonucleasa (TaqMan). El análisis multivariado se apoyó con el programa SPSS 11.0[®]. Se realizó prueba exacta de Fisher para variables categóricas y U de Mann-Whitney para variables numéricas. Se consideró significativo un valor de p< 0.05

ALGORITMO METODOLOGICO

EST



5. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

A) EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA

Se tomaron 7ml de sangre periférica de los pacientes con FQ, usando EDTA como anticoagulante, se centrifugó la muestra por 20 minutos a 3,000 rpm, se tomó la capa de linfocitos, se colocó en 6 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se desecharon el plasma y los eritrocitos, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 6 ml de solución de lisis de glóbulos rojos, RCBL (ver anexo), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm, este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina. Finalmente se resuspendió el botón de linfocitos en 333 μ l de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de linfocitos (WCBL, ver anexo) y se incubó toda la noche a 42°C para obtener un lisado de linfocitos.⁸⁴

B) PURIFICACIÓN DE DNA

Se agregaron 2 ml de fenol al lisado obtenido en el paso anterior, se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm, después la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior. Posteriormente a la fase superior se le agregó 1 ml de fenol y 1 ml de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3,000 rpm, nuevamente la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior. La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se agregó 2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. En un tubo limpio se agregaron 90 μ l de NaCl 1 M y 3 ml de etanol absoluto a -20°C a la fase superior.⁸⁴

Se agitó suavemente hasta que se precipitó el DNA, el cual se obtuvo con una pipeta Pasteur sellada, se secó por 10 minutos a temperatura ambiente se enjuagó en etanol al 70% a -20°C, se dejó secar a temperatura ambiente una vez más y se resuspendió en 200 μ l de agua destilada estéril. Se conservó a 4°C hasta su uso

C) CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE DNA

Para la cuantificación del DNA se diluyó 1 μl de la muestra de DNA en 250 μl de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda de (λ) de 260 nm. El dato obtenido se sustituyó en la siguiente fórmula para calcular la concentración de DNA presente a en cada muestra.⁸⁵

Donde:

D.O₂₆₀ = Densidad óptica a una λ de 260 nm

F = Constante equivalente a 0.05

$$(D.O)(F)(DIL) = [\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad (50 \text{ ng de DNA} = 1 \text{ D.O}_{260})$$

DIL = Volumen de dilución equivalente a 250 μl

Se confirmó la integridad del DNA por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio y se corrió a 100 volts por 30 minutos (Figura 6)

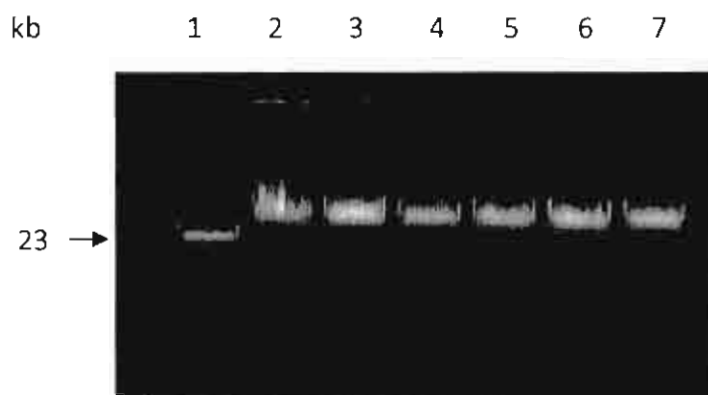


FIGURA 6. DNA EXTRAÍDO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA. Gel de agarosa al 0.8% muestra la presencia de DNA íntegro. Carril 1: contiene el marcador de peso molecular λ -Hind III; carriles 2-7 muestran la presencia de DNA íntegro.

La pureza del DNA se calculó por medio del cociente obtenido de las lecturas 230/260 y 280/260 nm.

D). ANÁLISIS DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIADA POR PCR (PSM)

La técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM; del inglés *PCR-mediated site-directed mutagenesis*) se utilizó para detectar la mutación S549N en todos los pacientes. Para llevar a cabo esta metodología se sintetizaron un par de oligonucleótidos o primers con un cambio de una sola base en uno de ellos, que flanquean los sitios en donde se localiza la mutación antes mencionadas. Así, el producto amplificado por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) lleva una mutación puntual intencional que crea un sitio de restricción para una enzima específica en el alelo normal o en el alelo mutado, lo cual permite identificar uno del otro para cada mutación.⁸⁶

Después de la digestión de los productos amplificados, los fragmentos se corrieron en geles de acrilamida al 10% y así se logró distinguir el alelo mutado del normal. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados, los tamaños del amplificado y la enzima de restricción utilizada se describen en la tabla 6.

TABLA 6. OLIGONUCLEÓTIDOS O INICIADORES UTILIZADOS PARA PSM.

MUTACIÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES O PRIMERS	ENZIMA QUE CORTA	TAMAÑO DEL PRODUCTO AMPLIFICADO	ALELO QUE ES CORTADO	FRAGMENTOS GENERADOS POR LA DIGESTION
S549N	F*: GCACCATTAAAGAAAATATGA T R: CATTACAGTAGCTTACCCA	DdeI	425 pb	Silvestre	238-174pb

- La mutación se localiza en el exón 11.

La técnica de amplificación por PCR para la mutación S549N se realizó en un termociclador (Perkin Elmer; Gene Amp 9600); la mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25 μ l, la cual estaba compuesta de 2U de Taq polimerasa, 2.5 μ l de buffer 10X, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de NTP's y 100 ng de cada par de oligonucleótidos, las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 7.

TABLA 7. PROGRAMA DE PCR PARA PSM PARA EL ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN S549N

Temperatur	Tiempo	Ciclos
a		
a) 94°C	2 min.	1
a) 94°C	20 seg.	
b) 55°C	20 seg.	30
c) 72°C	30 seg.	
a) 94°C	12 seg.	
b) 65°C	20 seg.	1
c) 72°C	7 min.	

F. DETECCIÓN DE MUTACIONES CONOCIDAS

Con la intención de mejorar la tasa de detección de las mutaciones FQ se utilizó el método *dot blot* reversa para detección de 36 mutaciones del gen *CFTR* y los tres alelos (5T, 7T y 9T) del polimorfismo Tn del intrón 8 (Kit Inno-LiPa *CFTR*/36, INNOGENETICS, NV, Bruaels, Belgium).⁸⁷ En resumen la muestra de DNA de cada uno de los pacientes se sometió a amplificación múltiple del gen *CFTR* completo, utilizando los cebadores marcados con biotina, posteriormente a la amplificación, el DNA de doble cadena se desnaturalizó y se hibridó con sondas normales (silvestres) y sondas mutadas (con las secuencias de las 36 alteraciones a detectar) las cuales estaban contenidas en tiras de nitrocelulosa. Después

de la hibridación se agregó fosfatasa alcalina y estreptoavidina que se enlazan a los híbridos biotinilados entre la sonda y el amplicón. Finalmente se incubó con una solución de sustrato (cromógeno) para dar como resultado la formación de un color púrpura en los casos en los que se detecta una reacción positiva (detección de una alteración). La reacción se detuvo con un lavado para el análisis del patrón de reactividad de las sondas. (Figura 7).

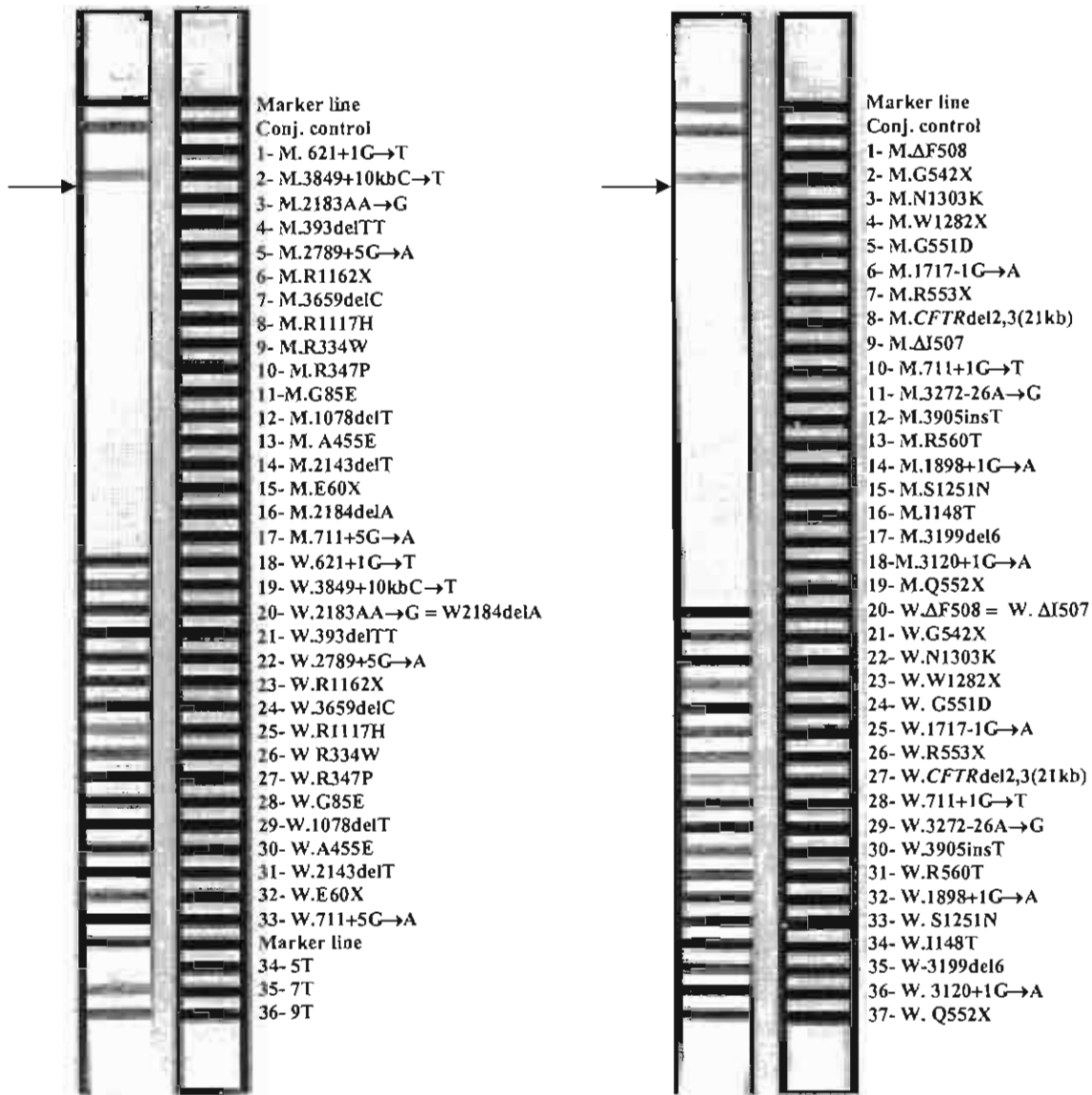


Figura 7.- Detección de mutaciones conocidas mediante el kit, Inno-Lipa CFTR36 assay, un ejemplo de un paciente heterocigoto compuesto; con un genotipo *CFTR* p.G542X/c.3949+10kbC>T. El paciente muestra los polimorfismos 7T y 9T.

G) TAMIZAJE DEL GEN CFTR MEDIANTE SSCP

Para identificar las mutaciones *CFTR* que no fueron detectadas mediante el *Kit Inno-Lipa CFTR36 assay*, se analizaron a los pacientes que presentaban al menos un alelo sin caracterizar, realizando un tamizaje del gen *CFTR* por el método de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP; del inglés *single strand conformation polymorphisms*),⁸⁸ analizando en una matriz de MDE.

Se estandarizaron las condiciones de amplificación para los exones donde se han reportado mutaciones con mayor frecuencia: 4, 7, 10, 11, 13, 17b, 20, 21 incluido el intrón 19 y otros 1, 2, 6^a, 16, 17^a y 18 del gen *CFTR*, los cuales fueron amplificados con el DNA genómico de los pacientes utilizando los oligonucleótidos descritos previamente,⁸⁹ mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un ciclador térmico Gen-Amp 7200, siguiendo un programa de 30 ciclos, cada uno de los cuales consta de tres pasos esenciales: desnaturalización a 94°C durante 20", alineación a 55°C durante 20" y extensión a 72°C por 30". La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 10 µl, la cual estaba compuesta de 2U de Taq polimerasa, 2.5 µl de buffer 10X, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de NTP's 100 ng de cada par de oligonucleótidos correspondientes a cada exón más 100 ng de DNA. El tamaño de los amplificados se analizó por electroforesis a 85 volts en un gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio, verificando los tamaños específicos de cada exón, de acuerdo a la secuencia del gen de FQ reportada.²³

H) ANÁLISIS DE SSCP

La técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) está basada en el principio de que las moléculas de DNA de cadena sencilla adquieren estructuras secundarias de acuerdo a su secuencia específica, por lo tanto las moléculas que se distinguen en al menos la sustitución de una sola base en un fragmento de DNA de 1,000

pares de bases pueden adoptar conformaciones secundarias diferentes y presentar un patrón electroforético distinto en geles de poliacrilamida. Por lo tanto esta metodología permite identificar una mutación puntual que se corrobora por el método de secuenciación.⁹⁰

Para el SSCP se amplificó cada uno de los exones arriba citados del gen FQ por PCR como se describe en la sección anterior, excepto que en este caso el producto amplificado se marcó radioactivamente agregando 1 μ Ci de α P³² dATP a la mezcla de reacción, se tomaron 2 μ l de ésta y se llevaron a un volumen final de 10 μ l con una solución que contiene 95% de formamida, 5 mM de EDTA, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de xilénol, esta mezcla se sometió a desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, y posteriormente se le dió un choque térmico en un baño de hielo para mantener separadas las cadenas de DNA. Para finalizar, las muestras se corrieron en un gel no desnaturalizante con una matriz de acrilamida/sacarosa (6% y 10% respectivamente) con un *crosslinking* de 2.5. Finalmente los geles se secaron a 80°C durante 90 minutos y se expusieron en una placa de autorradiografía.⁸⁸

I) ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN

Las muestras que presentaron cambios electroforéticos o un patrón anormal de corrimiento por SSCP, fueron secuenciadas directamente de los productos de PCR por el método de Sanger.^{90,91}

a) PCR pre-secuenciación.

El DNA de una sola cadena fue obtenido por PCR asimétrico (empleando sólo uno de los oligonucleótidos forward o reverse (103) en donde la mezcla de reacción contenía 3 μ l del fragmento amplificado de la PCR purificado, 2 μ l del oligonucleótidos específico (antisentido o sentido) (100ng/ μ l diluido 1/16), 2 μ l de amortiguador *sequenase*, 2 μ l de enzima *termosequenase* y 11 μ l de agua desionizada para llevar a un

volumen final de 20µl. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 3% para visualizar los amplificados.

b) Purificación de fragmentos de PCR

Los amplificados se purificaron usando microcolumnas de Sephadex del kit QIAquick Spin PCR de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 20µl del producto amplificado es purificado adicionando 5 volúmenes de amortiguador PB a cada tubo del producto amplificado de PCR mezclado con vortex y se continuó con el protocolo proporcionado por el proveedor para el Kit "purification PCR Spin QIAquick"; el DNA se eluyó adicionando 30µl de agua desionizada y se centrifugó por 60 seg, el producto eluido se usó en la reacción de secuenciación como un templado de DNA.

Se colocaron 4.5µl de mezcla de reacción de secuenciación a 4 tubos de 0.6µl de cada dideoxinucleótido (ddG, ddT, ddA y ddC), se mezclaron correctamente y se empleó el siguiente programa para el termociclador 9600 de Perkin Elmer:

Segmento1	Desnaturalización	95°C/30 seg	} X 30 Ciclos
	Alineación	55°C/30 seg	
	Extensión	72°C/45 seg	

Después del PCR se agregaron 4µl de una solución que contenía: formamida, formaldehido azul de bromofenol y xilencianol. Las muestras se llevaron a una temperatura de 94°C por 5 minutos, inmediatamente después se sembraron 3µl de cada reacción en un gel desnaturalizante de poliacrilamida/Urea al 40%, el cual se corrió a 2000V durante 1.5, 3.0 o 4.5 h dependiendo del fragmento amplificado. El gel se secó al vacío a 80°C y se expuso a una película de autorradiografía durante 24-48h.

Es importante hacer notar que algunas muestras se secuenciaron empleando un secuenciador automático de Perkin Elmer modelo 310, versión 3.0, ABI-CE1, con el kit correspondiente ABI-PRISM y dideoxinucleótidos con marca fluorescente.

