



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**Análisis de genes modificadores de la respuesta inflamatoria
pulmonar en fibrosis quística**

TESIS

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA

CELIA NOHEMÍ SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

México, D.F. 2009

Esta tesis fue dirigida por el Dr. Miguel Ángel Reyes López y la Dra. Rocío Ortiz López y se llevó a cabo en el laboratorio de Medicina de Conservación del Centro de Biotecnología Genómica en Reynosa, Tamps., perteneciente a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, y en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., en colaboración con el Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas (CEPREP), del Hospital Universitario, Monterrey, N.L.

Agradecemos los apoyos de los proyectos CONACYT No. Reg. 62291, PAICyT SA No. Reg. 1648-07, SIP-IPN No. Reg. 20080682, CONACYT apoyos especiales formación académica No. Reg. 48497, así como las becas otorgadas por CONACYT, PIFI-IPN y Universia Santander, durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

DEDICATORIA

A mi esposo Hugo y mis hijos Karla y David: Ustedes son mi razón de ser y la fuerza que me impulsa siempre a seguir adelante y disfrutar de cada momento de mi vida.

A mis padres y hermanos, por su amor y su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Dr. Miguel Ángel Reyes López, gracias por su apoyo a lo largo del desarrollo de la tesis, por la confianza depositada en mi persona, y por cada logro alcanzado. Su apoyo en la asistencia de congresos me permitió no sólo conocer maravillosos lugares, sino establecer contactos con científicos muy importantes en mi área de estudio a nivel internacional, quienes a su vez me animaron y me dieron consejos.

A mi directora de tesis la Dra. Rocío Ortiz. Tu amistad, apoyo y consejos fueron muy importantes para mí, me transmitiste tu entusiasmo por la investigación y el aprendizaje permanente, pero sobre todo, me enseñaste a no rendirme nunca.

A la Dra. Herminia Martínez, Jefa del Depto. de Bioquímica y Medicina Molecular, quien concretó el convenio entre la UANL y el IPN y nos permitió a mis amigas y a mí realizar el doctorado, además del uso de materiales e instalaciones para el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Bustamante por su apoyo en la parte clínica. Su dedicación a los pacientes con FQ es un ejemplo a seguir.

A Alí, Vicky, Juany, Norma y Lupita, a los compañeros de UDM y del departamento de Bioquímica, pero especialmente a Carmen y Lulú. La hemos pasado muy bien. Espero que nuestros lazos de amistad perduren siempre.

Al personal de la ENCB, especialmente a Emma por su apoyo, y a mis sinodales por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Scott Sagel del Children's Hospital de Denver, Colorado, EUA; por recibirme en su laboratorio y apoyarme con la parte del análisis de esputo.

A la asociación Regiomontana de Fibrosis Quística A.C. y a los pacientes.

Al Dr. Víctor Treviño y la M. en C. Clara Ríos por su ayuda en la parte estadística.

ÍNDICE

Indice de tablas	vii
Indice de figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Genética de la fibrosis quística	2
1.2.1 Identificación del gen de la FQ	2
1.2.2 Mutaciones detectadas en el RCTFQ	3
1.2.3 Mutaciones en RCTFQ en México	3
1.3 Estructura y función del RCTFQ	6
1.3.1 Procesamiento celular del RCTFQ	8
1.3.2 Efectos de las mutaciones sobre el RCTFQ	10
1.4 Fisiopatología de la FQ	12
1.4.1 Modelos del funcionamiento anormal del RCTFQ en epitelio pulmonar	14
1.5 Correlación entre el genotipo en RCTFQ y el fenotipo de la FQ	16
1.5.1 Correlación fenotipo pulmonar-genotipo RCTFQ	17
1.6 Genes modificadores	18
1.6.1 Abordaje en el estudio de genes modificadores	19

	Página
1.6.2 Selección de genes modificadores: evaluación del mecanismo de la inflamación pulmonar	21
1.6.3 Lectina de Unión a Manosa (MBL)	24
1.6.4 Interleucina 8 (IL-8)	25
1.6.5 Factor de necrosis Tumoral alfa (TNF α)	27
1.6.6 α -1 Antitripsina (AAT)	28
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	30
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1 Hipótesis	32
3.2 Objetivo general	32
3.3 Objetivos específicos	33
4 MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Reactivos	34
4.2 Equipos	34
4.3 Establecimiento de un banco de datos de pacientes con FQ y de DNA de pacientes y testigos	37
4.3.1 Selección de pacientes con FQ	37
4.3.2 Establecimiento de banco de datos de los pacientes con FQ	38
4.3.3 Selección de personas testigo	39
4.3.4 Extracción de DNA a partir de sangre periférica	40
4.4 Determinación del perfil de frecuencias de mutaciones en RCTFQ	41
4.5 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de genes modificadores en pacientes y testigos	41

	Página
4.5.1 Identificación de los alelos A, B, C y D del exón 1 del gen MBL2	42
4.5.2 Identificación del polimorfismo -251 T/A del gen que codifica para IL-8	44
4.5.3 Identificación del polimorfismo -308 G/A del gen que codifica para TNF α	45
4.5.4 Identificación de los alelos S y Z del gen que codifica para la AAT	46
4.6 Cuantificación de los niveles de proteínas en suero/plasma y esputo de pacientes y testigos mediante ELISA	48
4.6.1 Procesamiento de esputo	48
4.6.2 Cuantificación de MBL funcional	50
4.6.3 Cuantificación de IL-8	51
4.6.4 Cuantificación de TNF α	51
4.6.5 Cuantificación de AAT	52
4.7 Correlación entre los polimorfismos de genes modificadores, genotipos en RCTFQ, variables clínicas y fenotipo pulmonar	53
4.8 Análisis estadísticos	54
5. RESULTADOS	55
5.1 Establecimiento de un banco de DNA de pacientes con FQ y testigos	55
5.1.1 Características del grupo de pacientes y tipos de muestras obtenidas	55
5.1.2 Características del grupo de testigos y tipos de muestras obtenidas	56
5.2 Establecimiento de un banco de datos de pacientes con FQ	58
5.2.1 Características del subgrupo de pacientes homocigotos $\Delta F508$	60

	Página
5.2.2 Genotipos de RCTFQ en pacientes fallecidos	60
5.3 Perfil de frecuencias de mutaciones en RCTFQ	62
5.4 Frecuencias genotípicas y alélicas de genes modificadores en pacientes y testigos	65
5.5 Prueba de asociación y razón de momios en genotipos de pacientes contra testigos	68
5.6 Niveles de proteínas en pacientes y testigos	69
5.6.1 Niveles de proteínas en suero y plasma de pacientes y testigos	69
5.6.2 Niveles de proteínas en esputo de pacientes con FQ	71
5.7 Correlación entre los polimorfismos de los genes modificadores, genotipo en RCTFQ, variables clínicas y fenotipo pulmonar	71
5.8 Niveles de proteínas contra genotipos de genes modificadores en pacientes y testigos	74
5.9 Niveles de proteínas en suero y plasma y fenotipo pulmonar en pacientes con FQ	76
5.10 Análisis de supervivencia	77
6. DISCUSIÓN	80
6.1 Establecimiento de un banco de datos de pacientes con FQ y de DNA de pacientes y testigos	82
6.2 Determinación el perfil de frecuencias de mutaciones en RCTFQ	86
6.3 Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de genes modificadores en pacientes y testigos	91

	Página
6.3.1 Comparación de frecuencias de MBL2 con otros reportes en testigos y pacientes con FQ	92
6.3.2 Comparación de frecuencias de IL-8 con otros reportes en testigos y pacientes con FQ	93
6.3.3 Comparación de frecuencias de TNF α con otros reportes en testigos y pacientes con FQ	94
6.3.4 Comparación de frecuencias de AAT S/Z con otros reportes en testigos y pacientes con FQ	95
6.4 Comparación de los niveles de proteínas en suero/plasma y esputo de pacientes y testigos	96
6.5 Correlación entre los polimorfismos de genes modificadores, genotipos en RCTFQ, variables clínicas y fenotipo pulmonar	98
6.6 Gráficas de supervivencia	101
7. CONCLUSIONES	102
8. PERSPECTIVAS	104
9. BIBLIOGRAFÍA	105
10. ANEXOS	117
Anexo 1. Protocolo de análisis de mutaciones en el RCTFQ mediante hibridación con sondas ASO	117
Anexo 2. Descripción de las mutaciones detectadas en RCTFQ en este trabajo	121
Anexo 3. Protocolo de ELISA para MBL funcional	122
Anexo 4. Protocolo de ELISA para TNF α	123

	Página
Anexo 5. Protocolo de ELISA para IL-8	124
Anexo 6. Protocolo de ELISA para AAT	125
Anexo 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos analizados en el grupo de testigos	126
Anexo 8. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de los genes modificadores en diversas poblaciones	128
Anexo 9. Carta de consentimiento informado para pacientes	131
Anexo 10. Cuestionario clínico para pacientes	136
Anexo 11. Carta de consentimiento informado para testigos	139
Anexo 12. Cuestionario clínico para testigos	140
Anexo 13. Productividad Científica durante el período del doctorado y actividades científicas relacionadas	141
Anexo 14. Artículo publicado en revista internacional indexada	147

Índice de tablas

Tabla 1.	Mutaciones más frecuentes en RCTFQ en diferentes regiones del mundo	5
Tabla 2.	Correlación genotipo RCTFQ-fenotipo	16
Tabla 3.	Influencia de los genes modificadores en la FQ	19
Tabla 4.	Descripción de los polimorfismos del exón 1 del gen MBL2	25
Tabla 5.	Descripción de los polimorfismos de la AAT	28
Tabla 6.	Condiciones de la PCR para la detección de los alelos A, B, C y D del gen MBL2	42
Tabla 7.	Programa de ciclos de la PCR para MBL2	42
Tabla 8.	Condiciones de digestión del producto amplificado de MBL2	43
Tabla 9.	Condiciones de la PCR para la detección del polimorfismo -251 T/A de IL-8	44
Tabla 10.	Programa de ciclos de la PCR para IL-8	44
Tabla 11.	Condiciones de la PCR para la detección de los alelos TNF1/TNF2	45
Tabla 12.	Programa de ciclos de la PCR para TNF1/TNF2	45
Tabla 13.	Condiciones de la PCR para la detección del alelo S de la AAT	46
Tabla 14.	Condiciones de la PCR para la detección del alelo Z de la AAT	46
Tabla 15.	Programa de ciclos de la PCR para AATS/Z	47
Tabla 16.	Características clínicas del subgrupo de pacientes homocigotos Δ F508	60
Tabla 17.	Frecuencias de genotipos y alelos RCTFQ en 81 pacientes con FQ	64