La nomenclatura de las mutaciones se basó en la recomendada por Human Genome Variation Society (HGVS).⁹²

J) VALORACIÓN CLÍNICA.

La historia clínica completa de cada paciente se obtuvo de manera prospectiva o retrospectiva, incluyendo datos demográficos, manifestaciones clínicas, edad de inicio, edad al diagnóstico, talla, peso y árbol genealógico. La historia clínica se realizó en la primera visita, en caso de ser nuevos casos. Los datos clínicos de pacientes diagnosticados previamente y cuyo DNA se tienen en el Banco de DNA del INP, se buscaron en expedientes. Los valores de espirometría y el índice de Brasfield se determinaron por parte del Servicio de Neumología de cada institución participante.

De acuerdo a la edad del primer cultivo por *Pseudomonas*, caída anual de la FEV1 medida por espirometría, cultivo de aspiración bronquial al ingreso positivo para *Pseudomonas*, así como determinación de índice de Brasfield (radiológico), se midió el fenotipo pulmonar de cada paciente. Con base a estos datos, se formaron 2 grupos tomando en cuenta la mediana de cada variable.

- Edad del primer cultivo por Psa – Md = 6.0
1 (riesgo) = ≤ 6.0 y 0 (no riesgo) = > 6.1
- Caída anual de la FEV1– Md =4.2
1 = ≥ 4.2 y 0 = < 4.19
- Cultivo de aspiración bronquial al ingreso.
1 = positivo para *Pseudomonas* y 0 = negativo para *Pseudomonas*.
- Determinación de índice de Brasfield – Md =17.0
1 = ≤ 17.0 y 0 = > 17.1

TABLA 8. Agrupación de variables.

CAÍDA FEV1	EDAD CULT PSEUD	BRASFIELD >17.0 PUNTOS		BRASFIELD >17.1 PUNTOS	
		PSEUDOM (+)	PSEUDOM (-)	PSEUDOM (+)	PSEUDOM (-)
>4.2	< 6 años	19	9	9	8
	> 6.1 años	9	3	8	8
< 4.19	< 6 años	5	7	7	10
	> 6.1 años	12	7	6	13

- a. Grupo 1 o leve: pacientes con menos de 2 parámetros de riesgo (verde, amarillo y azul).

- b. Grupo 2 o grave: pacientes con tres o más parámetros de riesgo (morado y rosa).

K) ANÁLISIS DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA.

MÉTODO FLUORESCENTE DE 5' EXONUCLEASA (TAQMAN®)

Después de la genotipificación del gen *CFTR* se seleccionaron 140 pacientes, con los cuales contábamos con cantidad suficiente de DNA, tenían al menos un alelo caracterizado y presentaban antecedentes pulmonares, a ellos se les realizó el análisis de 17 variantes alélicas o SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) (alelo S (T2313A), alelo Z (G4627A), -15Thr-Ala (G<A), 3'enhancer G1237A, Leu55Pro (T<C), MBL2D (Arg52Cys), MBL2B (Gly54Asp), MBL2C (Gly57Glu), MBL2G>C-221, MBL2G>C-550, IL10-G1082A, NOS3-894G/T, GSTP1-Ile105Val (A313G), ADRβ2 Arg16Gly (A46G), ADRβ2 Gln27Glu (C79G), TNFαG-308A y TNFαG-238A)), de los genes: $\alpha 1$ -ACT, $\alpha 1$ -AT, MBL, IL10, NOS3, GSTP1, β -2AD y TNF α . Estos SNPs se analizaron mediante la técnica fluorescente 5' exonucleasa TaqMan® (Applied Biosystems). Esta técnica se utilizó para el análisis de polimorfismos con cambios en una base (SNPs). Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2, además ambas sondas tuvieron en el extremo 3' un *quencher* (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia (figura 8).

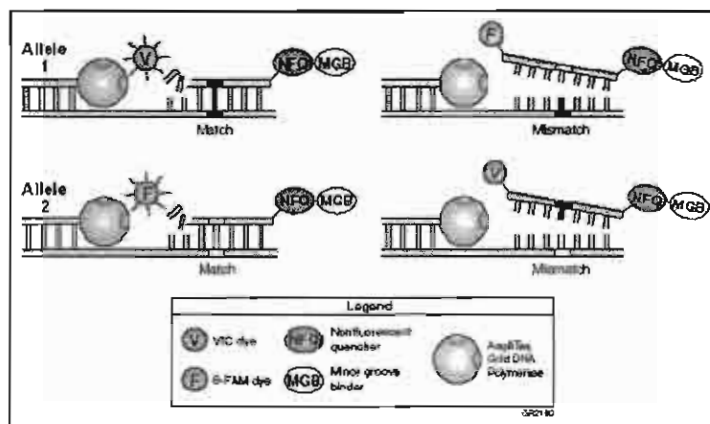


FIGURA 8. Método de fluorescencia de 5' exonucleasa (TaqMan®) para determinación de polimorfismos por discriminación alélica en pacientes con fibrosis quística (tomado de Applied Biosystems)

Durante la reacción de PCR los oligonucleótidos hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda de TaqMan también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la enzima

AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del *quencher*, de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente será capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro en base al tipo de fluorescencia emitida. Los SNPs se caracterizaron y analizaron en forma independiente.

6. DEFINICIONES OPERACIONALES.

1. Diagnóstico clínico de FQ: Se consideran aquellos que cuenten con dos de los 3 siguientes parámetros clínicos (a) determinación de cloruros en sudor > 60mEq/L; (b) cuantificación de grasa en heces (>7g/d) y coeficiente de absorción de grasa <84%; (c) por lo menos un cultivo positivo para *Psa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*.²
2. Fenotipo pulmonar: Se realizó con base en las medianas, dicotomizando las variables de la edad del primer cultivo por *Psa*, caída anual de la FEV1 tomadas por espirometría, así como la determinación de Índice de Brasfield (radiológico).
3. Caída anual de la FEV1 tomada por espirometría: Se determinó mediante la diferencia de la determinación más alta y la determinación más baja de FEV1 dividida entre el número de años durante los cuales se realizaron dichas determinaciones.

TABLA 9. SISTEMA DE PUNTUACIÓN RADIOLÓGICO – ESCALA DE BRASFIELD

<u># categoría, nombre</u>	<u>Definición</u>	<u>Puntuación</u>
<u>I, Atropamiento de aire</u>	<u>Sobredistención pulmonar generalizada demostrado por depresión del diafragma y/o xifosis torácica.</u>	0= ausente; 1-4= incremento de gravedad (4, mas grave).
<u>II, Marcas lineares</u>	<u>Líneas de densidad debida a bronquios prominentes demostrado por densidad de líneas paralelas, algunas ramificadas o como densidades circulares “de principio-fin” con engrosamiento de la pared bronquial.</u>	0= ausente; 1-4= incremento de gravedad (4, mas grave).
<u>III, Lesiones nodulares quísticas</u>	<u>Densidades circulares pequeñas discretas (0.5cm o mayor) con centros radioopacos o radiolúcidos.</u>	0= ausente; 1, 2, 3 o 4= involucro de 1, 2, 3 o 4 cuadantes.
<u>IV, Lesiones grandes</u>	<u>Atelectasias lobares o segmentales o</u>	0= ausente; 3=

	<u>consolidación; incluye neumonía aguda.</u>	segmental o atelectasia lobar; 5= múltiples atelectasias.
<u>V, Gravedad general</u>	<u>Impresión de la gravedad general o cambios en la radiografía.</u>	0= normal;1-4= gravedad incrementada de alteraciones; 5= solo el crecimiento cardiaco o neumotórax.
<u>Puntuación total posible</u>		25 puntos

4. Escala de Brasfield: Es un sistema de puntuación mediante la evaluación de radiografías de tórax realizado por un estudio colaborativo de 16 centros de pacientes con fibrosis quística, en donde se determinó un grado moderadamente alto de reproducibilidad entre observadores (coeficiente de correlación de 0.93 – 0.95). Una vez sumados los puntos de acuerdo a la tabla anterior, se le restan a la puntuación al posible (25 puntos). La puntuación de 25 indica una radiografía limpia y puntuaciones más bajas indican afección pulmonar.⁹³
5. Variante alélica o polimorfismo: Cambios genéticos en la población general, ocurriendo en más del 1% de la población y que no son capaces de producir enfermedad por si solos.⁶³
6. Paciente mestizo-mexicano: Nacido en México con al menos 2 generaciones (padres y abuelos) igualmente nacidos en México, por rama paterna y materna y sin antecedentes extranjeros.⁴³
7. Genotipificación y estratificación de CFTR: Se caracterizaron ambos alelos del gen CFTR para posteriormente crear dos grupos como se menciona en metodología.²⁸

7. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES.

TABLA 10. RELACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES VARIABLES A ANALIZAR.

GENOTIPO CFTR 1. Leve: al menos un alelo considerado como leve. 2. Grave: ambos alelos considerados como graves	VARIANTES ALÉLICAS DE GENES MODIFICAD 1 ALELO 1 / ALELO 1	-Pulmón	-FENOTIPO PULMONAR: <ul style="list-style-type: none"> • Edad del primer cultivo por <i>Psa</i> • Caída anual de la fev1 • Escala de Brasfield
	2 ALELO 1/ALELO 2		-EDAD DE INICIO DE SÍNTOMAS.
	3 ALELO 2/ ALELO 2		-EDAD AL DIAGNÓSTICO.
	OTROS GENES MODIFICADORES	-Páncreas -Intestino - <i>Vas deferens</i>	-ESTADO ACTUAL. -CULTIVO POR PSA.

(A) Variables independientes.

1. Mutación del gen *CFTR*: se define como cambio en la secuencia del DNA, cuyo resultado es el defecto de su proteína y la consecuente enfermedad llamada FQ. Se dicotomizarán a los pacientes como se refiere en la metodología.
2. Variantes alélicas de los genes modificadores: Son cambios en la secuencia de dicho gen que produce cambios en la expresión de la proteína y la subsecuente expresividad variable en el fenotipo pulmonar. Para su análisis se crearán 2 grupos (dicotómico y nominal) en donde el grupo 1 tendrá aquellos con ambos alelos silvestres (1/1), el grupo 2 serán los heterocigotos (1/2) y homocigotos con el cambio de un solo nucleótido (SNP) en su secuencia (2/2).

TABLA 11. CARACTERÍSTICAS DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	VALORES
Mutación de <i>CFTR</i>	Nominal/dicotómica	1=mutgrave/margrave 2=mutgrave/mutleve
Variantes alélicas de los genes mdificadores	Nominal/dicotómica	1=1/1 2=1/2 y 2/2

(B) Variables dependientes.

1. Fenotipo pulmonar: Se definirá con base en tres de los siguientes parámetros; edad del primer cultivo por *Psa*, caída anual de la FEV1 y determinación de índice de Brasfield como se menciona en la metodología.
2. Edad de inicio de síntomas: dato obtenido al interrogatorio referente al momento en el que el paciente inicia con síntomas de la enfermedad de base, fibrosis quística, ya sea de tipo gastrointestinal o respiratorio.
3. Edad al diagnóstico de FQ: momento en el que el paciente cumple con los criterios clínicos y de laboratorio para el diagnóstico de fibrosis quística.²
4. Estado actual: se refiere a la situación del paciente en el momento del interrogatorio y de la toma de muestra, o en el momento de la revisión del expediente.
5. Cultivo al ingreso positivo para *Psa*: Al momento del ingreso del paciente a hospitalización, se realizará cultivo de secreciones pulmonares. Esta variable se define como positiva o negativa para *Psa*, siendo incluidos en este último grupo aquellos con cultivos sin crecimiento y aquellos con cultivos positivos para otras bacterias diferentes a *Psa*.

TABLA 12. CARACTERÍSTICAS DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES.- FENOTIPO PULMONAR

Variable	Mediciones	Tipo de variable	Valores
Fenotipo pulmonar	Edad de primer cultivo por <i>Psa</i>	Numérica continua	número
	Caída anual de la FEV1	Numérica continua	porcentaje
	Escala de Brasfield	Numérica continua	número

TABLA 13. OTRAS VARIABLES A ANALIZAR

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	VALORES
Edad de inicio de síntomas	Numérica continua	años
Edad al diagnóstico de FQ	Numérica continua	años
Estado actual	Nominal/dicotómica	0=muerto;1=vivo
Cultivo (+) por <i>Psa</i>	Nominal/dicotómica	0=no;1=si

(C) Covariable.

- Género: variable nominal, dicotómica.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis se realizó con el apoyo del software SPSS versión 11.0, en este programa se desarrolló la base de datos donde se capturaron los resultados obtenidos, antes del análisis se verificó que no existan datos erróneos con la ayuda de búsqueda de valores extremos, los valores perdidos quedaron excluidos del análisis de manera individual. Se presentaron los resultados clínicos y moleculares mediante la realización de estadística descriptiva contemplando:

- Medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, así como pruebas de normalidad.
- Proporciones para las variables cualitativas.
- Se realizaron tablas así como gráficas de barras para las variables cualitativas e histogramas para las variables cuantitativas.

Para cumplir con los objetivos analíticos se realizó un análisis bivariado donde se compararon las variables numéricas con las variantes alélicas potencialmente modificadoras. La significancia se probó mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Por otro lado se construyeron tablas de contingencia de 2x2, tomando como variable predictiva la presencia o ausencia de variantes de riesgo o protección y como desenlace las variables categóricas, probando su significancia mediante prueba exacta de Fisher. En cualquier caso se considerará significativa una $p \leq 0.05$. Posteriormente se dividió a los pacientes con base en el genotipo *CFTR* y se realizó la prueba de Mantel y Hansen para estratificados.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente estudio cumplió con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, según esta ley vigente en nuestro país el estudio corresponde a la categoría II, es decir, investigación con riesgo mínimo, ya que además de la exploración, se tomó una muestra única de 5-10ml de sangre por punción venosa, que es un procedimiento común en exámenes de diagnóstico rutinario.

A los pacientes y padres se les explicó las características y objetivos del estudio especificando las ventajas, desventajas y posibles riesgos para los participantes. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se mantuvo con estricta confidencialidad. Se debe destacar que la planeación, el desarrollo, el manejo de resultados y la interacción entre investigadores y pacientes se mantuvo en estricto apego a la Declaración Universal sobre el genoma humano y los derechos humanos promulgada por la UNESCO.

Es importante destacar que se cuenta con un banco de DNA de la línea de investigación iniciada en 1991 por la Dra. Lorena Orozco, con el título de “Diagnóstico Molecular de la Fibrosis Quística en México”, el cual se utilizó para realizar este protocolo. En su momento se les explicó a los padres que el DNA de los pacientes se utilizaría para diferentes estudios de tipo molecular de dicha patología.

10. FACTIBILIDAD.

Se contó con el apoyo del banco de DNA, previamente mencionado, el cual incluye hasta el momento muestras de más de 133 familias con caracterización *CFTR* completa.

Por otro lado, el Instituto Nacional de Pediatría, el Hospital Infantil de México, así como la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística, son centros de referencia para pacientes con esta enfermedad, por lo que contaron con las condiciones para completar el tamaño de la muestra del estudio.

Además, el Instituto Nacional de Pediatría y el Instituto Nacional de Medicina Genómica, contaron con la infraestructura necesaria para la realización de los técnicas de biología molecular y con el apoyo económico por parte del CONACYT para la adquisición de equipo y reactivos adicionales.

VI. RESULTADOS .

La primera parte de los resultados obtenidos en este trabajo referente al tamizaje molecular de mutaciones *CFTR*, fueron publicados en la *Revista de Investigación Clínica*. El artículo se anexa al final de esta Tesis.