Tabla 18. Resumen de las estrategias experimentales e interpretación para el análisis de las variantes analizadas de los genes modificadores.	65
Tabla 19. Frecuencias de los genotipos analizados en los genes modificadores en pacientes y testigos	68
Tabla 20. Frecuencias alélicas de pacientes y testigos para los genes modificadores analizados	68
Tabla 21. Valores promedio de niveles de proteínas en suero/plasma por ELISA en pacientes y testigos	69
Tabla 22. Comparación de niveles de citocinas en suero/plasma y esputo de 5 pacientes	71
Tabla 23. Resultados de correlación entre genotipo y niveles de proteína para MBL en pacientes y testigos	75
Tabla 24. Comparación de frecuencias alélicas de RCTFQ contra otros estudios realizados en mexicanos, hispanos y caucásicos.	87
Tabla 25. Comparación de frecuencias de genotipos para MBL2 en pacientes con FQ y testigos de diferentes poblaciones	93
Tabla 26. Comparación de frecuencias de genotipos para IL-8 -251 A/T en pacientes con FQ y otras enfermedades, así como testigos de diferentes poblaciones	94
Tabla 27. Comparación de frecuencias de genotipos para TNF α -308G/A en pacientes con FQ y testigos de diferentes poblaciones	95

	Página
Tabla 28. Comparación de frecuencias de genotipos para AATS Y AATZ en pacientes con FQ y testigos de diferentes poblaciones	96
Tabla 29. Comparación de niveles de citocinas en plasma y esputo en pacientes con FQ con otros reportes publicados	98

Índice de figuras

Figura 1. Estructura hipotética del RCTFQ.	8
Figura 2. Destino de las moléculas RCTFQ sintetizadas en ribosomas asociados al RE	9
Figura 3. Órganos que se ven afectados en la FQ	13
Figura 4. Funcionamiento del RCTFQ en epitelio respiratorio	14
Figura 5. Proceso inflamatorio pulmonar en la FQ	23
Figura 6. Estrategia general de trabajo	36
Figura 7. Esquema general del desarrollo del ELISA para medir MBL funcional	50
Figura 8. Esquema general del desarrollo del ELISA para medir TNF α . El mismo esquema es válido para IL-8 y AAT	52
Figura 9. Muestras de DNA, suero/plasma y esputo recolectadas de los grupos de estudio y tipo de análisis realizados	56
Figura 10. Distribución geográfica de los 104 testigos incluidos en el trabajo	57
Figura 11. Distribución geográfica de los 40 pacientes con expediente clínico incluidos en el trabajo	59
Figura 12. Distribución del número de pacientes fallecidos de acuerdo al genotipo	61
Figura 13. Análisis del DNA de un paciente mediante el estuche INNOLiPA CFTR36 el cual presentó un genotipo heterocigoto compuesto Δ F508/G85E.	63
Figura 14. Detección de genotipos de los 81 pacientes incluidos el estudio de frecuencias de mutaciones en RCTFQ	64
Figura 15. Diagrama del análisis de los polimorfismos del exón 1 del gen MBL2	66

	Página
Figura 16. Análisis del polimorfismo -251A/T de IL-8	66
Figura 17. Análisis del polimorfismo -308G/A de TNF α	67
Figura 18. Análisis de las variantes S y Z de la AAT	67
Figura 19. Resultados de la prueba estadística de Mann Whitney y gráfico descriptivo de los resultados de ELISA en suero para la IL-8 en pacientes y testigos	70
Figura 20. Gráfico de distribución de datos y tabla de resultados de la prueba r_s de fenotipo pulmonar contra infección (<i>P. aeruginosa</i> y <i>B. cepacia</i>) para un total de 40 pacientes	72
Figura 21. Gráfico de distribución de datos y tabla de resultados de la prueba r_s de fenotipo pulmonar contra IMC para un total de 40 pacientes	73
Figura 22. Niveles de MBL (ng/mL) en suero en testigos y pacientes y genotipo	74
Figura 23. Niveles de IL-8 (pg/mL) en suero/plasma de testigos y pacientes y genotipo	75
Figura 24. Gráfica de medianas de las concentraciones séricas de las proteínas contra fenotipo pulmonar de los 11 pacientes con FQ analizados, clasificados como leve, moderado y severo.	76
Figura 25. Gráficas de Kaplan-Meier que muestran la influencia de la enfermedad pulmonar y el estado socioeconómico en la supervivencia de los pacientes	77
Figura 26. Gráficas de Kaplan-Meier para Insuficiencia pancreática, enfermedad hepática, <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. cepacia</i>	78
Figura 27. Gráficas de Kaplan-Meier para las variantes de MBL2	79

ABREVIATURAS

AAT	Alfa 1 Antitripsina
AATS	Alelo S de la AAT
AATZ	Alelo Z de la AAT
AMFQ	Asociación Mexicana de Fibrosis Quística, A.C.
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARFQ	Asociación Regiomontana de Fibrosis Quística, A.C.
ASO	Oligo Alelo Específicas (se refiere a sondas)
DC	Dicigótico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
Δ F508	Delección del codón 508 que codifica para fenilalanina, dentro del gen RCTFQ
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en un segundo
FQ	Fibrosis quística
HRP	Peroxidasa de rábano
IL-8	Interleucina 8
IM	Íleo meconial
IP	Insuficiencia pancreática
MBL	Lectina de Unión a Manosa
MC	Monocigótico
OR	Razón de momios
PBS	Buffer salino de fosfatos
PMSF	Fenilmetil sulfonilfluoruro

RCTFQ	Receptor de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística
RE	Retículo endoplásmico
RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
r_s	Rho de Spearman
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido
SP	Suficiencia pancreática
TMB	Tetrametilbencidina
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TNF1	Alelo normal para la posición -308G de TNF α
TNF2	Alelo variante para la posición -308A de TNF α
U	Unidades enzimáticas
X g	Veces la fuerza de gravedad
X ²	Chi cuadrada

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica, con una frecuencia de 1/3000 recién nacidos vivos, y una frecuencia de portadores de 1/25. La enfermedad se caracteriza por un desequilibrio en el transporte de electrolitos y agua afectando vías aéreas distales, intestino, vías biliares y pancreáticas. El gen afectado es el Regulador de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística (RCTFQ), del cual se han descrito hasta la fecha más de 1500 mutaciones. Aunque se han clasificado algunas mutaciones como de alto riesgo, la asociación entre el genotipo y el fenotipo pulmonar no está bien entendida. Para comprender mejor la correlación, se han estudiado a los llamados genes modificadores, que son aquellos genes diferentes al gen primario causante de una enfermedad, que tienen la capacidad de influir en el fenotipo de la misma. Variantes en los genes que codifican para la proteína de respuesta inmune innata MBL, el agente quimiotáctico IL-8, la citocina proinflamatoria TNF α y la antiproteasa AAT, han sido ampliamente estudiadas y fueron propuestas para este trabajo de tesis como genes modificadores del fenotipo pulmonar de la FQ. **OBJETIVO:** Analizar los polimorfismos de los genes modificadores MBL, IL-8, TNF α y AAT y sus niveles de expresión, así como las mutaciones en RCTFQ en pacientes con FQ, y con las variables clínicas determinar si existe correlación con la severidad del cuadro pulmonar y en consecuencia un perfil de riesgo. **MÉTODOS:** Se recolectaron muestras de DNA de 104 testigos sanos y 81 pacientes con FQ. Se analizaron los polimorfismos mediante PCR-RFLPs para el estudio de frecuencias; además se analizó mediante ELISA los niveles de proteínas en suero de 16 testigos y 11 pacientes, así como en el esputo de 5 pacientes. Finalmente, se realizaron estudios de correlación entre los resultados y las variables clínicas de 40 pacientes con expediente clínico completo. **RESULTADOS:** La frecuencia del alelo Δ F508 fue del 60% y el 83% de los pacientes presentaron dicha mutación en uno o ambos alelos. Se diagnosticaron además 10 mutaciones diferentes a Δ F508. La muestra de la población del noreste de México se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los alelos AATS y AATZ son los menos variantes en nuestra población, mientras que los genotipos variantes del exón 1 de MBL2 y la variante IL-8 -251 A/T tuvieron una alta frecuencia. Basado en un estudio de asociación, el genotipo TNF1/TNF2 se comportó como un factor de riesgo (OR 3.43, $p < 0.05$, X^2 6.3, $p < 0.05$) y TNF1/TNF1 mostró ser un genotipo protector (OR 0.29, $p < 0.05$, X^2 : 6.3, $p < 0.05$). Para el resto de los genotipos analizados se demostró que el genotipo de los genes modificadores y la FQ fueron independientes. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IL-8 en suero de pacientes contra controles ($p = 0.003$). Los niveles de MBL en suero se encontraron reducidos en los genotipos A/O y nulos en O/O en pacientes y testigos. Se demostró una elevada correlación entre el genotipo MBL y los niveles de la proteína MBL (R_s 0.831 y 0.907 para testigos y pacientes respectivamente, $P = 0.0001$). No se detectó la proteína MBL en el esputo de pacientes. Se presentó una correlación moderada entre el fenotipo pulmonar e infección con *P. aeruginosa* (0.693) e índice de masa corporal (0.683). Las gráficas de supervivencia de los pacientes mostraron que el estado socioeconómico y la enfermedad pulmonar severa presentaron una influencia estadísticamente significativa en la sobrevivencia ($p < 1 \times 10^{-5}$ y $p = 0.00555$ respectivamente), y que el genotipo A/D de MBL presentó una tendencia de severidad aunque por el número de muestras no fue estadísticamente significativa. **CONCLUSIONES:** Aunque se encontró que TNF1/TNF2 es un factor de riesgo, no se demostró una influencia de los genes modificadores analizados con la enfermedad pulmonar de pacientes con FQ. De los resultados de este trabajo, se puede considerar de aplicación inmediata el tamizaje inicial de la mutación Δ F508 en pacientes con sospecha de FQ. Para severidad pulmonar: un programa de control a pacientes con infección por *P. aeruginosa* y bajo IMC. Para la sobrevivencia de los pacientes: la enfermedad pulmonar severa, el estado socioeconómico bajo, y la mutación D del gen MBL2.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cystic fibrosis (CF) is the most common recessive autosomal disease in the Caucasian population, with disease frequency of 1/3000 live births, and carrier frequency of 1/25. The disease is characterized by an imbalance of electrolytes and water transport, affecting respiratory, intestine, biliary and pancreatic ducts. The affected gene is the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR), of which more than 1500 mutations have been described. Although some mutations have been classified as high risk mutations, association between the genotype and the pulmonary phenotype is not well understood. In order to have a better understanding of this correlation, it has been studied genes so called modifier genes, that are those genes different from the primary disease gene, that have the capacity to influence the clinical phenotype of the disease. Variants in the genes that code for the innate immune response protein MBL, the potent chemotactic IL-8, the proinflammatory cytokine TNF α and the antiprotease AAT, have been widely studied and were proposed for this work as modifier genes of the CF pulmonary phenotype. **OBJECTIVE:** To analyze the polymorphisms of the modifier genes MBL, IL-8, TNF α and AAT and their expression levels, as well as the mutations in CFTR in CF patients, along with the clinical variables to determine if there is correlation with the severity of the pulmonary disease and consequently a risk profile. **METHODS:** DNA samples of 104 healthy controls and 81 CF patients were collected. The polymorphisms were analyzed by PCR-RFLPs for the study of frequencies; protein levels in serum of 16 controls and 11 CF patients, and sputum samples of 5 patients, were analyzed by ELISA. Finally, correlation studies between results and the clinical variables of the 40 patients with complete clinical files were made. **RESULTS:** The allele frequency of Δ F508 was 60%, and this mutation was present in 83% of the patients in one or both alleles. 10 mutations different from Δ F508 were diagnosed. The sample of the population of the northeast of Mexico was in Hardy-Weinberg equilibrium. AATG and AATZ alleles are less frequent in our population, whereas the variant genotypes of MBL exon 1 and IL-8 -251 A/T were more frequent. Based on an association study, genotype TNF1/TNF2 behaved as a risk factor (OR 3.43, $p < 0.05$, X^2 6.3, $p < 0.05$), and TNF1/TNF1 showed to be a protective genotype (OR 0.29, $p < 0.05$, X^2 : 6.3, $p < 0.05$). For the rest of the analyzed genotypes, it was demonstrated that modifier gene genotypes and CF disease were independent variables. A statistically significant difference was found in the serum IL-8 levels from patients versus controls ($p = 0.003$). Serum MBL levels are reduced in A/O genotype and null in O/O genotype in both patients and controls. A high correlation between MBL genotype and levels of MBL protein was demonstrated (0.831 and 0.907 for controls and patients respectively, $P = 0.0001$). MBL protein was not detected in the sputum of CF patients. Moderate correlation of infection with *P. aeruginosa* (0.693) and corporal mass index (CMI, 0.683), versus the pulmonary phenotype was found. The CF patients survival plot showed that socioeconomic status and severe pulmonary disease displayed a statistically significant influence in the survival function from life-time data ($p < 1 \times 10^{-5}$ and $p = 0.00555$ respectively), and MBL genotype A/D showed a severity tendency although this is not statistically significant because of the sample number. **CONCLUSIONS:** Although TNF1/TNF2 was found as a CF risk factor, it was not demonstrated the influence of the modifier genes analyzed on the pulmonary disease of CF patients. Of the results of this work, it could be considered of immediate application: an initial screening of Δ F508 mutation in patients with CF. For pulmonary severity: a control program for patients with infection by *P. aeruginosa* and low BMI. For the survival of the patients: severe pulmonary disease, low socioeconomic status, and mutation D of MBL2 gene.

1. INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica, con una frecuencia estimada en 1/3000 recién nacidos vivos, y una frecuencia de portadores de 1/25. La enfermedad se caracteriza por un desequilibrio en el transporte de agua y electrolitos en los epitelios secretores, con la producción de moco espeso y viscoso en las glándulas de secreción -es por eso que también se le denomina mucoviscidosis-, que se almacena en las vías aéreas distales, así como intestino, vías biliares y pancreáticas. Dichas secreciones aumentan el riesgo de insuficiencia pancreática e infecciones repetidas del tracto respiratorio. El deterioro es progresivo, y la afección respiratoria por lo general conduce a la muerte entre la primera y cuarta décadas de vida. En los últimos 20 años, los avances han contribuido a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, permitiéndoles alcanzar en la década de los noventa una edad media de 25 a 30 años (Aliño-Pellicer *et al*, 2003).

El gen de la FQ fue el primero en clonarse mediante el método de caminata cromosómica y saltos cromosómicos. La identificación se logró por su asociación con una isla CpG y su expresión en glándulas sudoríparas, pulmonares y pancreáticas. El gen se expresa casi exclusivamente en células epiteliales, con la concentración más alta en pulmones, páncreas, glándulas salivales, glándulas sudoríparas, intestino y aparato reproductor. Los análisis de secuenciación han permitido identificar aquellas mutaciones causantes de enfermedad y deducir la estructura del producto, el cual se denominó Regulador de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística (RCTFQ), una proteína de membrana que participa en el transporte de iones cloruro mediado por ATP (Welsh y Smith, 1995; Cox y Sinclair, 1998).

La mutación más común en el RCTFQ es una delección de tres pares de bases, que tiene como consecuencia la pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508 de la proteína ($\Delta F508$). En caucásicos la frecuencia de esta mutación es del 60 al 70%. Se conocen hasta este momento más de 1500 mutaciones, las cuales se ha tratado de asociar al amplio espectro clínico con el que se manifiesta esta enfermedad (Dequeker *et al*, 2009).

1.1 Antecedentes

La enfermedad se conoce desde el siglo XVII, pero fue hasta 1938 que Dorothy Andersen realizó la primera descripción de los síntomas de la enfermedad, después de realizar autopsias a infantes. Sus observaciones incluyeron destrucción del páncreas y generalmente infección y daño en las vías aéreas. Andersen le denominó “fibrosis quística del páncreas” (Collins, 1992).

1.2 Genética de la fibrosis quística

1.2.1 Identificación del gen de la FQ

La alta frecuencia de la enfermedad permitió el análisis de ligamiento. La identificación de los marcadores flanqueantes MET y D7S8, permitieron mediante saltos cromosómicos (Collins *et al*, 1987; Iannuzzi *et al*, 1989) y otros métodos, la localización exacta del gen, el cual se identificó y se aisló hacia finales de los ochenta (Tsui *et al*, 1985; Rommens *et al*, 1989; Kerem *et al*, 1989; Riordan, 1999). El gen del RCTFQ se encuentra localizado en el cromosoma 7q31.2, posee un tamaño de 250 kb y contiene 27 exones. Codifica para un transcrito maduro de 6.5 kb, que es traducido a una proteína de 168 kDa. La secuencia de

DNA complementario (DNAC) fue determinada en 1991 junto con la localización de intrones y exones (Zielenski *et al*, 1991).

1.2.2 Mutaciones detectadas en el RCTFQ

Se han descrito hasta la fecha más de 1500 mutaciones (Dequeker *et al*, 2009), las cuales están situadas a través de la región codificante y la región promotora, así como sitios de procesamiento de exones, aunque hay regiones donde las mutaciones son más comunes como el dominio de unión a nucleótido (NBD) y dominio regulatorio (R) (Rowntree y Harris, 2003). La mutación $\Delta F508$ genera una proteína mutante no funcional. G542X, N1303K y W1282X son mutaciones con una frecuencia mayor al 1%.

La página de Internet www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, es una base de datos mundial donde se recolectan los reportes sobre mutaciones en FQ en distintas poblaciones. Esta base de datos presenta un reporte de resultados mundiales para 24 de las mutaciones frecuentes, en más de 20,000 casos estudiados (tabla 1).

1.2.3 Mutaciones en RCTFQ en México

Aunque se estima que en la población hispana la frecuencia de la enfermedad es de 1/ 8,500 recién nacidos vivos (AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS). En países donde la enfermedad es emergente como el nuestro se desconoce cual es la frecuencia real. Un estudio de tamiz neonatal realizado en 7193 neonatos en un hospital en la Cd. de México (Velázquez *et al*, 2000), reportó 2 afectados homocigotos $\Delta F508$, sugiriendo que la frecuencia podría ser mayor. Con respecto al perfil de mutaciones en población hispana, se ha demostrado que existen diferencias en las frecuencias de las mutaciones de acuerdo a la

etnicidad. Un análisis de 16 mutaciones en 40 familias mexicanas no relacionadas, encontró que la mutación $\Delta F508$ se presentó con una frecuencia del 45%, y se reportaron las mutaciones 3849+10 kb C→T, N1303K, S549N y 621 +1G→T, las cuales representaron un 11% en conjunto (Villalobos-Torres *et al*, 1997).

Otro estudio en población mexicana reportó un total de 34 diferentes mutaciones, incluyendo las mutaciones nuevas: W1098C, P750L, 846delT, 4160insGGGG y 297-1G→A (Orozco *et al*, 2000). El alelo W1098C fue confirmado en un estudio más reciente en la Universidad de Stanford en el cual, en 256 pacientes de origen hispano con diagnóstico de FQ se reportó un paciente con dicha mutación, correspondiendo a 0.19% de los alelos analizados (Schrijver *et al*, 2005).

1.3 Estructura y función del RCTFQ

El RCTFQ es un miembro de la superfamilia de proteínas ABC (casete de unión a ATP) que incluye la proteína de resistencia múltiple a drogas (MDR), permeasas bacterianas periplásmicas (Sheppard, 1999) y los receptores sulfonilurea 1 y 2 (Hanrahan y Wioland, 2004). La proteína contiene: dos dominios transmembranales cada uno con 6 subunidades de hélices alfa, dos dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2) y un dominio regulatorio citoplásmico, característicos de la familia ABC (figura 1), el cual contiene muchos sitios sustrato potenciales para fosforilación (Akabas, 2000), que permiten la activación del RCTFQ. Además se requieren interacciones del ATP con los dominios NBD para cerrarse.

La proteína RCTFQ se localiza en la membrana de las células epiteliales. Funciona como un canal de cloruro dependiente de AMPc y juega un papel importante en el transporte de cloruro a través de la membrana apical de las superficies epiteliales (Rich *et al*, 1990). Cuando se altera esta función, se produce una modificación en la cantidad y composición de los fluidos epiteliales, conduciendo a cambios patológicos en los órganos que expresan el RCTFQ, entre ellos pulmones, páncreas, intestino delgado, tracto reproductivo e hígado (Akabas, 2000; Ratjen y Doring, 2003; Rowe *et al*, 2005). Al RCTFQ se le han atribuido otras funciones:

1. Transporte de bicarbonato (Choi *et al*, 2001).
2. Interacción con otros canales, incluyendo el canal epitelial de sodio (ENaC, por sus siglas en inglés) canal rectificador de salida de cloruro (ORCC, por sus siglas en inglés) y canal medular renal externo de potasio (ROMK, por sus siglas en inglés) sugiriendo un papel regulatorio del RCTFQ (Schwiebert *et al*, 1999).