TAMIZAJE MOLECULAR DE MUTACIONES EN EL GEN *CFTR*

En este trabajo se incluyeron 230 pacientes con diagnóstico clínico de FQ, de estos pacientes 133 fueron casos nuevos y 97 pacientes correspondieron a un reporte previo (35 totalmente caracterizados y 62 con al menos un alelo sin caracterizar)⁴³. Los pacientes con los dos alelos caracterizados fueron incluidos con la finalidad de evitar un posible sesgo en la estimación de las frecuencias de las mutaciones *CFTR* en nuestra población. Los 195 pacientes con al menos un alelos sin caracterizar fueron tamizados para la búsqueda de mutaciones en el gen *CFTR*. Con el propósito de mejorar la tasa de detección de las mutaciones *CFTR* se realizó un rastreo mediante la combinación de tres estrategias: mutagénesis dirigida, *dot blot* reversa; Kit *CFTR/36* y análisis de SSCP. Del kit *CFTR/36* todas las bandas de las mutaciones *CFTR* incluidas fueron analizadas, tanto las normales (de referencia) como las mutadas. Mediante la metodología de *dot blot* reversa se detectaron 19 mutaciones en el gen *CFTR* (Tabla 14). Cabe señalar en todos estos pacientes se analizaron los polimorfismos Tn y la gran mayoría (92%) porta los alelos 7T (45%) y 9T (47%) (Tabla 14). En esta primera etapa, se logró alcanzar la caracterización de ambos alelos en 110 pacientes (se incluyen los 35 pacientes previamente publicados). Los 120 pacientes restantes fueron sometidos al análisis de SSCP, ocho de ellos fueron informativos para los exones 7, 11, 13a, 17a, 18 y 20 y para el intrón 19. En ellos se documentó la presencia de las mutaciones c.3272-26A>G, p.R334W, p.R347P, p.S549N, c.2055_2063del, p.T1036N, p.D1152H y p.W1282X por secuenciación automática directa del DNA (Tabla 14). Aunque las mutaciones p.R334W, p.A455E,

c.3120+1G>A, c.3272-26A>G, c.711+1G>T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X and p.R347P, p.D1152H y p.T1036N han sido reportadas en otras poblaciones, ninguna de ellas había sido reportada en pacientes mexicanos. Así, con la combinación de estrategias en este trabajo se logró caracterizar el 77.7% de todos los alelos FQ, detectando un total de 46 mutaciones diferentes, de las cuales siete de ellas mostraron una frecuencia mayor al 1%: la p.F508del fue la mutación más frecuente (44.6%), seguida de la mutación p.G542X (7.4%), p.N1303K (2.4%), p.I507del (1.5%), p.R334W (1.5%), p.S549N (1.5%) y c.3849+10kbC>T (1.3%) (Tabla14). El análisis de estas siete mutaciones representan el 60.2% (277/460) del total de alelos estudiados en este trabajo. Con excepción de la p.F508del, estas mutaciones son más frecuentes en pacientes mexicanos que en la población mundial o en otras poblaciones hispanas (Tabla 15). Las 39 mutaciones restantes sólo representan el 17.5% de los alelos FQ identificados. Por otro lado, cabe aclarar que las mutaciones c.621+1G>T, c.394delTT, c.2789+5G>A, c.3659delC, c.2143delT, p.E60X, c.2184delA, c.711+5G>A, c.1717-1G>A, c.CFTRdel2,3(21kb), c.3905insT, p.R560T, c.1898+1G>A y p.S1251N, contenidas en el Kit CFTR/36 no fueron detectadas en nuestros pacientes.

Por otra parte, resulta importante señalar que de los 230 pacientes analizados, 41 (17.8%) fueron homocigotos para la mutación p.F508del y 123 (53.5%) fueron clasificados como heterocigotos compuestos. Con respecto a la mutación p.G542X, cinco pacientes (2.2%) fueron homocigotos y 24 (10.4%) heterocigotos.

TABLA 14. Frecuencia de mutaciones del gen *CFTR* en 230 pacientes mexicanos

Mutación	Localización en el gen <i>CFTR</i>	Alelos afectados / Num de cromosomas en Orozco et al., 2000 (n = 194)	Alelos afectados/Num. de cromosomas en este estudio (n = 350)	Alelos afectados /Total de cromosomas (n)	Frecuencia Total (%)
p.F508del	Exón 10	79/194	126/350	205/460	44.6
p.G542X	Exón 11	12/194	22/350	34/460	7.4
p.N1303K	Exón 21	4/194	7/350	11/460	2.40
p.S549N	Exón 11	5/194	2/350	7/460	1.52
p.I507del	Exón 10	5/194	2/350	7/460	1.52
p.R334W*	Exón 7	-	7/350	7/460	1.52
c.3849+10kbC>T	Intrón 19	1/194	5/350	6/460	1.3
c.3199_3204del	Exón 17a	2/194	2/350	4/460	0.87
p.A455E*	Exón 9	-	4/350	4/460	0.87
p.I148T	Exón 4	3/194	1/350	4/460	0.87
p.R75X	Exón 3	3/194	-	3/194**	1.54**
c.406-1G>A	Intrón 3	3/194	-	3/194**	1.54**
c.2055_2063del	Exón 13	2/194	1/350	3/460	0.65
c.1078delT	Exón 7	1/194	1/350	2/460	0.43
c.2183AA>G	Exón 13	2/194	-	2/460	0.43
c.3120+1G>A*	Intrón 16	-	2/350	2/460	0.43
c.3272-26A>G*	Intrón 17a	-	2/350	2/460	0.43
c.711+1G>T*	Intrón 5	-	2/350	2/460	0.43
c.935delA	Exón 6b	2/194	-	2/460	0.43
p.G85E	Exón 3	1/194	1/350	2/460	0.43
p.I506T	Exón 10	2/194	-	2/460	0.43
p.Q552X*	Exón 11	-	2/350	2/460	0.43

Mutación	Localización en el gen CFTR	Alelos afectados / Num de cromosomas en Orozco et al., 2000 (n = 194)	Alelos afectados/Num. de cromosomas en este estudio (n = 350)	Alelos afectados /Total de cromosomas (n)	Frecuencia Total (%)
p.W1282X*	Exón 20	-	2/350	2/460	0.43
c.1716G>A	Exón 10	1/194	-	1/194**	0.51**
c.1924_1930del	Exón 13	1/194	-	1/460	0.21
c.297-1G>A	Intrón 2	1/194	-	1/194**	0.51**
c.4160_4161insGGGG	Exón 22	1/194	-	1/194**	0.51**
c.846delT	Exón 6a	1/194	-	1/460	0.21
p.D1152H*	Exón 18	-	1/350	1/460	0.21
p.G551D	Exón 11	1/194	-	1/460	0.21
p.G551S	Exón 11	1/194	-	1/460	0.21
p.H199Y	Exón 6a	1/194	-	1/460	0.21
c.IVS8-5T*	Intrón 8	-	1/350	1/460	0.21
p.L558S	Exón 11	1/194	-	1/460	0.21
p.P750L	Exón 13	1/194	-	1/460	0.21
p.R1162X*	Exón 19	-	1/350	1/460	0.21
p.R117H	Exón 4	1/194	-	1/460	0.21
p.R347P*	Exón 7	-	1/350	1/460	0.21
p.R553X	Exón 11	1/194	-	1/460	0.21
p.R75Q	Exón 3	1/194	-	1/194**	0.51**
p.T1036N*	Exón 17a	-	1/350	1/460	0.21
p.V754 M	Exón 13	1/194	-	1/460	0.21
p.W1069X	Exón 17b	1/194	-	1/460	0.21
p.W1098C	Exón 17b	1/194	-	1/460	0.21
p.W1204X	Exón 19	1/194	-	1/194**	0.51**
p.Y1092X	Exón 17b	1/194	-	1/460	0.21

* Mutaciones detectadas en este estudio

** Frecuencia de 194 alelos reportados por Orozco y cols 2000 (estas mutaciones no fueron tamizadas en este estudio)

TABLA 15. Comparación de las mutaciones más frecuentes del gen *CFTR* en 230 pacientes mexicanos (460 cromosomas) y otras poblaciones

Mutación	Mexicanos en este estudio (%)	A nivel mundial ³⁶ (%)	Frecuencia (%) en pacientes latinoamericanos	Frecuencia (%) en pacientes españoles
p.F508del	44.6	66.0	46.69	51.74
p.G542X	7.40	2.40	5.08	7.70
p.I507del	1.52	0.20	0.23	1.07
p.N1303K	2.40	1.30	1.65	2.92
p.R334W*	1.52	0.10	0.90	1.79
p.S549N	1.52	0.10	0.14	0.0
c.3849+10kbC>T	1.30	0.20	0.41	0.0
TOTAL	60.3	70.3	55.1	65.22

AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 ARCHIVO HISTÓRICO

CORRELACIÓN GENOTIPO FENOTIPO

Con la finalidad de buscar una correlación entre el genotipo identificado y el cuadro clínico (fenotipo), los pacientes se clasificaron en tres grupos: en el grupo I se incluyeron los pacientes homocigotos p.F508del (p.F508del/ p.F508del) (42/230), en el grupo II a los pacientes con al menos un alelo p.F508del (p.F508del/X) (122/230), y en el grupo III a los pacientes con mutaciones no p.F508del en ambos alelos (X/X) (66/230). Como era de esperarse, en el grupo I con los homocigotos p.F508del, la cual es una mutación grave, todos los pacientes presentaron IP, mientras que en los grupos II y III esta se manifestó en el 84% y 75% de los pacientes, respectivamente ($p=0.006$). Por otro lado al comparar el resto de los parámetros clínicos analizados entre los tres grupos, encontramos diferencias significativas para la edad de fallecimiento ($p=0.021$), en donde los pacientes homocigotos p.F508del se mueren a edades más tempranas, casi 5 años antes que los pacientes heterocigotos compuestos para la mutación p.F508del (Tabla 16).

Para comparar las manifestaciones clínicas en los pacientes con mutaciones graves y leves los pacientes se clasificaron en IP y suficientes pancreáticos (SP) (Tabla 17). Nuestros resultados mostraron que la edad de inicio de los síntomas y la edad al diagnóstico fueron significativamente menor en el grupo con IP, encontrando una correlación entre la gravedad de los pacientes y el inicio temprano de las manifestaciones clínicas. Por otro lado, el lapso transcurrido entre el inicio de las manifestaciones clínicas y el diagnóstico de la enfermedad fue prolongado en ambos grupos, pero fue aún más largo cuando los pacientes presentaron un cuadro leve, con función pancreática normal. Más de las dos terceras parte de todos los pacientes fueron diagnosticados antes de los 5 años de edad (71%) y la proporción de pacientes que llegó a edades mayores disminuyó paulatinamente. El diagnóstico antes de los 5 años de edad ocurrió en casi la totalidad de los pacientes con IP (95%), pero sólo en un poco más de la mitad de los pacientes con SP (56%).

El deterioro de la función pulmonar evaluada a través de la escala de Brasfield, y la frecuencia de colonización por *Pseudomonas aeruginosa* no fueron diferentes entre pacientes IP y SP ($p>0.05$). Aunque se acepta que la gravedad de la afección pulmonar no depende del genotipo, se sabe que el deterioro de la afección pulmonar es progresivo y es la causa principal de muerte. Actualmente no se ha determinado si el genotipo influye en la progresión de las manifestaciones respiratorias. Para ello, se utilizó la caída anual de la FEV, la cual se determinó mediante la diferencia entre la medición más alta y las más baja de la FEV1 entre el número de años medidos y se comparó entre pacientes IP y SP. En el grupo de pacientes IP, se encontró que todos ellos presentan un deterioro importante de la función pulmonar (5.82% anual). En cambio, en los pacientes SP la función pulmonar fue menor (3.96% anual). Al comparar ambos grupos encontramos diferencias significativas con un valor de $p=0.030$. Por otro lado, al comparar la frecuencia de colonización por *Pseudomona aeruginosa* en los diferentes grupos etarios, en el total de pacientes se encontró que en la mayoría de ellos puede aislarse esta bacteria antes de los 5 años de edad. Sin embargo, la frecuencia de pacientes menores de 5 años con *Pseudomona aeruginosa* fue menor en el grupo de SP que en el de IP (12.5% vs 44.3%, con valor de $p < 0.001$) (Figura 9, Tabla 18). Como era de esperarse, en el grupo de pacientes IP se encontró mayor frecuencia de fallecimientos (31.6%), cuyo promedio de edad al fallecimiento fue de 12.03 ± 8.33 .

TABLA 16. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LA MUTACIÓN p.F508del

	p.F508del/ p.F508del (n= 42)	p.F508del/X (n= 122)	X/X (n=66)	Valor
DATOS GENERALES				
Edad de inicio (años)	0.65±1.5	1.54±2.9	1.64±2.7	0.251 [∞]
Edad al diagnóstico (años)	3.19±4.3	4.88±6.3	5.14±6.3	0.351 [∞]
Lapso (años)	2.54±3.8	3.33±4.2	3.50±4.5	0.624 [∞]
Cl ⁻ en sudor (mEq/L)	107.68±9.04	101.2±13.7	100.32±15.3	0.066 [∞]
MANIFESTACIONES PULMONARES				
Brasfield (puntuación)	16.97±3.6	18.28±3.4	17.29±2.9	0.077 [∞]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24/42 (57%)	44/122 (36.1%)	33/66 (50%)	0.085 [§]
Edad al 1er cultivo (+) <i>Pseudom.</i>	4.82±1.7	6.21±6.2	6.6±6.1	0.294 [∞]
Edad 1ª espirometría (años)	9.78±4.9	10.18±5.6	10.54±6.0	0.450 [∞]
Caída anual de la FEV ₁ (%/año)	3.95±3.9	5.91±6.2	5.71±4.25	0.066 [∞]
OTRAS MANIFESTACIONES				
Insuficiencia pancreática	42/42 (100%)	103/122 (84.4%)	49/66 (74.2%)	0.006 [§]
Ileo meconial	3/42 (6.06%)	8/122 (6.5%)	4/66 (6.06%)	0.986 [§]
Edad al fallecimiento (años)	7.97±9.2	12.91±7.3	15.76±8.2	0.021 [∞]
Defunciones	14/42 (33.3%)	91/122 (75%)	44/66 (66.7%)	0.431 [§]

[∞] Kruskal-Wallis

[§] Ji-cuadrada

TABLA 17. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN PACIENTES SUFICIENTES E INSUFICIENTES PANCREÁTICOS

	INSUFICIENTES PANCREÁTICOS (n=193)	SUFICIENTES PANCREÁTICOS (n=37)	Val
DATOS GENERALES			
Edad de inicio (años)	0.87±1.63	4.17±4.61	< 0.
Edad al diagnóstico (años)	3.26±4.08	11.81±8.78	< 0.
Lapso (años)	2.39±3.13	7.64±6.19	< 0.
Cloruros en sudor (mEq/Lt)	104.38±12.38	92.25±16.06	< 0.
Fallecimientos	61/193 (31.6%)	7/37 (18.9%)	0.
Edad al fallecimiento (años)	12.03±8.33	21.54±4.02	0.
MANIFESTACIONES CLINICAS			
Bradsfield (puntuación)	17.52±3.25	18.54±3.55	0.
Pseudomonas	90/193 (46.6%)	13/37 (35.1%)	0.
Edad al 1er cultivo (+) Pseudom	4.58±4.08	13.79±7.69	< 0.
Edad 1ª espirometría (años)	8.93±4.34	15.01±6.84	< 0.
Caída anual FEV ₁ (%/año)	5.82±5.43	3.96±3.66	0.
Ileo meconial	15/193 (7.8%)	0/28 (0%)	0.

† U de Mann-Whitney

§ Ji-cuadrada

FIGURA 9. FRECUENCIA DE CULTIVOS POSITIVOS PARA *PSEUDOMONAS* EN LOS DIFERENTES GRUPOS ETARIOS.

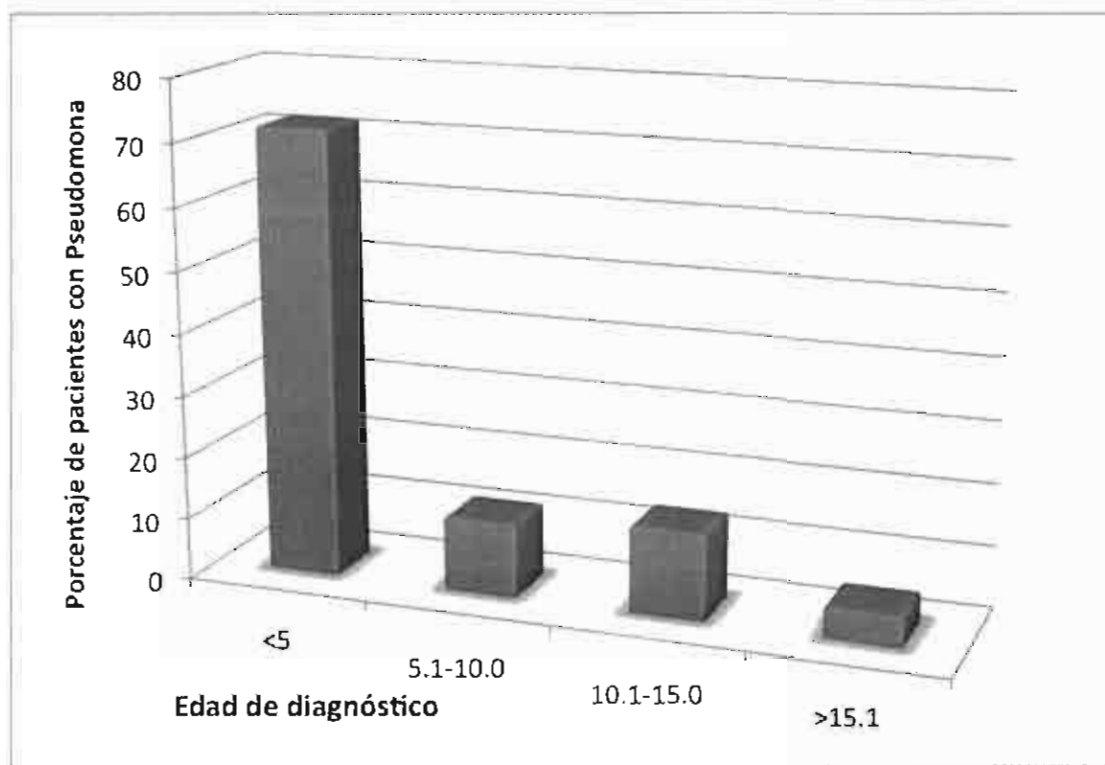


TABLA 18. FRECUENCIA DE COLONIZACIÓN DE *PSEUDOMONAS* EN LOS DIFERENTES GRUPOS ETARIOS.