3. Exocitosis y formación de complejos moleculares en la membrana (Rowe *et al*, 2005).
4. Anclaje de los tres aminoácidos finales (treonina, arginina y leucina) a receptores tipo dominio PDZ, los cuales son denominados también DHR (región homóloga Dlg) o GLGF (glicina-leucina-glicina-fenilalanina) (Ranganathan y Ross, 1997). Estos se encuentran en proteínas de señalización intracelular y otras proteínas asociadas con la membrana plasmática (Short *et al*, 1998).
5. Se ha sugerido que puede funcionar como canal de cloruro dentro de organelos intracelulares de las vías endosómicas y biosintéticas, potencialmente modificando su acidificación, así como regulando las propiedades del tráfico de organelos intracelulares (Bradbury, 1999).

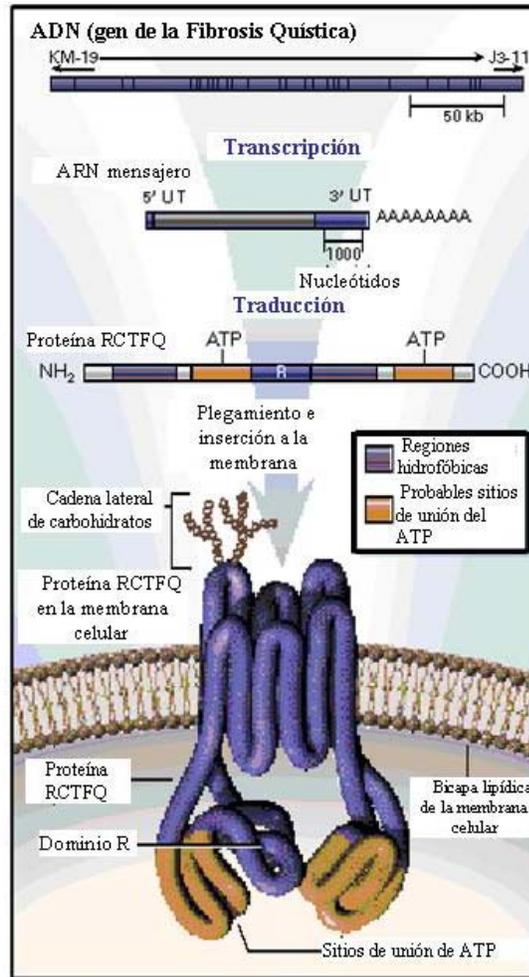


Figura 1. Estructura hipotética del RCTFQ. Se muestra el gen con las regiones flanqueantes, el RNAm, la cadena proteica con las regiones hidrofóbicas y de unión a ATP identificadas, así como su estructura después de su localización en la membrana celular (Ramsey, 1996).

1.3.1 Procesamiento celular del RCTFQ

Se ha propuesto un esquema del procesamiento del RCTFQ (figura 2). Cuando se forma la estructura primaria, el polipéptido es incorporado en la membrana del RE. Se unen cadenas de oligosacáridos, y a ellos se une la calnexina. Además, se unen las chaperonas citosólicas Hsp70, Hdj-2 y Hsp 90, y puede ocurrir la ubiquitinación. Debe alcanzarse una estructura de alta complejidad para la exportación hacia el RE a través de vesículas cubiertas de COPII (no se muestra en la figura). Esta maduración conformacional dependiente de ATP

se acompaña de disociación de la calnexina y las chaperonas citosólicas. El plegado completo del RCTFQ lo protege de la degradación, pero las moléculas que no adquieren esta conformación (~75% de los receptores normales y el 100% de las moléculas $\Delta F508$) son sustratos de enzimas ubiquitinantes (ubc) y son degradadas por el proteosoma, y pueden estar involucradas proteasas aún no identificadas. Cuando la degradación se encuentra bloqueada o saturada, ocurre la agregación extensiva de moléculas de exportación incompetentes. Las moléculas de exportación competentes viajan del RE hacia el aparato de golgi, donde se completa la cadena de oligosacáridos. Las vesículas llevan la molécula completa de la red trans-golgi (RTG) hacia la membrana plasmática. El reciclaje endocítico de esta población y la degradación de algunas proteínas internalizadas por proteasas lisosómicas son fenómenos que ocurren para el recambio del RCTFQ expresado (Riordan, 1999).

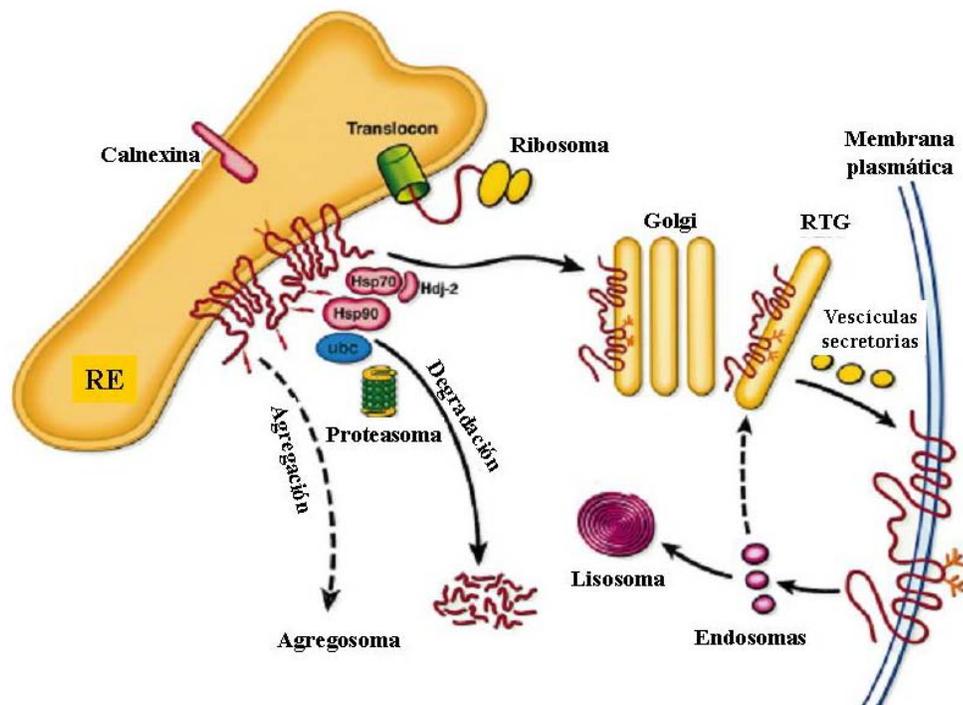


Figura 2. Destino de las moléculas RCTFQ sintetizadas en ribosomas asociados al RE (tomada de Riordan 1999).

1.3.2 Efectos de las mutaciones sobre el RCTFQ

Estudios de expresión han permitido determinar una amplia variedad de efectos sobre el procesamiento del RCTFQ, por lo cual las mutaciones se han ubicado dentro de seis diferentes grupos de acuerdo al mecanismo por el cual se interrumpe la función de RCTFQ:

Clase I. La proteína no se sintetiza. Incluye los fenotipos más severos. La más severa es la G542X, que impide la síntesis de una proteína estable o se produce una proteína truncada debido a la creación prematura de un codón de terminación. Las proteínas truncadas son inestables, reconocidas por la chaperona de proteínas del retículo endoplásmico y degradadas rápidamente.

Clase II. Se afecta la maduración de la proteína. Se produce una proteína no funcional en la membrana celular. Δ F508 está clasificada aquí, basado en un análisis en un sistema de expresión heterólogo. En ella ocurre plegamiento incorrecto y retención de la proteína mutante en el retículo endoplásmico y expresión reducida de la forma completamente glicosilada conocida como la “banda C” (Cheng *et al*, 1990; Kartner *et al*, 1992). También se ha mostrado que el RCTFQ no está localizado adecuadamente en las células epiteliales de las glándulas sudoríparas (Kartner *et al*, 1992). Estudios histoquímicos muestran que una proporción de RCTFQ alcanza la membrana apical (Kalin *et al*, 1999).

Clase III. Se afecta la regulación del canal de Cloruro. La proteína es conducida a la membrana pero no responde a la estimulación con AMPc. Se ve afectada la unión o el acoplamiento de ATP a la activación del canal, afectando la transmisión del cambio conformacional. La mutación sin sentido G551D es un ejemplo.

Clase IV. Conductancia de Cloruro alterada. El RCTFQ es dirigido a la membrana y responde a estímulo, generando una corriente reducida de cloruros. Un ejemplo es la

mutación R117H. La mayoría de las mutaciones están localizadas en los dominios que atraviesan la membrana. Estudios en el exón 13 que codifica para el dominio regulatorio han mostrado que estas mutaciones pueden tener diferentes efectos en los niveles de la conductancia de cloruro. Tres mutantes de este tipo (G622D, R792G y E822K) expresadas transitoriamente en cultivo de células, muestran actividades de cloruro reducidas comparadas al tipo silvestre, mientras que las mutantes H620Q y A800G muestran actividades aumentadas. También se incluyen en esta clase mutaciones en el exón 18, el cual codifica para la hélice transmembranal 12 y el lazo intracitoplásmico subsecuente. Ejemplos de ellas son M1137V, I1139V, Δ M1140, D1152H y D1154G. Éstas exhiben reducción significativa del paso de cloruro activado por AMPc (Vankeerberghen *et al*, 1998).

Clase V. Síntesis reducida de la proteína. Ocurren mutaciones que afectan el procesamiento produciendo cantidades reducidas de transcrito y de proteína funcional que es translocada en la membrana apical. Ejemplos de ellas son las mutaciones A455E y 3849 + 10 kbC→T (Minasian, 2003).

Clase VI. Mutaciones que afectan la estabilidad de la proteína. Esta clase fue propuesta por Haardt en 1999 y discutida por Zielenski en el 2000, aunque fue reclasificada dentro de la Clase V. Incluye mutantes que carecen de los residuos 70-98 en el extremo C-terminal. Aunque el C-terminal no es requerido para la biogénesis y función del RCTFQ, se reporta que es indispensable para mantener la estabilidad del complejo RCTFQ glicosilado (Haardt *et al*, 1999; Zielenski, 2000).

1.4 Fisiopatología de la FQ

Actualmente se conoce que existen órganos principales en el ser humano que se ven afectados y los efectos producidos en cada uno de ellos (figura 3): pulmón, páncreas, hígado, intestino y aparato reproductivo masculino.

El primer parámetro clínico confirmatorio de la enfermedad es la *iontoforesis*, análisis que demuestra la presencia de concentración de iones cloruro en sudor mayor a 80 meq/L (Ratjen, 2003).

Por otro lado, se observa que la formación de moco y secreciones densas obstruyen principalmente las vías aéreas distales y glándulas submucosas, donde RCTFQ se expresa a altos niveles. La dilatación distal de estas glándulas, el acúmulo de moco espeso, neutrófilos y restos celulares son signos típicos de esta enfermedad. La hiperplasia glandular en regiones submucosas es prominente y rodeada de inflamación peribronquiolar y tejido cicatrizal. El paciente manifiesta por lo general infecciones pulmonares crónicas que incluyen un limitado número de patógenos. *Pseudomonas aeruginosa* es el aislado más común, seguido por *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Stenotrophomonas maltophilia*. *P. aeruginosa* se adapta específicamente al microambiente en estos pacientes a través de la formación de macro colonias o biopelículas y la producción de un polisacárido capsular (un producto de alginato) que inhibe la penetración por agentes antimicrobianos y confiere el fenotipo mucoide (Rowe *et al*, 2005). Otras manifestaciones clínicas se catalogan como FQ atípica y son: asma atípico, bronquiectasias, pancreatitis, e infertilidad masculina causada por ausencia bilateral de vasos deferentes (ABVD) (Welsh y Smith, 1995).

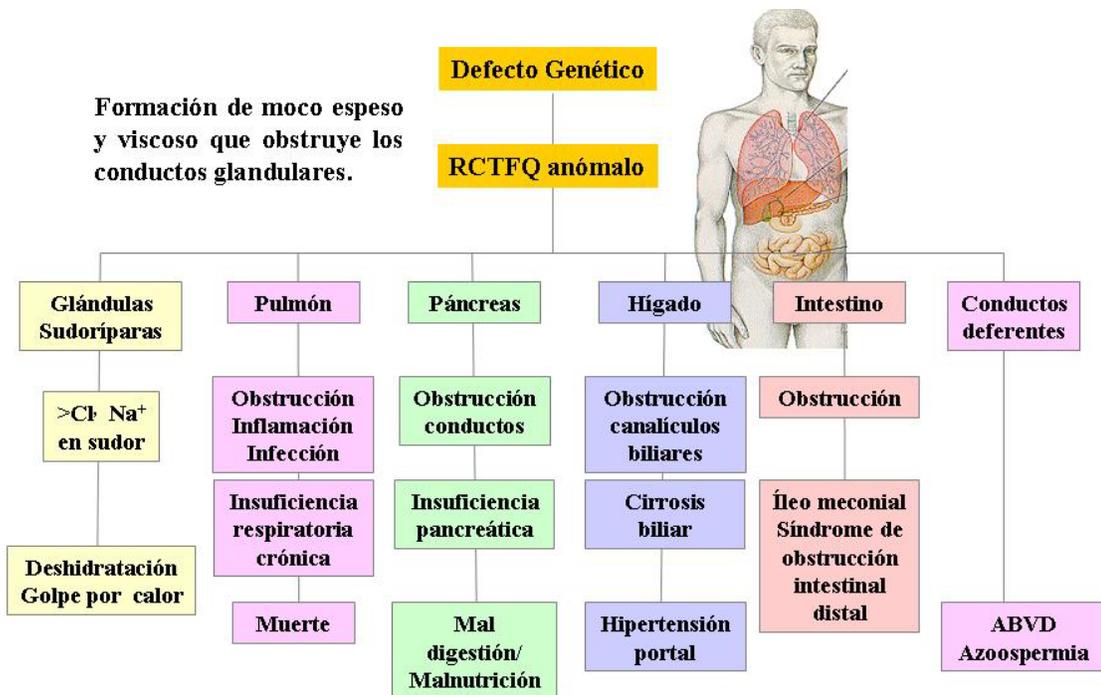


Figura 3. Órganos que se ven afectados en la FQ. La enfermedad afecta a todos los órganos que incluyen glándulas exocrinas, como vías aéreas, páncreas, hígado, intestino delgado, tracto reproductivo y piel. Adicionalmente se muestran los eventos que suceden y el desenlace para cada uno de los órganos involucrados (An Esp Pediatr, 2002).

La edad de inicio de las manifestaciones clínicas, la edad del paciente en la primera infección con patógenos, el grado de bronquiectasias, y la tasa de declinación pulmonar (FEV_1) así como el grado de severidad, son fenómenos observados en pacientes con FQ que se presentan con un amplio rango fenotípico (Cutting, 2005). La edad del deceso varía sustancialmente, sin embargo el 90% de la mortalidad es atribuida a insuficiencia pulmonar (Lai *et al*, 2004).

1.4.1 Modelos del funcionamiento anormal del RCTFQ en epitelio pulmonar

Existen 2 hipótesis que explican el funcionamiento anormal del RCTFQ en pacientes con FQ (figura 4).

Hipótesis composicional. Este modelo propone un comportamiento similar a las glándulas sudoríparas, proponiendo el RCTFQ como la principal vía de absorción de contra-iones, y unifica los hallazgos bioeléctricos. El RCTFQ está incapacitado para la absorción de cloruro, por lo que genera una superficie mucosa cargada más negativamente. El nivel elevado de cloruro en la capa periciliar inactiva a las defensinas y antimicrobianos favoreciendo las infecciones con *P. aeruginosa* (Smith *et al*, 1996). Algunos estudios en modelos animales contradicen a esta hipótesis, pues han mostrado que el líquido superficial de las vías aéreas es isotónico (Matsui *et al*, 1998; Boucher, 2003; Rowe *et al*, 2005).

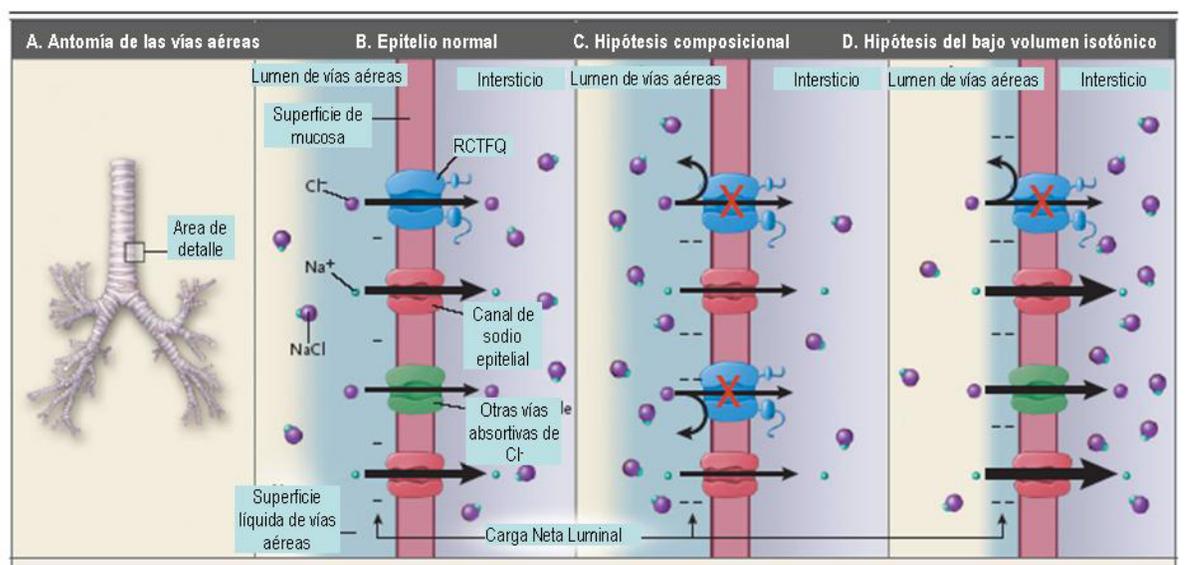


Figura 4. Funcionamiento del RCTFQ en epitelio respiratorio. Se muestra A. Anatomía de las vías aéreas. B. Funcionamiento normal de vías aéreas C. El modelo de concentración alta de sales. D. El Modelo del bajo volumen isotónico (Rowe *et al*, 2005).

Hipótesis del bajo volumen isotónico. Este modelo propone un comportamiento opuesto al de las glándulas sudoríparas. El RCTFQ defectuoso provoca un aumento en la absorción de cloruro a través de otros canales de cloruros, por lo que al final, existe un incremento en la absorción de sodio, cloruro y fluidos, disminuyendo así el volumen de la capa periciliar. Esto resulta en disminución de la capacidad de clarificación mucociliar y estancamiento del moco. La actividad de antimicrobianos innatos (lactoferrina, lisozima) se encuentra reducida cuando la concentración de NaCl es alta, ya que inhibe su unión a las bacterias favoreciendo la formación de biopelículas e infección bacteriana crónica (Smith *et al*, 1996; Aliño-Pellicer *et al*, 2003; Rowe *et al*, 2005). Este modelo es apoyado por experimentos en ratones que mostraron un aumento en la actividad de los canales de sodio, con un fenotipo similar al de la FQ (Mall *et al*, 2004).

1.5 Correlación entre el genotipo en RCTFQ y el fenotipo de la FQ

Las mutaciones detectadas en RCTFQ han sido clasificadas como de alto riesgo (Clase I: G542X, R553X, W1282X, R1162X, 621-1GT, 1717-1GA, 1078T, 3659C; Clase II: ΔF508, I507, N1303K, S549N, G85E; Clase III: G551D, R560T) y de bajo riesgo (Clase IV: R117H, R334W, R347P; Clase V: 3849 + 10kbCT, 2789 + 5GA, A455E; McKone *et al*, 2006). Numerosos estudios han intentado correlacionar el genotipo con el fenotipo de pacientes. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertas mutaciones están asociadas con insuficiencia (IP) o suficiencia (SP) pancreática y que pacientes con íleo meconial (IM) presentan IP (Tabla 2) (Aliño-Pellicer *et al*, 2003). Las mutaciones 3849+10kbC→T y 2789+5G→A están asociadas a fenotipo moderado. Ambos son sitios de procesamiento que conducen a un RNAm anormal, aunque se detecta una cierta cantidad de transcritos con procesamiento normal (Dugueperoux y De Braekeleer, 2005).

Tabla 2. Correlación genotipo RCTFQ-fenotipo.