EDAD (AÑOS)	INSUFICIENTES PANCREÁTICOS (n=193)	SUFICIENTES PANCREÁTICOS (n=37)
0-5	70/159 (44.3%)	1/8 (12.5%)
5.1-10	11/19 (57.9%)	2/11 (18.2%)
10.1-15	9/13 (6.9%)	5/9 (55.6%)
>15	0/3 (0%)	5/9 (55.6%)

Valor de p < 0.001

ANÁLISIS DE VARIANTES ALÉLICAS EN LOS GENES MODIFICADORES PARA FIBROSIS QUÍSTICA

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.

El análisis de las variantes alélicas en los diferentes genes modificadores se realizó en 140 pacientes no relacionados que fueron seleccionados de nuestra población general de pacientes con FQ (230), con los cuales contábamos con cantidad suficiente de DNA, tenían al menos un alelo caracterizado y presentaban datos de manifestaciones pulmonares. A todos ellos se les realizó el análisis de 17 variantes alélicas o SNPs. En este subgrupo de pacientes encontramos las siguientes características: El 50.7% (71/140) es del sexo femenino, el 60.7% (85/140) hasta el momento se encuentra vivo, 34.3% (48/140) falleció y del 5% (7/140) no contamos con ninguna información. De igual forma, el 53.6% (75/140) presentó cultivo positivo para *P. aeruginosa* al momento del ingreso a una Institución de Salud, el 71.4% (100/140) tiene IP y sólo el 7.1% (10/140) tuvo meconio.

Para realizar la correlación de los genes modificadores con el fenotipo pulmonar, se realizó una estratificación de pacientes de acuerdo a la función pulmonar: leve o grave, según se define en Material y Métodos. En los pacientes con fenotipo pulmonar grave la edad de inicio de los síntomas fue 2 años antes que aquellos con fenotipo leve y la edad del primer cultivo positivo para *P. aeruginosa* fue hasta 4 años menos (Tabla 19). El porcentaje de cultivos positivos para *P. aeruginosa* al ingreso del paciente fue mayor en aquellos con fenotipo pulmonar grave (82.3%vs. 37.1%; $p<0.001$) y de igual forma, los pacientes con fenotipo pulmonar grave requirieron una espirometría a edades más tempranas ($p<0.001$) que los pacientes con fenotipo pulmonar leve. La caída anual de FEV₁ fue casi lo doble en pacientes con fenotipo grave y el índice de Brasfield medido al ingreso del paciente fue menor (Tabla 19).

El promedio de la medición de los cloruros en sudor fueron mayor en el grupo de pacientes con fenotipo grave y la edad del fallecimiento fue menor en este mismo grupo ($p<0.009$).

TABLA 19. CARACTERÍSTICAS DE LOS 140 PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA, DE ACUERDO AL FENOTIPO PULMONAR LEVE O GRAVE DE LA FUNCIÓN PULMONAR.

VARIABLE	GRADO DE FUNCIONALIDAD PULMONAR		VALOR DE P
	Leve (n=51)	Grave (n=89)	
Sexo (% femenino)	47.2%	56.9%	0.271‡
Edad de inicio de síntomas (años)			
Rango	0 – 14	0 – 12	0.044†
Media (DE)	2.3 (3.4)	0.9 (1.9)	
Edad al diagnóstico (años)			
Rango	0 – 30	0 – 30	0.064†
Media (DE)	7.2 (7.1)	4.8 (6.2)	
Edad 1er cultivo (+) P. aerugin (años)			
Rango	0 – 31	0 – 30	<0.001†
Media (DE)	9.6 (6.5)	5.5 (5.9)	
Edad de primera espirometría (años)			
Rango	6 – 31	6.25 – 34	0.040†
Media (DE)	11.2 (5.5)	9.9 (6.2)	
Cultivo al ingreso (%P. aeruginosa)	37.1%	82.3%	<0.001‡
Caída de la FEV₁ (%/año)	4.2%	8.0%	<0.001†
Índice de Brasfield	18.2	15.0	<0.001†
Cloruros en sudor	99.3	105.4	0.014§
Edad de fallecimiento (años)			
Rango	0 – 33	0 – 38	0.009§
Media (DE)	19.1 (8.38)	12.06 (8.21)	

† Prueba U de Mann-Whitney

‡ Ji-cuadrada

§ Prueba t de muestras independientes

GENOTIPO Y ASOCIACIÓN ALÉLICA.

La frecuencia de los alelos de las diferentes variantes alélicas analizadas se observa en la Tabla 20. Los alelos considerados como silvestres, como era de esperarse, fueron los más frecuentes. De todas las variantes alélicas estudiadas en los diferentes genes modificadores, sólo dos confirieron mayor riesgo de presentar genotipo pulmonar grave: MBL-550 (G>1550), ubicada en la región promotora del gen *MBL2* (p= 0.016) y la Arg16Gly (A46G) correspondiente al gen *ADRβ2*, localizada en el codón 16 sustituyendo una arginina por una glicina (p=0.029).

TABLA 20. PREVALENCIA DE GENOTIPOS POLIMÓRFICOS DE ACUERDO A LA GRAVEDAD DEL FENOTIPO PULMONAR

Gen	Variante	Función pulmonar	Genotipo	Pacientes con el genotipo* %	Genotipo	Pacientes con el genotipo* %	Genotipo	Pa el
α1AT	Alelo S (T2313A)	Grave	AA	90.2	AT	9.8	TT	
		Leve	AA	94.4	AT	5.6	TT	
	Alelo Z (G4627A)	Grave	GG	92.2	GA	7.8	AA	
		Leve	GG	95.5	GA	3.4	AA	
	3'enhancer (G1237A)	Grave	GG	94.1	GA	5.9	AA	
		Leve	GG	88.8	GA	11.2	AA	
α1ACT	⁻¹⁵ Thr/Ala (G<A)	Grave	GG	51.0	GA	41.2	AA	
		Leve	GG	42.7	GA	41.6	AA	
	Leu55Pro (T<C)	Grave	TT	100	TC	0	CC	
		Leve	TT	100	TC	0	CC	
IL10	G-1082A	Grave	GG	66.7	GA	27.4	AA	
		Leve	GG	52.8	GA	39.3	AA	
TNFα	Promotor (G-308A)	Grave	GG	76.5	GA	17.6	AA	
		Leve	GG	82.0	GA	13.5	AA	
	TNF238 (G<A)	Grave	GG	82.3	GA	15.7	AA	
		Leve	GG	76.4	GA	13.5	AA	

† El valor de p de todas las muestras se determinó mediante Ji-cuadrada.

* El grupo de pacientes con fenotipo pulmonar leve está constituido por 89 y el grupo con fenotipo pulmonar grave por 100.

TABLA 20 (CONT.). PREVALENCIA DE GENOTIPOS POLIMORFÍCOS DE ACUERDO A LA GRAVEDAD DEL FENOTIP

Gen	Variante	Función pulmonar	Genotipo	Pacientes con el genotipo* %	Genotipo	Pacientes con el genotipo* %	Genotipo
MBL2	MBL-550	Grave	GG	13.7	GC	13.7	CC
	G>C 1550	Leve	GG	25.8	GC	24.7	CC
	G>C -221	Grave	GG	76.5	GC	23.5	CC
	Promotor	Leve	GG	73.0	GC	21.2	CC
	Alelo D	Grave	AA	77.5	AD	22.5	DD
	(Arg52Cys)	Leve	AA	64.7	AD	35.3	DD
	Alelo B	Grave	AA	37.3	AB	58.8	BB
	(Gly54Asp)	Leve	AA	49.4	AB	42.7	BB
	Alelo C	Grave	AA	94.1	AC	5.9	CC
	(Gly57Glu)	Leve	AA	93.3	AC	6.7	CC
ADRβ2	(A46G)	Grave	GG	56.9	GA	35.3	AA
	Arg16Gly	Leve	GG	32.6	GA	50.6	AA
	(C79G)	Grave	CC	68.6	CG	27.4	GG
	Gln27Glu	Leve	CC	53.9	CG	38.2	GG
NOS3	894G/T	Grave	GG	7.8	GT	86.3	TT
		Leve	GG	19.1	GT	76.4	TT
GSTP1	A313G	Grave	AA	25.5	AG	52.9	GG
	(Ile105Val)	Leve	AA	27.0	AG	52.8	GG

† El valor de p de todas las muestras se determinó mediante Ji-cuadrada.

* El grupo de pacientes con fenotipo pulmonar leve está constituido por 89 y el grupo con fenotipo pulmonar g

Por otra parte, las características clínicas de estos 140 pacientes mostraron asociación entre la variante alélica MBL-550 con la edad al inicio de síntomas ($p=0.038$), la edad al diagnóstico ($p<0.001$), la edad del 1er cultivo positivo para *Pseudomonas* ($p<0.001$), la edad de la primera espirometría ($p=0.002$) y el índice de Brasfield ($p=0.040$) (Tabla 21). Esto es, pacientes que presentan el genotipo de riesgo (CC) presentan datos clínicos pulmonares a edades más tempranas, como el primer cultivo por *Pseudomonas*, la realización de la primera espirometría y el índice de Brasfield (2 puntos más arriba). El mismo análisis pero con la variante alélica Arg16Gly del gen ADR β 2 sólo presentó significancia estadística la edad del primer cultivo positivo para *Pseudomonas* ($p=0.041$) y la edad de la primera espirometría ($p=0.016$), donde los pacientes con el genotipo de protección (AA) presentan las manifestaciones pulmonares a mayor edad, incluso aunque el resto de las manifestaciones clínicas no son estadísticamente significativas, observamos este mismo comportamiento (Tabla 22).

TABLA 21. CORRELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS 140 PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA, DE ACUERDO AL GENOTIPO DE LA VARIANTE ALÉLICA MBL-550.

VARIABLE	GENOTIPO DE LA VARIANTE ALÉLICA MBL-550			VALOR DE P
	GG (n=29)	GC (n=30)	CC (n=81)	
Sexo (% femenino)	51.7%	40.0%	54.3%	0.404‡
Edad de inicio de síntomas (años)				
Rango	0 – 14	0 – 10	0 – 12	0.038†
Media (DE)	2.7 (3.9)	2.5 (3.0)	1.4 (2.7)	
Edad al diagnóstico (años)				
Rango	0 – 25	0 – 30	0 – 31	<0.001†
Media (DE)	10.2 (6.7)	6.6 (7.9)	4.8 (6.0)	
Edad 1er cultivo (+) P. aerugin (años)				
Rango	1.5 – 25.0	0 – 30	0 – 31	<0.001†
Media (DE)	11.6 (5.8)	8.6 (7.2)	6.6 (6.2)	
Edad de primera espirometría (años)				
Rango	6 – 30	6 – 25	6 – 34	0.002†
Media (DE)	12.8 (5.1)	10.5 (6.2)	10.0 (5.7)	
Cultivo al ingreso (%P. aeruginosa)	44.8%	53.6%	60%	0.096‡
Caída de la FEV ₁ (%/año)				
Media (DE)	6.2 (3.6)	6.3 (1.4)	7.2 (3.5)	0.370†
Indice de Brasfield				
Media (DE)	18.1 (3.2)	17.1 (3.1)	16.0 (3.4)	0.040†
Cloruros en sudor				
Media (DE)	93.9 (17.6)	95.7 (14.9)	104.9 (12.9)	0.269†
Edad de fallecimiento (años)	n=8	n=10	n=30	
Rango	9.8 – 30.5	9.8 – 20.8	7.6 – 38	
Media (DE)	20.6 (6.9)	15.6 (3.9)	15.3 (8.2)	0.104†

† Kruskal-Wallis

‡ Ji-cuadrada

TABLA 22. CORRELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS 140 PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA, DE ACUERDO AL GENOTIPO DE LA VARIANTE ALÉLICA Arg16Gly DEL GEN ADRβ2.

VARIABLE	GENOTIPO			VALOR DE P
	GG (n=58)	GA (n=63)	AA (n=19)	
Sexo (% femenino)	51.7%	53.9%	36.8%	0.416‡
Edad de inicio de síntomas (años)				
Rango	0 – 45	0 – 11	2 – 4	0.651†
Media (DE)	0.8 (1.2)	1.5 (2.6)	3.5 (1.0)	
Edad al diagnóstico (años)				
Rango	0 – 24	1 – 18	10.8 – 14.5	0.223†
Media (DE)	4.8 (7.1)	6.4 (4.7)	13.4 (1.8)	
Edad 1er cultivo (+) P. aerugin (años)				
Rango	0.6 – 24	1.6 – 31	0.7 – 16	0.041†
Media (DE)	6.8 (5.7)	8.8 (4.9)	10.4 (7.3)	
Edad de primera espirometría (años)				
Rango	6 – 24	6 – 31	6 – 34	0.016†
Media (DE)	9.2 (4.2)	11.0 (6.7)	12.2 (6.4)	
Cultivo al ingreso (%P. aeruginosa)	55.2%	52.4%	52.6%	0.788‡
Caída de la FEV₁ (%/año)				
Media (DE)	8.0 (3.4)	5.9 (3.2)	5.4 (1.9)	0.167†
Indice de Brasfield				
Media (DE)	16.3 (3.5)	16.1 (2.3)	15.3 (2.9)	0.335†
Cloruros en sudor				
Media (DE)	102.3 (16.1)	100.8 (14.0)	96.8 (15.7)	0.082†
Edad de fallecimiento (años)				
	n=6	n=22	n=20	
Rango	7.6 – 34	8 – 33	20.3 – 38.0	
Media (DE)	13.8 (6.2)	17.2 (7.2)	25.9 (8.3)	0.470†

† Kruskal-Wallis

‡ Ji-cuadrada

VIII. DISCUSIÓN.

En México no se conoce la frecuencia real de la FQ, ya que ésta es una de las muchas enfermedades en las que existe un subdiagnóstico en países como el nuestro. Este subdiagnóstico puede ser consecuencia del desconocimiento de la misma que hace que se confunda con enfermedades comunes en nuestro medio (desnutrición, problemas gastrointestinales, problemas respiratorios crónicos, etc). La determinación de cloruros en sudor es hasta el momento la prueba diagnóstica más confiable para el diagnóstico de la FQ. La desventaja de este método estriba no sólo en que algunos pacientes presentan valores de la cuantificación de cloruros en sudor entre el límite de lo normal y lo anormal, sino en la imposibilidad de la detección de portadores. En contraste, el estudio molecular abre las posibilidades, tanto para el diagnóstico prenatal como para la prevención de padecimientos como la FQ, donde no existe un tratamiento oportuno.

El diagnóstico molecular permite detectar las mutaciones del gen *CFTR* en estos pacientes y con ello, definir mutaciones leves o graves con la finalidad de establecer un pronóstico de la enfermedad y un tratamiento oportuno. Además, con la detección de las mutaciones responsables de la FQ en las familias afectadas, es posible detectar a los portadores y otorgar a estas familias un asesoramiento genético certero o en su caso, un diagnóstico temprano para disminuir las complicaciones de la enfermedad y elevar la calidad de vida de los pacientes.

Actualmente se han descrito más de 1,800 mutaciones en el gen *CFTR*,³⁶ la mayoría de estas mutaciones son poco comunes y muchas de ellas tienen una frecuencia menor al 1%. La variación de la frecuencia de las distintas mutaciones del gen *CFTR* en los diferentes grupos étnicos ocasiona que en algunas poblaciones con alto grado de mestizaje exista una gran diversidad de mutaciones, mientras que en aquellas poblaciones con poco mestizaje o carácter endogámico, predominan una o dos mutaciones.^{94,95}

La población mexicana es una población heterogénea con una estructura genética muy compleja, en donde los genes nativos americanos representan el 51%, los genes europeos el 45.4% y los genes africanos el 3.6%.⁴⁸ Quizás debido a esta complejidad, México cuenta con un amplio espectro de mutaciones en el gen *CFTR*, incluyendo algunas que se encuentran únicamente en la población mexicana, por lo que la detección de mutaciones en una población como la nuestra es sumamente laboriosa y complicada. En este estudio, el análisis de las mutaciones p.F508del, p.G542X, p.N1303K, p.R553X y p.G551D permitió la caracterización de cerca del 50% de los cromosomas afectados, mientras que en los caucásicos, la búsqueda de las mismas mutaciones, podría alcanzar una tasa de detección de hasta un 98% de alelos afectados.^{94,95} En poblaciones con una alta heterogeneidad, como en México, una variedad de metodologías deben ser combinadas para mejorar la tasa de detección de mutaciones en el gen *CFTR*. De hecho en este trabajo se utilizaron diferentes estrategias para mejorar esta tasa de detección en los 230 pacientes mexicanos analizados en los que encontramos 46 mutaciones distintas, 12 de ellas (p.R334W, p.A455E, c.3120+G>A, c.3272-26A>G, c.711+1G>T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X, p.R347P, p.D1152H y p.T1036N) que no habían sido reportadas en la población mexicana. En general, nuestra estrategia condujo a la identificación de sólo el 77% de todos los alelos afectados, lo cual documenta que México tiene uno de los espectros mutacionales en el gen *CFTR* más amplios a nivel mundial. Con la combinación de estrategias fue posible la identificación de siete mutaciones que mostraron una frecuencia mayor a 1% en la población mexicana: p.F508del (44.6%), p.G542X (7.4%), p.N1303K (2.4%), p.I507del (1.5%), p.S549N (1.5%), p.R334W (1.5%) y c.3849+10kbC>T(1.3%). Estas metodologías son trascendentales para optimizar el tamizaje de mutaciones *CFTR* en nuestra población.⁹⁶

Cabe señalar que a pesar de la combinación de estrategias utilizadas, todavía faltan por caracterizar el 23% de los alelos afectados, lo que demuestra que aún hay un gran número de alelos desconocidos, que tal vez correspondan a mutaciones raras e incluso no podemos descartar la posibilidad de que exista una mutación con una alta frecuencia en nuestros pacientes.

Por otra parte, de las 36 mutaciones que determina en kit CFTR/36, sólo 19 de ellas fueron detectadas en este estudio, esto puede ser debido a que dicho método de detección fue creado específicamente para la población caucásica, tomando en cuenta las mutaciones que prevalecen en ella. Por lo tanto, es necesario identificar las mutaciones *CFTR* que afectan a la población mexicana para así diseñar un *kit* específico para nuestra población, incluyendo las mutaciones más frecuentes, así como el resto de ellas que se describen en este trabajo (Tabla 14). La optimización de los métodos y estrategias de detección y análisis de mutaciones *CFTR*, como lo demuestra la combinación de tres tecnologías en este estudio, ayudará a dilucidar las mutaciones implicadas en la FQ en poblaciones con una alta heterogeneidad genética como la nuestra. En este sentido, el conocimiento detallado de la distribución étnica y geográfica de las mutaciones *CFTR* mejorará los programas de detección de la FQ en una determinada población y permitirá el desarrollo de métodos cada vez más eficaces de diagnóstico y tratamiento.⁹⁶

La mutación más frecuente en nuestra población fue la mutación p.F508del, seguida por la mutación p.G542X, p.N1303K, S549N y p.I507del. Las mutaciones p.F508del, p.G542X, p.N1303K se ubican también dentro de las cinco primeras mutaciones más frecuentes a nivel mundial, no así la S549N y la p.I507del. La frecuencia de las mutaciones en nuestra población fue similar a las reportadas en países del Sur de Europa, donde la mutación p.F508del presenta también una frecuencia baja en relación a poblaciones caucásicas, en tanto que la G542X es más alta.

La S549N es la tercera mutación más frecuente en pacientes mexicanos, en tanto que a nivel mundial se ha detectado con una frecuencia menor. Mientras que la p.I507del se ubica como la cuarta mutación de mayor frecuencia en pacientes mexicanos. Esto contrasta con lo reportado a nivel mundial, donde es considerada como una mutación poco frecuente. Cabe la posibilidad que mientras es una mutación con una frecuencia elevada en la población mexicana, en otros estudios ha sido subestimada posiblemente por ser una mutación aledaña a la más frecuente p.F508del. De hecho, se ha descrito que por ciertas metodologías como análisis de heterodúplex, es posible que alelos p.I507del

sean confundidos con alelos p.F508del. Incluso muchos autores mencionan que dada su baja frecuencia no consideran necesario buscarla dirigidamente.⁴³

La mayoría de las otras mutaciones del gen FQ son poco comunes, aunque algunas son frecuentes en ciertas poblaciones. Por ejemplo, la segunda mutación más frecuente a nivel mundial (G542X) que se encuentra en tan sólo el 3.4% de los cromosomas FQ, tiene una frecuencia del 25% en las Islas Canarias y del 8% en toda España. Con base al análisis de haplotipos, se ha postulado que la G542X también se originó de un solo evento mutacional y fue introducida a España por los fenicios hace 2,500 a 3,000 años y a Latinoamérica por los conquistadores.⁴⁵

Estudios extensos sobre la identificación de marcadores dentro y fuera del gen CFTR, han revelado que ciertas mutaciones como la $\Delta F508$, G542X y N1303K se encuentran asociadas con haplotipos únicos, lo que sugiere que cada una de ellas se derivó de un mismo evento mutacional. Otras mutaciones como la R117H, H199Y, R334W, R347P, R553X, L558S, 3272-26A→G, 3849+10kbC y TR1162X, se encuentran asociadas a más de un haplotipo, por lo que probablemente representen mutaciones recurrentes que surgieron de manera independiente. En un estudio en la población mexicana se encontró que los cromosomas con la mutación $\Delta F508$ se asocian con el haplotipo B en un 97.2%, como se ha reportado en otros países de América del Norte y Europa, sin embargo la G542X se encontró asociada con este haplotipo sólo en un 72.7% de los cromosomas, el resto se asoció con los haplotipos A y D. Este hallazgo contrasta con lo reportado en otras poblaciones donde esta mutación se ha encontrado asociada casi exclusivamente con el haplotipo B. Las mutaciones poco frecuentes y las desconocidas, así como los alelos normales, se asociaron con mayor frecuencia a los haplotipos A y C. Esta heterogeneidad encontrada en pacientes mexicanos puede ser explicada por: 1) eventos de recombinación, 2) mezcla entre poblaciones con distribución de haplotipos diferente y 3) la presencia de mutaciones FQ en la población de nativos americanos.^{97,98}

Por otra parte, se sabe que el análisis molecular del gen FQ ha contribuido de manera importante al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y al entendimiento de la correlación entre el efecto de las diferentes mutaciones en la función de la proteína y su repercusión en el cuadro clínico del paciente.

El cuadro clínico de la FQ se ha descrito como un amplio espectro de signos y síntomas, donde un paciente puede presentar desde un cuadro grave, como en el caso de los homocigotos p.F508del, hasta un cuadro leve como en el caso de homocigotos p.G551S. En ocasiones el cuadro es atípico manifestándose como un único síntoma esterilidad primaria por ausencia congénita de los vasos deferentes (CBAVD).³

Se debe tomar en cuenta que cada mutación afecta de manera diferente a la función de la proteína, y que las combinaciones de las mutaciones afectan de manera particular el transporte de líquidos y electrolitos a través de las membranas epiteliales. Además, la expresión de un gen también se encuentra influenciada con su interacción con los otros genes y por los factores ambientales. Así, el fenotipo de un paciente es el resultado de la interacción entre el genotipo y el ambiente. Lo anterior podría explicar la variabilidad del cuadro clínico de la fibrosis quística, e incluso en los pacientes con manifestaciones pulmonares se ha observado que independientemente del tipo de mutación *CFTR*, la afección es muy variable, incluso en pacientes con el mismo genotipo.⁶¹ Existen reportes que muestran que la función pancreática de estos pacientes con FQ depende directamente de su genotipo, de tal manera que las mutaciones se han clasificado como "graves" cuando causan IP, y como "leves" cuando la función pancreática no se altera. Se estima que aproximadamente el 90% de las mutaciones son graves. Sin embargo las mutaciones leves son dominantes sobre las mutaciones graves, es decir, para que un paciente presente IP es indispensable que porte mutaciones graves en ambos alelos.⁵⁷

En este trabajo, encontramos que el 83.9% presentó insuficiencia pancreática. Los pacientes con suficiencia pancreática sólo se detectaron en los grupos II (p.F508del/X) y III (X/X) los cuales posiblemente presentan mutaciones leves en por lo menos uno de sus alelos que aún no han sido caracterizados. En estos dos grupos, uno de los alelos no

caracterizado debe codificar para una proteína con función residual, que es dominante sobre la proteína gravemente afectada, como la codificada por el alelo p.F508del, la cual queda atrapada en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico sin función alguna. Por otro lado, al no encontrar diferencias significativas al comparar todos los parámetros clínicos analizados entre los tres grupos (Tabla 16), puede deberse a que la proporción de pacientes con IP es considerablemente mayor que la de SP (Tabla 16). El cuadro clínico es un parámetro que nos orienta hacia la naturaleza de las mutaciones, por lo que los pacientes se clasificaron como IP y SP (Tabla 17). Con este criterio se observa claramente una correlación entre la gravedad de los pacientes y el inicio temprano de las manifestaciones clínicas. Por otro lado, aunque el lapso transcurrido entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico de la enfermedad fue prolongado en ambos grupos, la brecha se hizo aún más grande cuando los pacientes presentaban un cuadro con función pancreática normal, poco común en fibrosis quística, lo que indica el subdiagnóstico aún prevalente en nuestro país. En apoyo a esto en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría, se observó que de 32 casos con FQ diagnosticados en 3,260 autopsias consecutivas, sólo 9 se tuvieron sospecha diagnóstica de FQ en vida. Aún más, llama la atención que siendo este un estudio realizado en un Instituto de alta especialidad, en muchos de nuestros pacientes el análisis molecular fue la confirmación de una sospecha diagnóstica, por lo que es de esperarse que en hospitales de primero y segundo nivel, un gran número de individuos con fibrosis quística mueran sin diagnóstico y sin tratamiento adecuado.

En la FQ la afección pulmonar es la causa principal de muerte. Esta depende más de las influencias ambientales y del tratamiento temprano que del genotipo, por lo que actualmente este es uno de los parámetros que se toma en cuenta para determinar la gravedad de la enfermedad.⁹⁹ Ya que la IP puede ser controlada con tratamiento sustitutivo, este conocimiento parecería contradictorio con la predicción de "enfermedad grave" tomando en cuenta como único criterio la función pancreática. En este estudio se sugiere que existe correlación entre el genotipo y la progresión de las manifestaciones respiratorias, cuando se toma en cuenta el tiempo de evolución. En la mayoría de los pacientes IP, dado que existe una alteración grave del canal de cloro en los epitelios

pulmonares, las manifestaciones respiratorias desde edades muy tempranas. Estos resultados demuestran que las mutaciones graves conducen más rápidamente al deterioro de la función pulmonar, de tal manera que los pacientes con enfermedad grave presentan problemas respiratorios durante toda su vida, mientras que el deterioro de la función pulmonar en los SP es más lenta, presentando una correlación negativa y estadísticamente significativa entre el tiempo de evolución y la gravedad del deterioro de la función pulmonar. Aún más, en apoyo a estos resultados se encontró que la frecuencia de pacientes menores de 5 años con *Pseudomonas aeruginosa* fue menor en el grupo de SP que en el de IP (Tabla 18). Estos hallazgos apoyan el término de “enfermedad grave” y son evidencia de que en FQ también existe correlación entre el genotipo y las manifestaciones respiratorias.

La FQ por lo tanto, es un padecimiento Mendeliano que se manifiesta con una gran expresividad variable. Las manifestaciones clínicas pueden variar desde la esterilidad primaria sin otra manifestación, hasta la afección pulmonar grave, con IP y desnutrición que llevan al paciente a la muerte durante los primeros meses de vida. La enfermedad pulmonar es la mayor causa de muerte en pacientes con FQ (hasta del 95%), la cual ya se sabe no correlaciona con exactitud con el genotipo *CFTR*,¹⁰⁰ a diferencia de amplios estudios de correlación genotipo-fenotipo que han mostrado que sólo la función pancreática correlaciona directamente con el genotipo, mientras que las otras manifestaciones varían aún en pacientes con el mismo genotipo e incluso aún entre hermanos que comparten el mismo ambiente, por lo que se postula la existencia de otros factores genéticos que no son los directamente responsables de la enfermedad, pero que influyen sobre la gravedad de la misma.²⁸ Diversos estudios, han demostrado la participación de genes potencialmente modificadores relacionados con el sistema inmune que contribuyen a la patogénesis del fenotipo pulmonar en pacientes con FQ, tales como: α 1-antitripsina (α 1-AT), α -1-antiquimotripsina (α ₁-ACT), genes de inmunidad innata como: lectina de unión a manosa (MBL2), factor de necrosis tumoral alfa (*TNF α*), algunas citosinas y sus receptores, genes antioxidantes tales como: glutatión S-trasnsferasa (*GST-M1*), Oxido Nitrico Sintetasa3 (*NOS3*), factor de crecimiento transformante-beta1 (*TGF-*

$\beta 1$), receptor de $\beta 2$ adrenérgico (*ADRB₂*), entre otros.⁶⁵ Así mismo en estos genes se han estudiado múltiples polimorfismos, los cuales pueden actuar como modificadores de la enfermedad pulmonar en los pacientes con FQ, pero estos estudios han incluido solo pequeños grupos de pacientes, con una amplia gama de genotipos *CFTR* o fenotipos clínicos limitados que no conducen a resultados a largo plazo.⁶⁶ Para incrementar la probabilidad de identificar variantes genéticas modificadoras que influyan con el fenotipo pulmonar de FQ, nosotros realizamos, en primera instancia, una estratificación de acuerdo al fenotipo pulmonar leve o grave de la función pulmonar, basándonos en los siguientes parámetros: cultivo positivo para *Pseudomonas aeruginosa*, edad del primer cultivo para *Pseudomonas aeruginosa*, índice de Brasfield y caída anual de la FEV1 (medición más alta menos la medición más baja dividida entre el número de años de realización de mediciones), con este análisis observamos que los pacientes entre más temprana es la edad de inicio de síntomas ($p=0.044$), la edad de primer cultivo para *Pseudomonas aeruginosa* ($p=0.0001$) y la edad de fallecimiento ($p=0.009$) se relaciona con el fenotipo pulmonar grave, lo cual correlaciona con lo ya descrito pues se trata de parámetros o síntomas presentes en pacientes con fenotipo grave.

Con la estratificación de pacientes, realizamos un análisis de 17 variantes alélicas (Alelo S, Z, -15Thr-Ala, *enhancer* G1237A, Leu55Pro, MBL52, MBL54, MBL57, MBL-221, MBL-550, IL10-819, NOS3, GSTP1, $\beta 2$ AD16, $\beta 2$ AD27, TNF α -308 y TNF α -238) de los genes *$\alpha 1$ -ACT*, *$\alpha 1$ -AT*, *MBL*, *IL10*, *NOS3*, *GSTP1*, *β -2AD* y *TNF α* , que se ven relacionados con la afección pulmonar. Con este análisis determinamos que la frecuencia de estos polimorfismos es muy similar a lo reportado previamente en la literatura (Tabla 20), predominando en todos los casos la variante silvestre en nuestros pacientes, y aún más de las variantes estudiadas se observó que la -550 (c. 1550G>C) y p.Arg16Gly (c46A>G), de los genes *MBL2* y *ADRB₂* respectivamente, confieren un mayor riesgo de tener fenotipo pulmonar grave ($p=0.016$ y $p=0.029$ respectivamente) (Tabla 20). Nuestros resultados sugieren fuertemente que en la FQ existe correlación entre el genotipo *CFTR* y la gravedad de las manifestaciones pulmonares.