FENOTIPO	MUTACIONES EN RCTFQ
PANCREÁTICO (90% de los pacientes)	ΔF508, G542X y G551D: IP R117H: SP
INTESTINAL (Ileo Meconial, 15% de los pacientes)	ΔF508 y G542X alta asociación G551D y R117H baja asociación
VASOS DEFERENTES (infertilidad)	<u>Mutación 3849 + 10kb C>T</u> 60-70% - una mutación en RCTFQ 19% - 2 mutaciones conocidas <u>Polimorfismo intrón 8</u> 33% - una mutación conocida y el <u>Alelo 5T</u> 27% - una mutación conocida sin el alelo 5T
GLÁNDULAS SUDORÍPARAS	SP, concentraciones más bajas de cloruros

SP: suficiencia pancreática, IP insuficiencia pancreática

1.5.1 Correlación fenotipo pulmonar-genotipo RCTFQ

A pesar de los numerosos intentos por encontrar una asociación entre el genotipo y el fenotipo pulmonar, esta relación aún no está bien comprendida (Sánchez-Domínguez *et al*, 2006). La enfermedad pulmonar es la manifestación fenotípica más variable de la FQ. Sólo pocas mutaciones han sido correlacionadas a la manifestación pulmonar. Pacientes que portan una sustitución de ácido glutámico por alanina en el codón 455 (A455E) tienen una tasa de declinación pulmonar medida como FEV₁ más lenta (Gan *et al*, 1995; De Braekeleer *et al*, 1997). Otros estudios sugieren que las sustituciones aminoacídicas y mutaciones en sitios de procesamiento están correlacionadas con un riesgo bajo de infección con *P. aeruginosa*. Comparaciones de la enfermedad pulmonar entre homocigotos $\Delta F508$ revelan una gran variabilidad, lo cual sugiere la influencia de otros factores además de RCTFQ. Se han realizado estudios en gemelos y hermanos para investigar la contribución relativa de factores genéticos y ambientales al fenotipo de la FQ. Un estudio en pacientes con FQ de Canadá (Corey *et al*, 1989), Reino Unido (Santis *et al*, 1990), e Israel (Picard *et al*, 2004), no dejó claro si las similitudes son debido a factores genéticos, ambientales o ambos. Otro estudio con hermanos y gemelos monocigóticos (MC) y dicigóticos (DC) en Europa (Mekus *et al*, 2000), no mostró diferencias significativas entre ambos si se analizaba sólo el fenotipo pulmonar. Así, pareció concluirse que entre homocigotos $\Delta F508$, el compartir la carga genética y el ambiente incrementó la concordancia con el estado nutricional, pero no con la severidad del cuadro pulmonar (Cutting, 2005).

1.6 Genes modificadores

Desde el descubrimiento del gen causal de la FQ, se han llevado a cabo estudios considerando factores ambientales y otros factores genéticos. Los factores ambientales son difíciles de medir objetivamente. Sin embargo, hay algunos que nos dan un panorama de lo que puede suceder, por ejemplo ser fumador pasivo (Collaco *et al*, 2008) y la exposición a la contaminación ambiental están asociados a función pulmonar reducida (Goss *et al*, 2004). Se ha observado que la contaminación ambiental como materia particulada incrementa el estrés oxidativo y la apoptosis mediada por señales en la mitocondria a través de la modulación de la familia de proteínas Bcl en pacientes con FQ (Kamdar *et al*, 2008). El estado nutricional también es un factor importante, pues está asociado a capacidad pulmonar reducida (Olveira y Olveira, 2008). Sin embargo, los pacientes varían en su respuesta al tratamiento nutricional, sugiriendo la intervención de otros factores ambientales o genéticos (Kirvela *et al*, 1993). La colonización pulmonar con *P. aeruginosa* y *B. cepacia* es un evento mediado por el ambiente, que está asociado con longevidad reducida (John *et al*, 1994; Farrell *et al*, 1997). *P. aeruginosa* es oportunista y aunado a la multirresistencia a fármacos y a su presencia intrahospitalaria, una vez establecida en pacientes con FQ es difícil de erradicar. Finalmente, el nivel socioeconómico se ha asociado a bajo FEV₁ y alta tasa de mortalidad (Schechter *et al*, 2001; O'Connor *et al*, 2003).

Considerando que pudieran existir otros factores genéticos implicados en la patogenia pulmonar de la FQ, y gracias a los avances en el genoma humano, el punto de vista para el estudio de enfermedades monogénicas ha variado en los últimos tiempos. Actualmente se define FQ clásica como aquella enfermedad que refleja la pérdida de 2 alelos funcionales,

mientras que la FQ no clásica, aquella caracterizada por la presencia de al menos un alelo mutante que confiere función parcial y en la mayoría de los casos, mejor sobrevivida (Drumm *et al*, 2005). La amplia variabilidad fenotípica de la FQ ha servido de ejemplo para otras enfermedades monogénicas al considerar una compleja interrelación genética adicional al gen causal RCTFQ.

Dado lo anterior, se han buscado alternativas en los estudios con potencial correlación genotipo-fenotipo de esta compleja enfermedad. Ese es el caso del estudio del efecto de genes modificadores, los cuales han adquirido gran interés en los últimos años para estudiar los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad así como para el diseño de terapias en FQ (Davies *et al*, 2005a). Se denomina genes modificadores a aquellos genes diferentes al gen primario causante de una enfermedad, que tienen la capacidad de influir en el fenotipo de la misma. Estos o sus productos pueden actuar sobre el gen causal primario, o de manera indirecta en los mecanismos de respuesta del huésped (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia de los genes modificadores en la FQ (Slieker *et al*, 2005).

Efecto sobre el gen causal primario RCTFQ	Efecto sobre los mecanismos de defensa y reparación del huésped
<ul style="list-style-type: none"> • Transcripción • Procesamiento • Traducción • Tráfico • Glicosilación • Degradación • Secreción 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación • Respuesta inmune innata • Proteólisis y fibrosis • Clarificación mucociliar, daño y reparación del epitelio pulmonar • Transporte de iones • Susceptibilidad a infecciones con <i>B. cepacia</i> y <i>P. aeruginosa</i>

1.6.1 Abordaje en el estudio de genes modificadores

Se han analizado diferentes genes modificadores y su posible asociación con las manifestaciones clínicas como: capacidad pulmonar reducida, infecciones recurrentes con *P. aeruginosa* o *B. cepacia*, hallazgos patológicos en radiografías de tórax, entre otros. Se

han realizado numerosos estudios en todo el mundo en los últimos años, analizando uno o varios genes modificadores y su posible interacción. (Hull y Thomson, 1998; Merlo y Boyle, 2003; Cutting, 2005; Davies *et al*, 2005a; Sliker *et al*, 2005; Drumm *et al*, 2005; Collaco y Cutting, 2008). No se han publicado estudios de este tipo en la población mexicana en enfermedades monogénicas.

La manera de abordar el estudio de genes modificadores, se puede realizar de dos maneras:

- a) Estudios de ligamiento genético, que consisten en el estudio de familias donde se buscan genes candidato que se segregan con la enfermedad.
- b) Buscando genes candidatos dentro del proceso fisiopatológico de la enfermedad a estudiar.

El abordaje molecular de los genes modificadores consiste en “rastrear” variaciones en las secuencias de DNA que permitan explicar alteración de niveles o función de sus productos, y la respuesta a drogas, afectando de diferente manera el fenotipo de una enfermedad. La secuencia de DNA entre dos individuos no relacionados es aproximadamente un 99% idéntica, y el restante 1% contiene variaciones denominadas polimorfismos, que comprenden variaciones genéticas que dan lugar a alelos alternativos en individuos normales. Los polimorfismos difieren de las mutaciones en la frecuencia, ya que las mutaciones se encuentran en una frecuencia menor al 1% (Brookes *et al*, 2000; Lazarus *et al*, 2002; Davies *et al*, 2005b). Es decir, los polimorfismos son variaciones en la secuencias nucleotídicas en una frecuencia mayor al 1% en la población en general. Los polimorfismos incluyen sustituciones de una sola base (SNPs por su siglas en inglés), deleciones o inserciones multibase a pequeña escala es decir, polimorfismos de delección e inserción

(DIPs por su siglas en inglés) y variaciones en repeticiones, como las repeticiones cortas en tándem (STRs por su siglas en inglés).

Los SNPs han recibido mucha atención, debido al proyecto internacional HapMap (Duan *et al*, 2008), que pretende generar el mapa de haplotipos de SNPs del genoma humano. Se estima que existen 10 millones de SNPs en el genoma humano (Davies *et al*, 2005a). Además, se ha creado una iniciativa global para catalogar toda la variación genética humana, llamado el Proyecto del Varioma Humano (Cotton *et al*, 2007).

Por lo general, el análisis de polimorfismos está enfocado en las siguientes regiones (Davies *et al*, 2005b):

1. Exones, particularmente si hay sustitución de aminoácidos.
2. Regiones reguladoras, en las cuales se puede afectar la unión de factores de transcripción.
3. Uniones intrón-exón, las cuales pueden influir el procesamiento del RNA.
4. Regiones conservadas entre diferentes especies, lo que usualmente significa una función importante.

1.6.2 Selección de genes modificadores: evaluación del mecanismo de la inflamación pulmonar

La excesiva producción de moco espeso como consecuencia del defecto en el RCTFQ ocasiona un ciclo continuo de infección crónica e inflamación dominada por un infiltrado neutrofílico. Esta inflamación se caracteriza por la producción incrementada de citocinas proinflamatorias en pulmones. La liberación excesiva de oxidantes y proteasas, juega un papel importante en el daño al tejido. Éstas afectan la integridad de las fibras de elastina y

otras proteínas de matriz. La defensa antiproteasa del organismo es insuficiente debido a la combinación de proteasas endógenas y bacterianas (Terheggen-Lagro *et al*, 2005) (figura 5).

Finalmente, el establecimiento de ciclos continuos de infección e inflamación afectan de manera severa la capacidad pulmonar, ocasionando el deterioro y la muerte. (Terheggen-Lagro *et al*, 2005).

Se puede resumir que las anomalías inflamatorias pueden deberse a uno o más de los siguientes factores (Courtney *et al*, 2004):

1. Sobrecarga de proteasas endógenas y bacterianas.
2. Anormalidad primaria en la producción/regulación de citocinas, proteasas e inhibidores de proteasas.
3. Persistencia del estímulo para la producción de citocinas, como bacterias.
4. Respuesta anormal del epitelio y los neutrófilos de vías aéreas inferiores.