MBL2 es un gen que codifica para la proteína Lectina de unión a manosa (*MBL2*) es secretada por el hígado como parte de la respuesta inmune en fase aguda. Los ligandos de *MBL* son expresados por una amplia variedad de microorganismos y unidos a la proteína conducen a la opsonización de estos y activación del sistema del complemento, por lo que es una proteína que muestra una gran interacción con patógenos y por lo tanto es importante para erradicar infecciones persistentes y recurrentes como *Pseudomona aeruginosa* entre otros, que están presentes en pacientes con FQ. Por lo que bajos niveles de *MBL2* en niños con infecciones recurrentes, se atribuye a la inmadurez del sistema inmune en etapas muy tempranas. A partir de 1976 múltiples estudios han demostrado que bajos niveles en suero de *MBL2* en niños entre 6 meses y 2 años de edad que presentan infecciones recurrentes de bacterias o levaduras en vías respiratorias, otitis y diarreas crónicas presentan una baja en la opsonización de estos microorganismos. Garred y cols.⁷² demostraron que variantes alélicas en este gen están involucradas en la susceptibilidad y riesgo a infecciones, asegura que *MBL* en FQ es un factor clave en la inmunidad innata ya que las infecciones pulmonares son la mayor causa de morbi-mortalidad en pacientes con FQ y por tanto las variantes alélicas en la región promotora como -221 y -550; además de los alelos D, B y C, localizados en la región codificante del gen *MBL2*, podrían ser un factor de riesgo en pacientes con FQ, ya que hay antecedentes que estos polimorfismos correlacionan con bajos niveles de *MBL2* y por lo tanto se asocian a infecciones recurrentes. En este trabajo se documenta que la variante -550G>C, la cual modifica la transcripción del gen, correlaciona con un fenotipo pulmonar grave (Tabla 20), y con las manifestaciones clínicas pulmonares (Tabla 21), en donde podemos observar que los pacientes con el genotipo de riesgo (CC) presentan infección por *Pseudomona* a edades más tempranas, lo cual repercute en la gravedad y el inicio de presentación del resto de las manifestaciones clínicas como la edad de inicio de síntomas y la edad del diagnóstico.

Otra de las variantes asociadas al fenotipo pulmonar grave en nuestro estudio fue la variable p.Arg16Gly (c.46A>G) del gen *ADR β 2* el cual codifica para el receptor β adrenérgico 2, que es una proteína integral de membrana, es un importante factor

inmunorregulador acoplado a una proteína G y se encuentra en varios tipos de tejidos, es un blanco para muchos ligandos β_2 agonistas y antagonistas, frecuentemente utilizados en el tratamiento de diversos padecimientos.¹⁰¹ Variaciones individuales en la respuesta psicológica, expresión y función de los receptores, así como diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos se asocian en parte a estas variantes polimórficas. En este trabajo, se sugiere que la c.46A>G (p.Arg16Gly) confiere protección a la gravedad de las manifestaciones pulmonares, similar a lo reportado previamente en la literatura. La gran mayoría de los pacientes clasificados como graves presentan el alelo ancestral en forma homocigota (GG), mientras que los pacientes con fenotipo pulmonar leve presentan el genotipo de protección (AA) en mayor frecuencia, sugiriendo que este polimorfismo tiene un efecto positivo en la función de *ADR β 2* (Tabla 20), lo cual han sido estudiado *in vitro* e *in vivo* en sistemas respiratorio y cardiaco. De igual manera, observamos que los pacientes que portan el genotipo de protección, presentaron las manifestaciones pulmonares más tarde que aquellos tienen el alelo ancestral (Tabla 22).

Estos hallazgos son considerados como un indicio de que estos genes (*MBL2* y *ADR β 2*) y en especial éstas variantes alélicas -550 (c. 1550G>C) y p.Arg16Gly (c46A>G), muestran una importante influencia genética que modifica la gravedad de la enfermedad pulmonar en pacientes mexicanos con FQ, aunque cabe aclarar que nuestra población de estudio todavía es pequeña y quizá es necesario un estudio poblacional mucho más amplio, para poder confirmar estos hallazgos.

Finalmente, la determinación de la presencia de las diferentes variantes alélicas de estos y otros genes modificadores, contribuirá a incrementar nuestro entendimiento sobre la fisiopatología de la FQ y muy posiblemente, serán de gran utilidad para predecir el fenotipo a partir del genotipo tanto de *CFTR* como de los genes modificadores de la afección pulmonar, lo que ayudará sin duda, a mejorar las estrategias de prevención de las complicaciones pulmonares y de tratamiento, mejorando así, la calidad de vida de los pacientes.

IX. CONCLUSIONES

- El diagnóstico molecular de la FQ es necesario para otorgar un diagnóstico oportuno, un diagnóstico prenatal y la detección de portadores.
- En este trabajo se detectaron 46 mutaciones distintas que ocupan el 77% de los alelos afectados, 12 de ellas se reportan por primera vez en población mexicana.
- La búsqueda de las 7 mutaciones más frecuentes permiten identificar el 63% de los cromosomas FQ en población mexicana.
- En poblaciones con una alta heterogeneidad genética es necesario combinar varias metodologías para mejorar la tasa de detección de mutaciones en el gen CFTR.
- México cuenta con uno de los más amplios espectros de mutaciones CFTR a nivel mundial, tal vez debido a su estructura genética compleja.
- La correlación genotipo-fenotipo nos refleja a una clara relación entre las mutaciones CFTR y la Insuficiencia pancreática, pero no así con el resto de las manifestaciones clínicas.
- Las frecuencias de las variantes alélicas en este estudio son similares a lo reportado en la literatura.
- La variante alélica -550G>C del gen MBL2 , confiere un mayor riesgo de manifestar un fenotipo pulmonar grave en pacientes con FQ.
- La variante alélica p. Arg16 Gly del gen ADRβ2 se observa como una variante de protección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Rimoin DL, Connor MJ, Pyeritz RE (Eds.) Principles and practice of medical genetics. 5th Ed. London: Churchill-Livingston: Emery and Rimón's; 2007; 1561-606.
2. Welsh MJ, Ramsey BW, Accuso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. C Scriver, A Beaudet, W Sly, D Valle (Eds.) In The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th Ed. New York: McGraw-Hill Co; 2001; 5121-88.
3. Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2007. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1058-61
4. Schrijver I, Ramalingam S, Sankaran R, Swanson S, Dunlop CLM, Keiles S, Moss RB, Oehlert J, Gardner P, Wassman ER and Kammesheidt A. Diagnostic testing by CFTR gene mutation analysis in a large group of Hispanics. *J Mol Diag* 2005; 7(2): 289-99.
5. Kerem E, Kerem B. Genotype-Phenotype correlation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22: 387-95.
6. Lezana JL, Masa D, Lezana MA. Fibrosis quística en México. Análisis de sus principales aspectos epidemiológicos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994; 5: 305-10.
7. Davis PB. Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev* 2001; 2: 257-64.
8. di Sant' Agnese PA, Darlig RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics* 1953; 12:549
9. Munger B, Brusilow S, Cooke R. An electron microscopic study of eccrine sweat glands in patients with cystic fibrosis of the pancreas. *J. Pediatrics* 1961; 59:497.
10. Staab D. Cystic fibrosis: Therapeutic challenge in cystic fibrosis children. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 577-80.
11. Tomaszewski JF Jr, Bruce M, Stern RC, Dearborn DG, Dahms B. The pathology of pulmonary air cysts in cystic fibrosis. Relation to radiological findings and history of pneumothorax. *Hum Pathol* 1985;16:253.
12. Ryland D, Reid L. The pulmonary circulation in cystic fibrosis. *Thorax* 1982;30:285.

13. Mischler EH, Chesney PJ, Chesney RW, Mazes RB. Demineralization in cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1979; 133: 632-5.
14. Conwal SP. Vitamin K in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 2004; 97: 48-51.
15. Anderson D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relationship to celiac disease: Clinical and pathologic study. *Am J Dis Child* 1938; 56: 344-99.
16. Stern RC, Stevens DP, Boat TF, Doershuk CF, Izant RF, Matthews LW. Symptomatic hepatic disease in cystic fibrosis: incidence, course, and outcome of portal systemic shunting. *Gastroenterology* 1976; 70: 645-9.
17. Oliveira MC, Reis FJ, Monteiro AP and Penna FJ. Effect of meconium ileus on the clinical prognosis of patients with cystic fibrosis. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 31-8.
18. Jarzabet K, Zbucka M, Pepinski W, Szamatowicz J, Domitrz J, Janica J, Wotezynski S, Szamatowicz M. Cystic Fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol* 2004; 2: 119-29.
19. Orozco L, Alcántara MA, González A. Diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias. *La frontera: Genética molecular de la enfermedad*. Ed JP Luna, E. Orozco; México: Instituto Politecnico Nacional, 2004; 2: 46-74.
20. Tsui L, Buchwal M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Akots G, Brown V, Helms C, Gravius T, Parker C, Rediker K, Donis Keller H. Cystic Fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985; 29: 1054-57.
21. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65.
22. Riordan JR, 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.
23. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991; 10: 214-28.

24. Kerem BS, Rommens J, Buchanan J. Identification of the cystic Fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1074-80.
25. Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 24271-476.
26. Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu Cs, Daleman W, Pavirani A. The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed a low levels in cell of epithelial origin. *J Biol Chem* 1991; 226: 9140-44.
27. White NL, Higgins CF, Trezise AEO. Tissue-specific in vivo transcription start site of the human and murine cystic fibrosis genes. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 363-69.
28. Zielenski J, Tsui LC. Cystic Fibrosis: Genotypic and Phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 777-807.
29. Teng H, Jorissen M, Poppel H, Legius E, Cassiman JJ, Cuppens H. Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum Mol. Genet* 1997; 6: 85-90.
30. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332: 1475-80.
31. Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 701-18.
32. Akabas MH. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structural and function of an epithelial chloride channel. *J Biol. Chem* 2000; 275: 3729-32.
33. Choy JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ and Muallen S. Aberrant CFTR-dependent HCO₃-transport in mutation associated with cystic fibrosis. *Nature* 2001; 410: 94-7.
34. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: and intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002; 1: 13-29.

35. Chang X, Hou Y, Jensen TJ, Riordan JR. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:18572-18575
36. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. <http://www.genet.sickkids.on.ca>
37. Rowntree R and Harris A. DNA polymorphisms in potential regulatory elements of the CFTR gene alter transcription factor binding. *Hum Genet* 2002; 111: 66-74.
38. Tzetis M, Efthymiadou A, Doudounakis S and Kanavakis E. Qualitative and quantitative analysis of mRNA associated with four putative splicing mutations (621+3A→G, 2751+2T→A, 296+1G→C, 1717-9T→ C-D565G) and one nonsense mutation (E822X) in the CFTR gene. *Hum Genet* 2001; 109: 592-601.
39. Cartegni L, Chew SL and Kriner AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 285-98.
40. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP and Farrell PM. Cystic fibrosis: A world wide analysis of the CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum mutat* 2002; 19: 575-606.
41. Villalobos C, Rojas A, Villarreal E, Cantú JM, Sanchez FJ, Saiki RK, Barrera HA. Analysis of 16 Cystic fibrosis mutations in Mexican Patients. *Am J Med Genet* 1997; 69: 380-82.
42. Flores S, Gallegos M, Moran M, Sánchez J. Detection of ΔF508 mutation in cystic fibrosis patients from northwestern Mexico. *Ann Genet* 1997; 40: 189-91.
43. Orozco L, Velázquez R, Zielenski J, Tsui L-C, Chávez M, Lezana JL, Saldaña Y, Hernández E and Carnevale A. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846del T, P750L, 4160insGGGG and 297-1G A). *Hum Genet* 2000; 106: 360-65.
44. Restrepo MC, Pineda L, Rojas-Martínez A, Gutiérrez CA, Morales A, Gómez Y, Villalobos MC, Borjas L, Delgado W, Myers A, Barrera-Saldaña HA. CFTR mutations in three Latin American countries. *Am J Med Genet* 2000; 91: 4, 277-9.
45. Villarreal MT, Chávez M, Lezana JL, Cuevas F, Carnevale A, Córdova E, Del Angel R, Orozco L. G542X mutation in Mexican cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 1996; 49: 54-56.

46. Casals T, Nunes V, Palacios A, Gimenez J, Gaona A, Ibanez N, Morral N and Estivill X. Cystic fibrosis in Spain: High frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum Genet* 1993; 91: 66-70.
47. Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 1986; 71: 203-7.
48. Lisker R, Ramírez E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
49. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Suoza DW. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990; 63: 827-34.
50. Amaral MD. CFTR and chaperone: processing and degradation. *J Mol Neurosci* 2004; 23: 41-8.
51. Hiestad DM, Sorcher EJ, Huang Z, Wang Y, Haley BE. Use of 2-N³ATP to identify the site of ATP interaction on nucleotide binding domain-2 from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pediatr Pulmonol* 1994; 10: 42.
52. Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. The two nucleotide-binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 1995; 270: 1711-17.
53. Mansoura MK, Smith SS, Choi AD, Richards NW, Strong TV, Drum ML, Collins FS, Dawson DC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) anion binding has a probe of the pore. *Biophys J* 1998; 74: 1320-32.
54. Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B and Cuppens H. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1761-9.
55. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin TL and Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR. *New Engl J Med* 2002; 347: 401-7.
56. Sheppard N D, Ostedgaard S L. Understanding how cystic fibrosis mutations caused a loss of chloride channel function. *Mol Med Today* 1996; 290-97.

57. Kerem B, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517-22.
58. Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui LC and Durie P. Genotype and phenotype correlation in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1857-64.
59. Doull I. Recent advances in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001; 85: 62-66.
60. Noone PG and Knowles MR. "CFTR-opathies": disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res* 2001; 2: 328-32.
61. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67: 117-33
62. Sontag MK, Accurso FJ. Gene modifiers in pediatrics: application to cystic fibrosis. *Adv Pediatr* 2004; 51: 5-36.
63. Cutting GR. Modifier genetics: Cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:237-60.
64. Drumm ML. Modifier genes and variation in cystic fibrosis. *Respir Res* 2001; 2: 125-28.
65. Acton JD, Wilmott RW. Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes. *Pediatr Res Rev* 2001; 2: 332-39.
66. Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznares I, Casals T, Larriba S, Mercier B, Cutting GR, Krebsova A, Macek M Jr, Langfelder-Schwind E, Marshall CB, DeCelle-Germana J, Claustres M, Palacio A, Bal J, Nowakowska A, Ferec C, Estivill X, Durie P, Tsui LC. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 1999; 22: 128-9.
67. Salvatore S, Scudiero O and Caastaldo G. Genotype-Phenotype Correlation in cystic fibrosis: The role of modifier genes. *Am J Med Genet* 2002; 111: 88-95.
68. Henry MT, Cave S, Rendall J et al. An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(4):273-8.

69. Mahadeva R, Sharples L, Ross-Russell RI, Webb AK, Bilton D, Lomas DA. Association of α_1 -antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2001;56:53-58.
70. Rabin M, Watson M, Kidd V et al. Regional location of alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antitrypsin genes on human chromosome 14. *Somat Cell Mol Genet*. 1986;12(2):209-14.
71. Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava, Dusser D, Hubert D. HLA ClassII Polimorphism in Cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respr Crit Care Med* 1999; 159: 1464-1468.
72. Garred P, Pressler T, Langg S, Madsen HO, Moser C, Laursen I, Balstrup F, Coch C, Koch Ch. Mannose-binding lectin (MBL) Therapia in an MBL-Deficient Patient Whit severe Cystic fibrosis lung disease. *Pediat Pulmonol* 2002; 33:201-207.
73. Frangolias DD, Ruan J, et al. α_1 -Antitrypsin Deficiency Alleles in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(3 Pt 1):390-6.
74. Cook PJ. Genetic aspects of the Pi system. *Postgrad Med J*. 1974;50(584):362-4.
75. Carrell RW. Alpha 1-Antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *J Clin Invest*. 1986;78(6):1427-31.
76. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353(14):1443-53.
77. Courtney JM, Plant BJ, Morgan K. Association of Improved Pulmonary Phenotype in Irish Cystic Fibrosis Patients with a 3'enhancer polymorphism in alpha-1-antitrypsin. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41:584-591.
78. Döring G, Krogh-Johansen H, et al. Allotypes of alpha1-antitrypson in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for deltaF508. *Pediatr Pulmonol*. 1994;18:3-7.
79. Mahadeva R, Westerbeek RC, et al. α_1 -Antitrypsin deficiency alleles and the Taq-1 G>A allele in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 1998; 11:873-879.
80. Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, Lomas DA, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax*. 1998; 53:1022-1024.

81. Davies J, Alton E, Griesenbach Uta. Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med.* 2005;(Suppl. 45):47-54.
82. Gibson LE, Cooke RE (). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilorcarpine iontophoresis. *Pediatrics.* 1959; 23:545-549
83. Van der Kamer JH, ten Bokkel Hiunink H Weyers HA. Rapid method for the determination of fat in faeces. *J Biol Chem* 177: 347-355
84. Blin N y D Sttaford. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res.* 1976;3:2303-2308.
85. Maniatis T, Sambrook. 1989 *Molecular cloning, a Laboratory manual.* VII 2° ed Cold Spring Harbor LABORATORY Press. USA pp 7.87.
86. Friedman KJ, Highsmith WE, Silverman LM, 272 cystic fibrosis mutations n Europe of the mayor CF mutation and of its associated (1991) Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 37:1-6
87. Heaney DL, Flume P, Hamilton L, Lyon E, Wolff DJ. Consultation in Molecular Diagnostics. *J Molecular Diagnosis* 2006; 8 (1): 137-40
88. Orita MS, Suski Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-79.
89. Sanz J, Steiner B, Gallati S. Two buffer system-based SSCP/HD analysis of DNA and RNA: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis. *The European Working Group on CFTR Expression* 2003:1-9
90. Sanger FR, Nicken S, Coulson A.1997. DNA sequencig with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74:5463-5467
91. Gyllensten UB, Erlich HA (1988) Generation of ssDNA by the PCR and its aplication to direct sequencing of the HLADQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7652-7656
92. HGVS. Human Genome Variation Society, 2006; Retrieved December 12, 2006 from <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdj/>

93. Brasfield D, Hicks G, Soong S, Tiller R. The Chest Roentgenogram in Cystic Fibrosis: A New Scoring System. *Pediatrics*. 1979; Jan;63(1):24-9.
94. Quint A, Lerer I, Sagi M, Abeliovichbn D. Mutation Spectrum in Jewish Cystic Fibrosis Patients in Israel: Implication to carrier screening. *Am J Med Genet A* 2005; 30: 136 (3): 246-48.
95. Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercort B, Denine R, Grangaud JP. CFTR mutations in Algerian population. *J Cyst Fibros* 2008; 7(1) : 54-9.
96. Chávez-Saldaña M, Yokoyama E, Lezana J.L, Carnevale A, Viguera R.M. López M, Orozco L. *CFTR* allelic heterogeneity in mexican patients with cystic fibrosis: implications for molecular screening. *Rev Inv Clin* 2010. EN PRENSA
97. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta-F508) in European populations. *Nature Genet*. 1994; 7: 169-175
98. Orozco L, González-Herrera L, Chávez M, Velázquez R, Lezana JL, Saldaña Y, Villarreal T, Carnevale C. XV-2C/KM-19 haplotype analysis of Cystic fibrosis mutation in Mexican patients. *Am J Med Genet* . 2001; 102: 277-281.
99. Braun AT, FarrelPM, Ferec C, Audrezet MP, Lxova A, Li Z, Kosorok MR, Rosenberg MA, Gershan WM. Cystic fibrosis mutation and genotype-pulmonary phenotype analysis. *J Cystic Fibrosis* 2006; 5: 33-41.
100. Schrijver I, Ramalingman S, Sankaran R, Swanson S, Dunlop CLM, Keiles S, Moss RB, Oehlert J, Gardner P, Wassman ER and Kammesheidt A. Diagnostic testing by CFTR gene mutation analysis in a large group of Hispanics. *J Mol Diag* 2005; 7(2): 289-99.
101. Sabato F, Irani AM, Bukaveckas BI, Schwartz LB, Wilkinson DS, Ferreira-Gonzalez A. A simple and rapid genotyping assay for simultaneous detection of two *ADRB2* allelic variants using fluorescence resonance energy transfer probes and melting curve analysis. *J Mol Diagn* 2008; 10(3)258-264.

CFTR allelic heterogeneity in mexican patients with cystic fibrosis: implications for molecular screening

Margarita Chávez-Saldaña,^{*†} Emiy Yokoyama,^{*} José Luis Lezana,^{‡§} Alessandra Carnevale,^{||}
Miguel Macías,^{*} Rosa M. Viguera,^{*} Marisol López,[¶] Lorena Orozco^{**}

^{*}Subdirección de Experimentación Médica, Instituto Nacional de Pediatría S.S., Mexico City.

[†]Ph. D. Program in Biological Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City.

[‡]Department of Pneumology, Hospital Infantil de México Federico Gómez S.S. Mexico City.

[§]Asociación Mexicana de Fibrosis Quística. A. C. Mexico City.

^{||}Research Director, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City.

[¶]Department of Biological Systems, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco Campus, Mexico City.

^{**}Laboratory of Complex Diseases, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City.

ABSTRACT

Introduction. Cystic fibrosis, the most common autosomal recessive disorder, is caused by defects in the CF transmembrane conductance regulator gene (*CFTR*) that encodes a chloride channel. To date, over 1,600 mutations have been described related to the causative gene of CF, showing a variable frequency among populations. In a previous extensive analysis of the *CFTR* locus in 97 Mexican patients, 34 different mutations (75% of CF alleles) were found using several strategies for mutation screening; however, 63% had at least an uncharacterized allele. Despite the combined technologies used, there are still a great number of unknown mutations in the Mexican population. **Objective.** Screening of the *CFTR* gene to provide additional evidence of the mutational wide spectrum responsible for CF in Mexican patients. **Material and Methods.** In this study, the number of unrelated CF patients was increased to 230, 133 new cases and the 97 previously reported to include 63% with at least an uncharacterized allele. Additional tools were used to improve the detection rate of CF mutations, such as a commercial kit for 36 mutations plus a single chain conformational polymorphism method and DNA sequencing. **Results.** By using a combination of these strategies we characterized 77.7% of all the CF alleles, resulting in a total of 46 different mutations detected, including the identification of 12 additional mutations (p.R334W, p.A455E, c.3120+1G > A, c.3272-26A > G, c.711+1G > T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X and p.R347P, p.D1152H and p.T1036N). Although these 12 mutations have been reported in other populations, they have not yet been reported in Mexican patients. This report shows that Mexico has one of the widest spectra of *CFTR* mutations worldwide. The knowledge of the ethnic and geographic distribution of

Heterogeneidad alélica de CFTR en pacientes mexicanos con fibrosis quística: implicaciones para el tamizaje molecular

RESUMEN

Introducción. La fibrosis quística, la enfermedad autosómica recesiva más común, es ocasionada por defectos en el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*), que codifica para un canal de cloro. Hasta la fecha se han descrito más de 1,600 mutaciones relacionadas con este gen, que muestran una frecuencia variable entre las distintas poblaciones. En un análisis previo del locus *CFTR* en 97 pacientes mexicanos, fueron detectadas 34 diferentes mutaciones (75% de los alelos FQ) mediante diversas estrategias; sin embargo, 63% tenían al menos un alelo sin caracterizar. A pesar de la combinación de diferentes tecnologías utilizadas, aún hay un gran número de mutaciones desconocidas en la población mexicana. **Objetivo.** Tamizar el gen *CFTR* como una evidencia adicional del amplio espectro mutacional responsable de la FQ en pacientes mexicanos. **Material y Métodos.** En este estudio se incluyeron 230 pacientes no relacionados con FQ, 133 casos nuevos y 97 previamente reportados, de estos últimos 63.9% tenían al menos un alelo no caracterizado. Para mejorar la tasa de detección de las mutaciones FQ se utilizó un kit comercial para 36 mutaciones y el método de polimorfismo conformacional de cadena sencilla, seguido de secuenciación. **Resultados.** Al utilizar una combinación de estrategias, en este trabajo se logró caracterizar 77.7% de todos los alelos FQ, detectando un total de 46 mutaciones diferentes, incluyendo la identificación de 12 mutaciones adicionales (p.R334W, p.A455E, c.3120+1G > A, c.3272-26A > G, c.711+1G > T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T,

CFTR mutations in this population will allow the development of more effective methods for diagnosis and treatment.

Key words. *CFTR* gene. Mutations. Cystic fibrosis. Mexican patients.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF, MIM# 219700), the most common of autosomal recessive diseases, has an incidence in Caucasians of 1 in 2,000–4,000 live newborns, and shows a variable frequency among populations.^{1,2} The incidence of this disorder in Latin America is unknown; however, in Mexico, the Mexican Cystic Fibrosis Association (AMFQ) has estimated that it is approximately 1 in 8,000 live newborns (personal communication).

CF is caused by defects in the CF transmembrane conductance regulator gene (*CFTR*, MIM# 602421), which encodes a chloride channel. Defects in the *CFTR* gene result in chronic obstructive lung problems, pancreatic failure, elevated sweat electrolytes and male infertility.³⁻⁵ Clinically, the disease has a variable expressivity that ranges from mild to severe.⁶

To date, over 1,600 different mutations have been reported for the *CFTR* gene.^{7,8} The distribution and frequency of the mutations in the Mexican population is different from those reported for populations that are genetically homogeneous⁹⁻¹³ or admixtures, such as those from Brazil, Colombia, Uruguay, Argentina and Ecuador.¹⁴⁻¹⁸ In an extensive *CFTR* locus analysis of 97 Mexican CF patients, Orozco, *et al.*⁹ found that this population displayed a wide spectrum of mutations in the *CFTR* gene, with 34 different mutations having been characterized; however, only 75% of the *CFTR* alleles were identified. In populations such as Mexican, with high heterogeneity derived from admixture, it is possible that several techniques must be combined in order to detect and characterize a greater number of mutations in patients with CF.¹⁹ In the present study, we provide additional evidence of the mutational wide spectrum responsible for CF in Mexican patients increasing the number of mutations of the previously characterized 34 to 46.

p.R1162X and p.R347P, p.D1152H and p.T1036N). Aunque estas 12 mutaciones han sido reportadas en otras poblaciones, ellas no habían sido reportadas en pacientes mexicanos. Este reporte muestra que México presenta uno de los espectros más amplios de mutaciones de *CFTR* a nivel mundial. El conocimiento de la distribución étnica y geográfica de las mutaciones de *CFTR* en esta población permitirá el desarrollo de métodos más eficaces para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Palabras clave. Gen *CFTR*. Mutaciones. Fibrosis quística. Pacientes mexicanos.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 230 CF patients were studied, including 133 new cases and 97 patients previously reported (35 full-characterized patients and 62 with at least one uncharacterized allele).⁹ The previously full-characterized patients were included in order to avoid a possible bias to estimate frequencies of the *CFTR* mutations.

In this study, 123 were males (53.5%) and 107 females (46.5%), with a mean (\pm SD) age at onset of 4.6 ± 5.8 years. The patients included in this study were recruited from the AMFQ, Hospital Infantil de México and Instituto Nacional de Pediatría in Mexico City; all of them were of Mexican Mestizo origin. Diagnosis was based on abnormally elevated sweat chloride concentrations (> 60 mEq/l) and on clinical symptoms typical of CF.^{20,21} Patients had chloride sweat values ranging from 62 to 129 mEq/l. Infections by *Pseudomonas aeruginosa* (*Pae*) were identified in 121 patients (52.6%) and pancreatic failure was found in 131 patients (56.9%). The study was conducted with the approval of the ethics and research committees. All participating individuals or their parents or legal guardians signed an informed consent form.

Samples

DNA was isolated from the peripheral blood lymphocytes from all new CF patients following conventional methods.²² Mutation detection was performed in 195 patients with at least one uncharacterized allele (133 new cases and 62 uncharacterized or partially characterized in Orozco, *et al.*).⁹

Detection of known mutations

To identify *CFTR* known mutations, we used a kit containing 36 *CFTR* mutations and the three Tn

alleles (5T, 7T and 9T) of intron 8. The screening was performed through a reverse dot blot according to the manufacturer's instructions (Kit Inno-LiPa *CFTR*/36, INNOGENETICS, NV, Brussels, Belgium).²³ Analysis was carried out in duplicate.

Complete Genetic Screening of *CFTR* Gene

After screening by the method mentioned above, we analyzed the DNA from those cases having still at least one unknown allele. We used single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis²⁴ on MDE™ gel matrix and silver staining of DNA (Silver Stain Kit, Bio-Rad Laboratories Richmond, CA). We screened first priority mutations in *CFTR* exons 4, 7, 10, 11, 13, 17b, 20, 21,²⁵ followed by exons 1, 2, 6a, 6b, 16, 17a and 18, including introns 8 and 19 as previously described. Abnormal band shift electrophoretic patterns were direct DNA sequenced using the ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing reaction kit (v.3) (Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

Nomenclature

For mutation nomenclature the recommendations provided by the Human Genome Variation Society (HGVS)²⁶ were followed.

RESULTS

Molecular Screening

One hundred and ninety-five patients with at least one uncharacterized allele (133 new cases and 62 patients from those previously reported) were screened for CF mutations using a two-tier approach: *CFTR*/36 kit analysis combined with SSCP analysis. Both the wild type and mutant bands for every CF mutation were searched, using the *CFTR*/36 kit (Figure 1). Nineteen mutations were detected using the *CFTR*/36 kit (Table 1). It is worth noting that of the patients for whom Tn polymorphism were analyzed, the vast majority carried the 7T and 9T alleles (92%) (Table1). In this first step, both alleles were fully characterized in 110 patients, including those 35 previously reported. Of the remaining 120 analyzed with SSCP, eight of them were informative for exons 7, 11, 13a, 17a, 18, and 20 and for intron 19 and the presence of c.3272-26A > G, p.R334W, p.R347P, p.S549N, c.2055_2063del, p.T1036N, p.D1152H and p.W1282X mutations was

documented by automated direct DNA sequencing (Table 1). Although the mutations p.R334W, p.A455E, c.3120+1G > A, c.3272-26A > G, c.711+1G > T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X and p.R347P, p.D1152H and p.T1036N, have been reported in other populations, they had not yet been reported in Mexican patients. Thus, the results from the present screening include 12 distinct mutations, resulting in a total of 46 different mutations detected in the Mexican population sampled. As follows, by using a combination of research strategies over 77% of CF alleles were characterized (Table1).

Seven mutations showed a frequency greater than 1%: p.F508del was the most common mutation (44.6%), followed by p.G542X (7.4%), p.N1303K (2.4%), p.I507del (1.5%), p.R334W (1.5%), p.S549N (1.5%) and c.3849 + 10kbC > T (1.3%) (Table1). These seven mutations represented 60.2% (277/460) of all Mexican CF alleles studied in this work. Except for p.F508del, these mutations are more frequent in Mexican patients than in the worldwide population or in other Hispanic populations (Table 2). The remaining 39 mutations accounted only for 17.5% of identified CF alleles. Mutations c.621 + 1G > T, c.394delTT, c.2789 + 5G > A, c.3659delC, c.2143delT, p.E60X, c.2184delA, c.711 + 5G > A, c.1717-1G>A, c.*CFTR*del2,3 (21kb), c.3905insT, p.R560T, c.1898 + 1G > A and p.S1251N, which were contained in the kit, were not detected in our patients.

Forty-one patients (17.8%) were homozygous for p.F508del and 123 (53.5%) were classified as being compound heterozygous. Regarding the p.G542X mutation, 5 patients (2.2%) were homozygous and 24 (10.4%) heterozygous.

DISCUSSION

Mexicans are an admixed population with a very complex genetic structure, where Native American genes account for 51%, European genes for 45.4% and African genes for 3.7%²⁷. Perhaps because of this complexity, Mexico has a very broad spectrum of *CFTR* mutations, including some found only in Mexicans.^{9,28} Therefore detection of *CFTR* mutations in the Mexican patients is complicated. In this study, the analysis of the most common mutations (p.F508del, p.G542X, p.N1303K, p.R553X and p.G551D), allowed the characterization of only ~50% of the affected chromosomes, whereas in Caucasians, the search for the same mutations could achieve a 98% detection rate of affected alleles.^{8,29,30} In popula-

Table 1. Frequency of *CFTR* gene mutations in 230 Mexican patients.