La inflamación es vista como una respuesta a la infección, sin embargo, hay estudios que muestran que la inflamación y la infección son eventos tempranos en la enfermedad pulmonar en infantes, en los cuales no existe enfermedad pulmonar (Cantin, 1995), por lo que es incierto determinar realmente cual es la causa inicial del ciclo persistente de inflamación-infección.

Las células epiteliales e inflamatorias de vías aéreas pulmonares producen citocinas. El estudio de sus funciones nos ayuda a comprender en parte los daños ocasionados al tejido pulmonar.

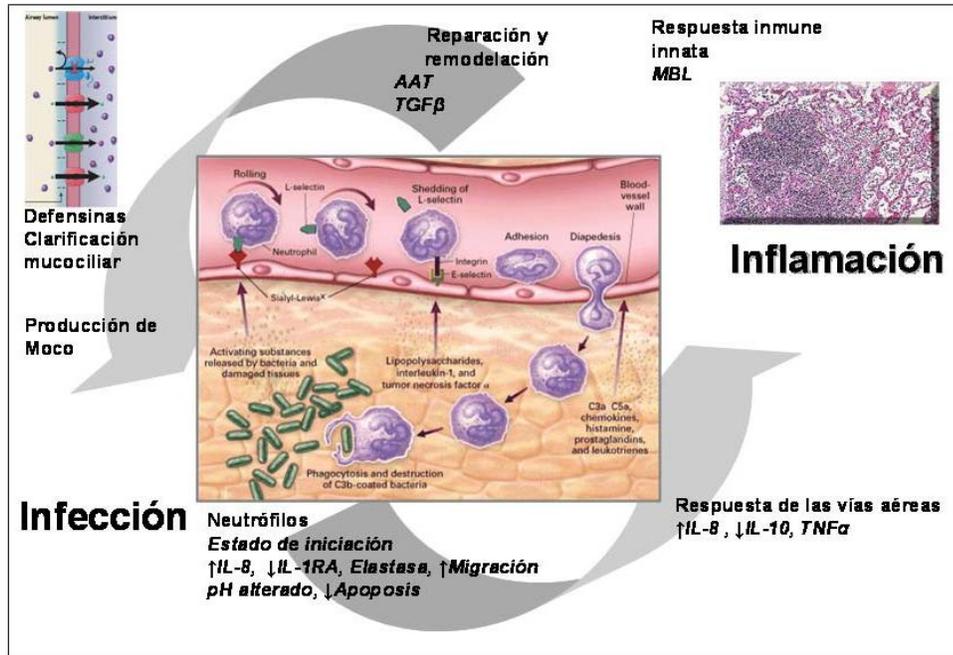


Figura 5. Proceso inflamatorio pulmonar en la FQ. Los mecanismos de defensa del huésped contra las agresiones activan la producción de defensinas y los mecanismos de clarificación mucociliar. (Terheggen-Lagro *et al*, 2005).

La búsqueda de genes candidatos se ha centrado así en la respuesta inmune o inflamatoria. Basándonos en trabajos realizados en otras poblaciones y en la fisiopatología de la FQ, seleccionamos cuatro biomarcadores: La Lectina de Unión a Manosa (MBL), la cual es una proteína de respuesta inmune innata que participa en opsonización y activación del complemento; la Interleucina 8 (IL-8), un potente quimiotáctico producido por neutrófilos y células epiteliales; el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFα) que es una citocina proinflamatoria, y la Alfa-1-antitripsina (AAT), antiproteasa que es el mecanismo de defensa contra la elastasa liberada por los neutrófilos. De acuerdo a las funciones que desempeñan, mismas que serán detalladas a continuación, podemos deducir que el defecto en MBL y AAT, así como el exceso de IL-8 y TNFα, pudieran estar implicados en la

severidad del cuadro inflamatorio. Es por ello el interés de buscar variantes genéticas que pudieran ser responsables de este desbalance pro inflamatorio-anti inflamatorio.

1.6.3 Lectina de Unión a Manosa (MBL)

La recurrencia de infecciones ha implicado a mediadores de la respuesta inmune innata del huésped como la MBL (OMIM #154545), que es una proteína secretada por el hígado como parte de la respuesta de fase aguda. Ésta proteína conduce a la opsonización así como a la activación de la cascada del complemento (Presanis *et al*, 2003). El gen que la codifica se denomina MBL2, y se localiza en la posición 10q11.2-q21. Posee 4 exones, y en el exón 1 se han reportado 3 variantes de importancia clínica: Arg52Cys (alelo D), Gly54Asp (alelo B) y Gly57Glu (alelo C), llamados en conjunto alelo O, siendo el alelo normal denominado como A (tabla 4). La mayoría de los reportes coinciden en considerar al gen que codifica para MBL como el gen modificador más importante para FQ, pues se ha asociado al fenotipo y severidad de la enfermedad pulmonar en estudios realizados en pacientes daneses, franceses, ingleses, belgas y norteamericanos (Garred *et al*, 1999a; Gabolde *et al*, 1999; Davies *et al*, 2004; Yarden *et al*, 2004; Muhlebach *et al*, 2006). En pacientes franceses se ha asociado a la severidad en la enfermedad hepática, específicamente cuando se presenta cirrosis (Gabolde *et al*, 2001), y a la unión a patógenos y colonización. En pacientes de Reino Unido, se observó que MBL se unió a *B. cepacia* para la activación de la cascada del complemento, pero no a *P. aeruginosa*, sugiriendo que en pacientes con FQ la deficiencia de MBL conduce a susceptibilidad por infección con *B. cepacia* (Davies *et al*, 2000). En pacientes suecos colonizados con *Staphylococcus aureus*, los genotipos deficientes de MBL se asociaron con función pulmonar disminuida (Carlsson *et al*, 2005).

La importancia de establecer el papel de MBL en los mecanismos de defensa del huésped radica en la posibilidad del uso de MBL recombinante como terapia en pacientes con FQ (Garred *et al*, 2002; Kilpatrick, 2003; Summerfield, 2003). No hay reportes de estudios de MBL2 en población mexicana.

Tabla 4. Descripción de los polimorfismos del exón 1 del gen MBL2

Polimorfismo	Gen	Transcrito	Posición relativa en el transcrito	Posición relativa en la proteína	Amino Ácido
MBL2: B: rs1800450 Alelos C/T. Alelo ancestral: C	ENSG00000165471	ENST00000373968	226-226	54-54	G/D
MBL2 C = rs1800451	ENSG00000165471	ENST00000373968	235-235	57-57	G/E
MBL2 D = rs5030737	ENSG00000165471	ENST00000373968	219-219	52-52	R/C

1.6.4 Interleucina 8 (IL-8)

Las quimiocinas son un grupo de moléculas pequeñas (8 a 14 kDa) estructuralmente relacionadas y principalmente de naturaleza básica, que regulan el tráfico celular de diversos tipos de leucocitos a través de interacciones con un grupo de receptores acoplados a proteínas G. Juegan un papel importante en desarrollo, homeostasis, y función del sistema inmune, y tienen efectos en las células del sistema nervioso central y en las células endoteliales involucradas en angiogénesis. En este grupo se encuentra la IL-8, llamada también: Péptido activador de neutrófilos-1 (NAP1, por sus siglas en inglés), Citocina pequeña inducible subfamilia B miembro 8 (SCYB8, por sus siglas en inglés), Péptido factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos 1 (MAP1), Proteína quimiotáctica de granulocitos 1(GCP1, por sus siglas en inglés) y Quimiocina 8 ligando CXC (CXCL8, por sus siglas en inglés) (OMIM #146930). Esta sustancia quimiotáctica es producida por una enorme variedad de células en respuesta a diferentes estímulos

inflamatorios como lipopolisacáridos de bacilos gram-negativos o a otras citocinas como TNF α e Interleucina 1 β (IL1B, por sus siglas en inglés). (Monton y Torres, 1998; Corvol *et al*, 2003). El gen que la codifica se localiza en el locus 4q12-q13, y se ha descrito una variante de importancia en el promotor: -251 T/A (rs4073, alelo ancestral: A). La variante -251T se reportó en alemanes como factor de riesgo para asma bronquial (Heinzmann *et al*, 2004), mientras que la variante -251A en familias del Reino Unido mostró una incidencia incrementada en bronquiolitis por virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés) (Hull *et al*, 2000). El genotipo -251T/T en holandeses se encontró protector del desarrollo de sarcoma de Kaposi visceral en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (van der Kuyl *et al*, 2004) y otro estudio en irlandeses mostró menor riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson (Ross *et al*, 2004). Finalmente, existe evidencia de la no asociación con asma y RSV de la variante -251T (Puthothu *et al*, 2006), pero sí de la variante recientemente descrita en alemanes IL-8 -781C/T (rs2227306).

Las concentraciones elevadas de IL-8 se han reportado en el esputo de pacientes norteamericanos (Sagel *et al*, 2007) y en muchas otras poblaciones. Hasta hace poco, se detectó en un primer grupo de pacientes con FQ y replicado en un segundo grupo, pertenecientes al registro norteamericano nacional de FQ, las variantes de IL-8 que modifican la severidad de la enfermedad pulmonar con consecuencias funcionales (Hillian *et al*, 2008). La variante -251T/A en nuestra población se ha relacionado a cáncer de estómago e infección con *Helicobacter pylori* (Garza-Gonzalez *et al*, 2007).