Mutations	Location in <i>CFTR</i> gen	Affected alleles/number of chromosomes. In Orozco, <i>et al.</i> , 2000 (n = 194)	Affected alleles/ number of chromosomes in this work (n = 350)	Affected alleles/total of chromosomes (n)	Total frequency (%)	Detection Systems
p.F508del	Exon 10	79/194	126/350	205/460	44.6	KIT-CFTR/36
p.G542X	Exon 11	12/194	22/350	34/460	7.4	KIT-CFTR/36
p.N1303K	Exon 21	4/194	7/350	11/460	2.40	KIT-CFTR/36
p.S549N	Exon 11	5/194	2/350	7/460	1.52	SSCP
p.1507del	Exon 10	5/194	2/350	7/460	1.52	mHET, KIT-CFTR/36
p.R334W*	Exon 7	-	7/350	7/460	1.52	SSCP, KIT-CFTR/36
c.3849 + 10kbC > T	Intron 19	1/194	5/350	6/460	1.3	KIT-CFTR/36, mHET
c.3199_3204del	Exon 17a	2/194	2/350	4/460	0.87	KIT-CFTR/36
p.A455E*	Exon 9	-	4/350	4/460	0.87	KIT-CFTR/36
p.I148T	Exon 4	3/194	1/350	4/460	0.87	mHET, KIT-CFTR/36
p.R75X	Exon 3	3/194	-	3/194**	1.54**	mHET
c.406 - 1G > A	Intron 3	3/194	-	3/194**	1.54**	mHET
c.2055_2063del	Exon 13	2/194	1/350	3/460	0.65	SSCP
c.1078delT	Exon 7	1/194	1/350	2/460	0.43	mHET, KIT-CFTR/36
c.2183AA > G	Exon 13	2/194	-	2/460	0.43	mHET, KIT-CFTR/36
c.3120 + 1G > A*	Intron 16	-	2/350	2/460	0.43	KIT-CFTR/36
c.3272 - 26A > G*	Intron 17a	-	2/350	2/460	0.43	KIT-CFTR/36, SSCP
c.711 + 1G > T*	Intron 5	-	2/350	2/460	0.43	KIT-CFTR/36
c.935delA	Exon 6b	2/194	-	2/460	0.43	mHET, SSCP
p.G85E	Exon 3	1/194	1/350	2/460	0.43	mHET, KIT-CFTR/36
p.I506T	Exon 10	2/194	-	2/460	0.43	SSCP
p.Q552X*	Exon 11	-	2/350	2/460	0.43	KIT-CFTR/36
p.W1282X*	Exon 20	-	2/350	2/460	0.43	SSCP, KIT-CFTR/36
c.1716G > A	Exon 10	1/194	-	1/194**	0.51**	mHET
c.1924_1930del	Exon 13	1/194	-	1/460	0.21	SSCP
c.297 - 1G > A	Intron 2	1/194	-	1/194**	0.51**	mHET
c.4160_4161insGGGG	Exon 22	1/194	-	1/194**	0.51**	mHET
c.846delT	Exon 6a	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.D1152H*	Exon 18	-	1/350	1/460	0.21	SSCP
p.G551D	Exon 11	1/194	-	1/460	0.21	SSCP
p.G551S	Exon 11	1/194	-	1/460	0.21	SSCP
p.H199Y	Exon 6a	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
c.IVS8-5T*	Intron 8	-	1/350	1/460	0.21	SSCP
p.L558S	Exon 11	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.P750L	Exon 13	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.R1162X*	Exon 19	-	1/350	1/460	0.21	KIT-CFTR/36
p.R117H	Exon 4	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.R347P*	Exon 7	-	1/350	1/460	0.21	SSCP, KIT-CFTR/36
p.R553X	Exon 11	1/194	-	1/460	0.21	SSCP
p.R75Q	Exon 3	1/194	-	1/194**	0.51**	mHET
p.T1036N*	Exon 17a	-	1/350	1/460	0.21	SSCP
p.V754 M	Exon 13	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.W1069X	Exon 17b	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.W1098C	Exon 17b	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP
p.W1204X	Exon 19	1/194	-	1/194**	0.51**	mHET
p.Y1092X	Exon 17b	1/194	-	1/460	0.21	mHET, SSCP

*Mutations detected in this study. **Frequency from 194 alleles reported by Orozco, *et al.*, 2000 (these mutations were not screened in this study).

mHET: Multiplex Heteroduplex Analysis. SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism.

Table 2. Comparison of the frequencies of the most common *CFTR* gene mutations in 230 (460 chromosomes) Mexican patients with those in other populations.

Mutations	Mexicans This study	Worldwide ⁷ (%)	Frequency (%) in Latin Americans ³²	Frequency (%) in patients of Spanish Ancestry ³³
p.F508del	44.60	66.00	46.69	51.74
p.G542X	7.40	2.40	5.08	7.70
p.I507del	1.52	0.20	0.23	1.07
p.N1303K	2.40	1.30	1.65	2.92
p.R334W*	1.52	0.10	0.90	1.79
p.S549N	1.52	0.10	0.14	0.00
c.3849 + 10kbC > T	1.30	0.20	0.41	0.00
TOTAL	60.30	70.30	55.10	65.22

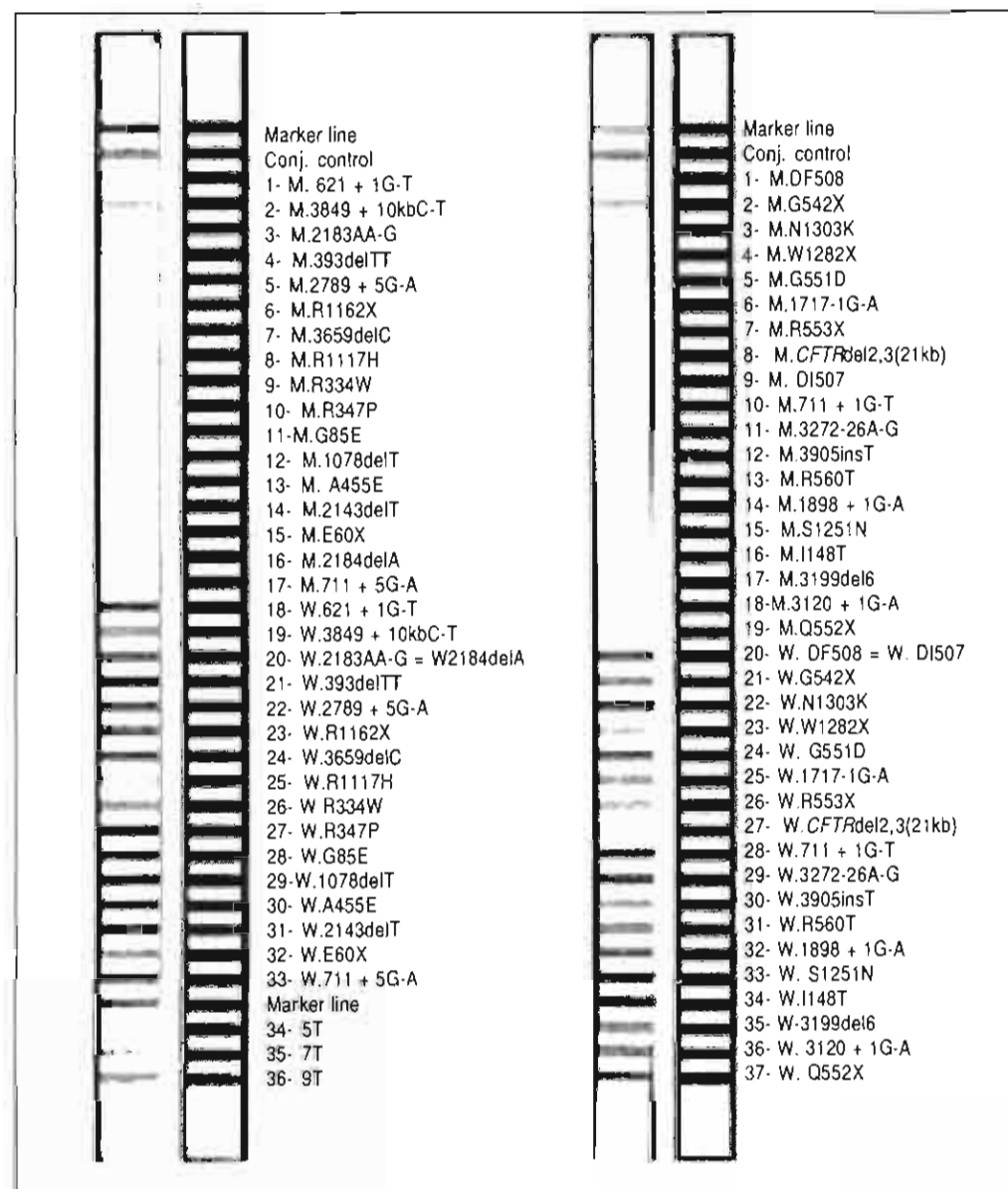


Figure 1. Detection of known mutations using the assay's strips (Inno-Lipa CFTR36 assay). An example of a heterozygous compound patient p.G542X/c.3949 + 10kbC > T. The patient shows the polymorphisms 7T and 9T.

tions with a high heterogeneity, such as in Mexico, a variety of methodologies should be combined to improve the detection rate of the *CFTR* mutations.

In fact, in this study different strategies were used in order to improve the detection rate of *CFTR* mutations in the 230 Mexican patients, and we found 46 mutations, 12 of them (p.R334W, p.A455E, c.3120 + G > A, c.3272-26A > G, c.711 + 1G > T, p.Q552X, p.W1282X, c.IVS8-5T, p.R1162X and p.R347P, p.D1152H and p.T1036N) had not yet been reported previously for Mexican people. Overall, our strategy led to the identification of 77.7% of all affected alleles, which document that Mexico has one of the widest spectrums of *CFTR* mutations worldwide due in part to the great ethnic diversity and the heterogeneity in the genetic background. With the combination of these technologies it was possible to identify seven mutations that showed a frequency greater than 1% in the Mexican population: p.F508del (44.6%), p.G542X (7.4%), p.N1303K (2.4%), p.I507del (1.5%), p.S549N (1.5%), p.R334W (1.5%) and c.3849+10kbC > T(1.3%) which is relevant to optimize future screening of the *CFTR* mutations in populations like ours.

It should be noted that despite the combination of techniques used, ~23% of the alleles remained still uncharacterized, showing that there are still a great number of unknown alleles, perhaps rare mutations, however we cannot rule out the possibility that in the Mexican population there could exist an undetermined endemic mutation with a high frequency. On the other hand, in this study only 19 of the 36 mutations included in the kit *CFTR36* were detected, may be due to the fact that the kit was fashioned specifically for Caucasian population. Therefore it is necessary to identify all *CFTR* mutations affecting Mexican population to design a kit targeted for our population, including the most frequent mutations, and the remaining described in this study (Table 1). Improvements in the mutational screening analysis and strategies employed, as shown by the use of the two technologies in this study, will aid in elucidating the mutations involved in CF in admixed populations. Finally, more detailed knowledge of the ethnic and geographical distribution of *CFTR* mutations will improve the CF detection programs in a given population³¹⁻³³ and allow the development of more effective methods of diagnosis and treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, Con-

sejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (SA-LUD 2003-C01-066). A scholarship (No. 89745) was awarded to MCHS.

Margarita Chávez Saldaña submitted this article to fulfill the graduate requirement for a PhD degree at Doctorado en Ciencias Biológicas of Universidad Autónoma Metropolitana.

REFERENCES

1. Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Rimoin DL, Connor MJ, Pyeritz RE (Eds.) Principles and practice of medical genetics. 5th Ed. London: Churchill-Livingston: Emery and Rimoin's; 2007, p. 1561-606.
2. Welsh MJ, Ramsey BW, Accuso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: C Scriver, A Beaudet, W Sly, D Valle (Eds.) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th Ed. New York: McGraw-Hill Co: 2001, p. 5121-88.
3. Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2007. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1058-61.
4. Schrijver I, Ramalingam S, Sankaran R, Swanson S, Dunlop CLM, Keiles S, Moss RB, et al. Diagnostic testing by *CFTR* gene mutation analysis in a large group of Hispanics. *J Mol Diag* 2005; 7(2): 289-99.
5. Kerem E, Kerem B. Genotype-Phenotype correlation in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 1996; 22: 387-95.
6. Braun AT, Farrell PM, Ferec C, Audrezet MP, Lxova A, Li Z, Kosorok MR, et al. Cystic fibrosis mutation and genotype-pulmonary phenotype analysis. *J Cystic Fibrosis* 2006; 5: 33-41.
7. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. <http://www.genet.sickkids.on.ca>
8. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A world wide analysis of the *CFTR* mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19: 575-606.
9. Orozco L, Velázquez R, Zielenski J, Tsui LCH, Chávez M, Lezana JL, Saldaña Y, Hernández E, Carnevale A. Spectrum of *CFTR* mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160ins-GGGG and 297-1G@A). *Hum Genet* 2000; 106: 360-65.
10. Stuhmann M, Dörk T, Frühwirth M, Golla A, Skawran B, Antoni W, Ebhardt M, et al. Detection of 100% of the *CFTR* mutations in 63 CF families from Tyrol. *Clin Genet* 2008; 52(4): 240-6.
11. Storm K, Moens E, Vits L, De Vlieger H, Delaere G, D'Hollander M, Wuyts W, et al. High incidence of the *CFTR* mutations 3272-26A→G and L927P in Belgian cystic fibrosis patients, and identification of three new *CFTR* mutations (186-2A→G E588V, and 1671insTATCA). *J Cyst Fibros* 2007; 6(6): 371-5.
12. Duguéproux I, Bellis G, Férec C, Gillet D, Scotet V, De Braeckelcer M. Relationship between genotype and phenotype for the *CFTR* gene W846X mutation. *J Med Genet* 2002; 39(6). On line doi:10.1136/jmg.39.6.e32.
13. Quint A, Lerer I, Sagı M, Abcliovich D. Mutation spectrum in Jewish cystic fibrosis patients in Israel: implication to carrier screening. *Am J Med Genet A* 2005; 136(3): 246-8.
14. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the *CFTR* gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros* 2008; 7(1): 15-22.
15. Jay LM, Mateus H, Fonseca D, Restrepo CM, Keyeux G. PCR-heterodúplex por agrupamiento: Implementación de un método de identificación de portadores de la mutación más común

- causal de fibrosis quística en Colombia. *Colomb Med* 2006; 37 (3): 176-82.
16. Luzardo G, Aznarez I, Crispino B, Mimbacas A, Martínez L, Poggio R, Zielenski J, et al. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet Mol Res* 2002; 1(1): 32-8.
 17. Ramírez O, Ghio A, Melano A, De Botelli M, Dodelson R. Molecular diagnosis of cystic fibrosis in 93 Argentinean patients and detection of heterozygotes in affected families. Impact on health services and therapeutic advances. *Arch Argent Pediatr* 2008; 106(4): 310-9.
 18. Valle EP, Burgos RI, Valle JR, Béjar DE, Ruí-Cabezas JC. Analysis of CFTR gene mutations and cystic fibrosis incidence in the Ecuadorian population. *Invest Clin* 2007; 48(1): 91-8.
 19. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 179-96.
 20. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilorcarpine iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545-9.
 21. Decaestecker K, Decaestecker E, Castellani C, Jaspers M, Cuppens H, De Boeck K. Genotype/phenotype correlation of the G85E mutation in a large cohort of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2004; 23: 679-84.
 22. Blin N, Sitafor D. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3: 2303-8.
 23. Heaney DL, Flume P, Hamilton L, Lyon E, Wolff DJ. Consultation in Molecular Diagnostics. *J Molecular Diagnosis* 2006; 8(1): 137-40.
 24. Orita MS, Suski Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
 25. Sanz J, Steiner B, Gallati S. Two buffer system-based SSCP/HD analysis of DNA and RNA: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis. The European Working Group on CFTR Expression 2003:1-9.
 26. HGVS. Human Genome Variation Society, 2006; Retrieved December 12, 2006 from <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdl/>
 27. Lisker R, Ramírez E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
 28. Orozco L, Zielenski, Markiewicz D, Villarreal T, Tsui L-Ch, Lezana JL, Del Angel RM. Two Novel Frameshift Deletions (1924del7, 2055del9-A) in CFTR Gene in Mexican Cystic Fibrosis Patients. *Hum Mut* 1997; 10: 239-40.
 29. Quint A, Lerer I, Sagi M, Abeliovich D. Mutation Spectrum in Jewish Cystic Fibrosis Patients in Israel: Implication to carrier screening. *Am J Med Genet A* 2005; 30: 136(3): 246-8.
 30. Loumi O, Ferec C, Mereier B, Creff J, Fercort B, Denine R, Grangaud JP. CFTR mutations in Algerian population. *J Cyst Fibros* 2008; 7(1): 54-9
 31. Dequeker E, Stuhmann M, Morris M, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders- updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 51-65.
 32. Pérez MM, Luna MC, Piveta OH, Keyeux G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros* 2007; 6(3): 194-208.
 33. Alonso M, Heine-Suñer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD, et al. Spectrum of mutations in the CFTR Gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* 2007; 71(2). 194-201.

Correspondence and reprint request:

Margarita Chávez Saldaña, MSc.
 Subdirección de Medicina Experimental
 Instituto Nacional de Pediatría
 Insurgentes Sur No. 3700-C
 Col. Insurgentes-Cuicuilco, Coyoacán
 04530, México, D.F.
 Tel.: 1084-0900 ext. 1453
 Fax: 1084-3883
 E-mail: mchavez_s2003@yahoo.com.mx

Recibido
Aceptado

TESIS COPILCO
TESIS
ENCUADERNACIÓN

Medicina No 24 Interior P.B. Copilco Universidad
Coyoacan, 04360, México, D.F.
Tels. 5659 3435, 5658 1553
tesiscopilco@hotmail.com
tesis@tesiscopilco.com