1.6.5 Factor de necrosis Tumoral alfa (TNF α)

Es una citocina pro-inflamatoria producida por diversas células, principalmente por macrófagos, que promueve la adhesión y migración de leucocitos, modula la hematopoyesis y el desarrollo de los linfocitos, induce otras citocinas y tiene un papel importante en la activación de macrófagos y la respuesta inmune en tejidos (Aldallal *et al*, 2002; Courtney *et al*, 2004) (OMIM # 191160). El gen se localiza en el cromosoma 6, en la región HLA clase III del complejo mayor de histocompatibilidad. Se conocen seis SNPs localizados río arriba en las posiciones -857, -851, -376, -308 y -238, así como en la región codificante en la posición +691. El alelo denominado TNF2 (-308A, rs 1800629) es el más estudiado, pues parece ser un fuerte activador transcripcional, y está asociado a niveles altos de TNF α , comparado al alelo TNF1 (-308G) (Chen *et al*, 2006). El análisis de las variantes TNF1/TNF2 en niños de Reino Unido con FQ demostró una asociación del genotipo heterocigoto con enfermedad pulmonar severa, medida como FEV₁ (Hull y Thomson, 1998). Otro estudio en población de Checoslovaquia y Bélgica demostró una asociación entre locus polimórfico TNF α +691g ins/del y severidad en la enfermedad pulmonar (Yarden *et al*, 2005). Un estudio de comparación de sobrevivencia y frecuencias genotípicas en pacientes norteamericanos encontró diferencias para los genotipos TNF α -238 (G/G contra G/A; p=0.022) y MBL2 (A/A contra O/O; p=0.016). Con una tasa de riesgo para adultos para TNF α -238 G/G contra G/A de 0.25 y para MBL2 de 2.5, sugiriendo un papel como genes modificadores de sobrevivencia (Buranawuti *et al*, 2007). Se ha reportado la frecuencia de este polimorfismo en población Mexicana (Sanchez-Dominguez *et al*, 2008), y en enfermedades como: lupus eritematoso sistémico (Zuniga *et al*, 2001), enfermedad reumática de corazón (Hernandez-Pacheco *et al*, 2003), colitis

ulcerativa (Yamamoto-Furusho *et al*, 2004), fiebre reumática (Sallakci *et al*, 2005), artritis reumatoide (Rodriguez-Carreon *et al*, 2005), enfermedad de Chagas (Rodriguez-Perez *et al*, 2005) y espondiloartritis (Vargas-Alarcon *et al*, 2006); así como en relación a envejecimiento (Soto-Vega *et al*, 2005), y alteraciones en el perfil de lípidos (Parra-Rojas *et al*, 2006).

1.6.6 Alfa (α)-1 Antitripsina (AAT)

La AAT, también denominada anti-elastasa y serpina 1, es un inhibidor de serin proteasas sintetizado principalmente en el hígado y en los macrófagos alveolares, que provee la principal defensa contra la elastasa de neutrófilos (OMIM #107400). Se ha propuesto que el balance proteasa-antiproteasa es de vital importancia para evitar el daño al parénquima pulmonar. El gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 14, en la región 14q.32.1. Entre otras, se consideran de importancia las variantes S y Z, siendo el alelo normal denominado como M (tabla 5). La variante S conduce a deficiencia moderada, mientras que el alelo Z es considerado de deficiencia severa (Graham *et al*, 1990), la cual está asociada a una tasa de declinación acelerada en la función pulmonar (Sandford *et al*, 2001).

Tabla 5. Descripción de los polimorfismos de la AAT

Alelo	Efecto	SNP de referencia
S	Glu264Val	A1A rs17580 (rs455519139)
Z	Glu342Lys	rs28929474

Existen reportes contradictorios de la influencia de los polimorfismos de AAT en FQ. Un estudio en Inglaterra mostró asociación de los genotipos de deficiencia con una mejor función pulmonar (Mahadeva *et al*, 1998a), aunque el mismo autor sugiere la realización de más estudios para involucrar más pacientes con fenotipos severos (Mahadeva *et al*, 1998b).

Otro estudio en Alemania mostró que en relación a infección con *P. aeruginosa*, no existió una influencia de los fenotipos de deficiencia, aunque el número de pacientes portadores de la deficiencia fue bajo (Meyer *et al*, 2002). Un estudio en población canadiense de pacientes con FQ, no mostró asociación con los alelos de deficiencia (Frangolias *et al*, 2003).

La deficiencia de AAT se creía que ocupaba el segundo lugar en frecuencia, superada sólo por FQ. Estudios en cohortes indican que la incidencia de los 5 genotipos de deficiencia (PiMS, PiMZ, PiSS, PiSZ, y PiZZ) es 1 en 9.8 en Canadá y 1 en 11.3 Estados Unidos (de Serres, 2003). Por otro lado, enfermedades pulmonares han mostrado tener relación con la deficiencia de AAT, como la enfermedad pulmonar obstructiva Crónica (EPOC) y asma entre otras, en pacientes de Suecia, EU y Alemania (Piitulainen y Sveger, 2002; Eden *et al*, 2003; Genuneit *et al*, 2006; Demeo *et al*, 2007). En nuestra población recientemente se publicó el reporte de frecuencias, donde el alelo Z no fue detectado y el alelo S se encontró presente en una proporción del 1.2% en población del noreste de México (Sanchez-Dominguez *et al*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La conclusión del proyecto del genoma humano en el año 2003, nos permitió alcanzar uno de los logros más importantes para la humanidad. Gracias a ello, podemos decir que ahora se conoce la secuencia de cerca de 3 mil millones de pares de bases que componen al DNA humano, y que en realidad tenemos un número menor de genes de lo que se pensaba (unos 30, 000). Actualmente se tiene almacenada toda esta información en bases de datos y con la mejora en las herramientas de análisis, toda esta información se encuentra en espera de ser descifrada, para no sólo identificar las mutaciones responsables de una determinada enfermedad, sino también encontrar las pistas que nos indiquen qué nos hace más susceptibles para desarrollarlas. Las consecuencias directas de estos avances han cambiado nuestro punto de vista sobre los padecimientos de origen genético, especialmente de las enfermedades monogénicas como la FQ. Al ser ésta uno de los desórdenes genéticos más frecuentes, los esfuerzos se habían encaminado a encontrar las mutaciones en el gen RCTFQ que hasta hace poco, se consideraba el único gen responsable del cuadro clínico de la FQ. Con la información generada desde su descubrimiento como entidad separada a la fecha, se ha demostrado que no basta diagnosticar la mutación sino comprender los factores involucrados en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se ha propuesto la participación de alrededor de 45 genes modificadores en la fisiopatología y en la variación del cuadro clínico (Cutting, 2005; Collaco y Cutting, 2008; Corvol *et al*, 2008). Es por ello que en este trabajo nos enfocamos al análisis de la mutación en el gen RCTFQ y de un grupo de genes modificadores que pueden afectar la respuesta pulmonar en los pacientes con FQ.

Para alcanzar un mayor entendimiento entre la asociación de las características genotípicas con las fenotípicas y considerando una amplia revisión bibliográfica, se observó que los genes modificadores más atractivos de ser estudiados eran IL-8, TNF α , AAT y MBL. De acuerdo a la función de cada una de estas proteínas, podemos deducir que la alteración en los niveles pudieran estar implicados en la severidad del cuadro inflamatorio. Este trabajo pretende encontrar si existe alguna influencia entre los polimorfismos de los genes modificadores seleccionados y el cuadro pulmonar, con el fin de comprender la fisiopatología de la FQ y encontrar la posible interacción de factores genéticos ajenos al RCTFQ, y determinar si estos genes modificadores podrían ser un factor de riesgo en el cuadro pulmonar en pacientes con FQ.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipotesis

Los polimorfismos en los genes modificadores MBL, IL-8, TNF α y AAT y sus niveles de expresión, junto con el análisis de las mutaciones en RCTFQ y las variables clínicas pueden ayudar a establecer si existe una correlación de la severidad del cuadro pulmonar en pacientes con FQ y establecer un perfil de riesgo.

3.2 Objetivo general

Analizar las mutaciones en RCTFQ en pacientes con FQ, así como los polimorfismos de los genes modificadores MBL, IL-8, TNF α y AAT y sus niveles de expresión, en referencia a las variables clínicas para determinar si existe correlación con la severidad del cuadro pulmonar y en consecuencia un perfil de riesgo del paciente.

3.3 Objetivos específicos

1. Establecer un banco de DNA y datos de pacientes con FQ, así como DNA de testigos.
2. Identificar el perfil de mutaciones en RCTFQ en pacientes con FQ.
3. Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes modificadores MBL, IL-8, TNF α y AAT en testigos y determinar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.
4. Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes modificadores en pacientes con FQ y determinar si existe dependencia con la enfermedad y factor de riesgo.
5. Comparar los niveles de proteínas MBL, IL-8, TNF α y AAT en suero/plasma de pacientes y testigos, y correlacionar con el genotipo de los genes modificadores.
6. Determinar si existe una correlación entre los polimorfismos en los genes modificadores, el genotipo en RCTFQ, las variables clínicas y el fenotipo pulmonar de la FQ.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

El estuche para el tamizaje de las 36 mutaciones fue INNO-LiPA CFTR36 de Innogenetics (Technologiepark 6, 9052 Gent, Belgium). Se utilizó amortiguador de PCR, MgCl₂ y dNTP's (Promega, Madison WI 53711, EUA). La Taq DNA Polimerasa se produjo en el laboratorio a partir de una cepa de *Escherichia coli* recombinante. Los oligonucleótidos fueron de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA 92008, EUA.). Las endonucleasas de restricción *Ban* I, *Mbo* II, *Mwo* I, *Taq* I, *Nco* I y *Mfe* I fueron de la marca New England Biolabs (Ipswich, MA EUA). La esputolisina No cat. 560000 fue de Calbiochem (Gibbstown, NJ 08027, EUA.). El amortiguador salino fosfato (D-PBS) No. cat. 14190-144 fue de Dulbeco (Carlsbad, CA 92008, EUA). De Sigma (St. Louis, MO 63178, EUA) fueron: polimetil sulfonil fluoruro PMSF, cat. No. P7626-5G, Acido Etilen Diamino Tetra sódico EDTA cat. No. AB6138 y Agarosa cat. No. A9539. La agarosa Nusieve GTG cat. No. 50080 fue de BMA products (Rockland, ME EUA).

4.2 Equipos

Los termocicladores PTC 100 de MJ Research con tapa caliente y MJ mini personal Thermal Cycler así como la fuente de poder Power Pac 3000 fueron de Bio Rad (Hercules, CA 94547, EUA). El Sistema de fotodocumentación Modelo M-26 de la marca UVP, LLC (Upland, CA, EUA), el Nanodrop 1000 y la cámara de electroforesis Maxicell EC360M fueron de Thermo Scientific (Wilmington, Delaware EUA), y la cámara de electroforesis horizontal de la marca Fotodyne (950 Walnut Ridge Drive. Hartland, WI 53029 EUA). De Lab Line Instruments (Melrose Park, Ill, USA) fueron la placa de agitación orbital Mod

3508 y el baño de agua con agitación Mod. 3540. (Hércules, CA 94547, EUA). La incubadora mod. 1330 FX fue de Shel Lab (Cornelius, OR 97113, EUA). El lector de placas de ELISA fue modelo Lambda ELX800 de la marca Bio Tek Inc. (Highland Park, Winooski, VT 05404, EUA). Las centrifugas fueron Micro Eppendorf Modelo 5417C (Westbury NY 11590 EUA) y Labnet Hermle Line Z300K (Eddison, NJ 08837, EUA). Las pipetas de precisión de 2, 10, 20, 100 y 1000 μ L fueron de la marca Pipetman (Middleton, WI 53562, EUA).

La estrategia de trabajo se presenta en la figura 6.

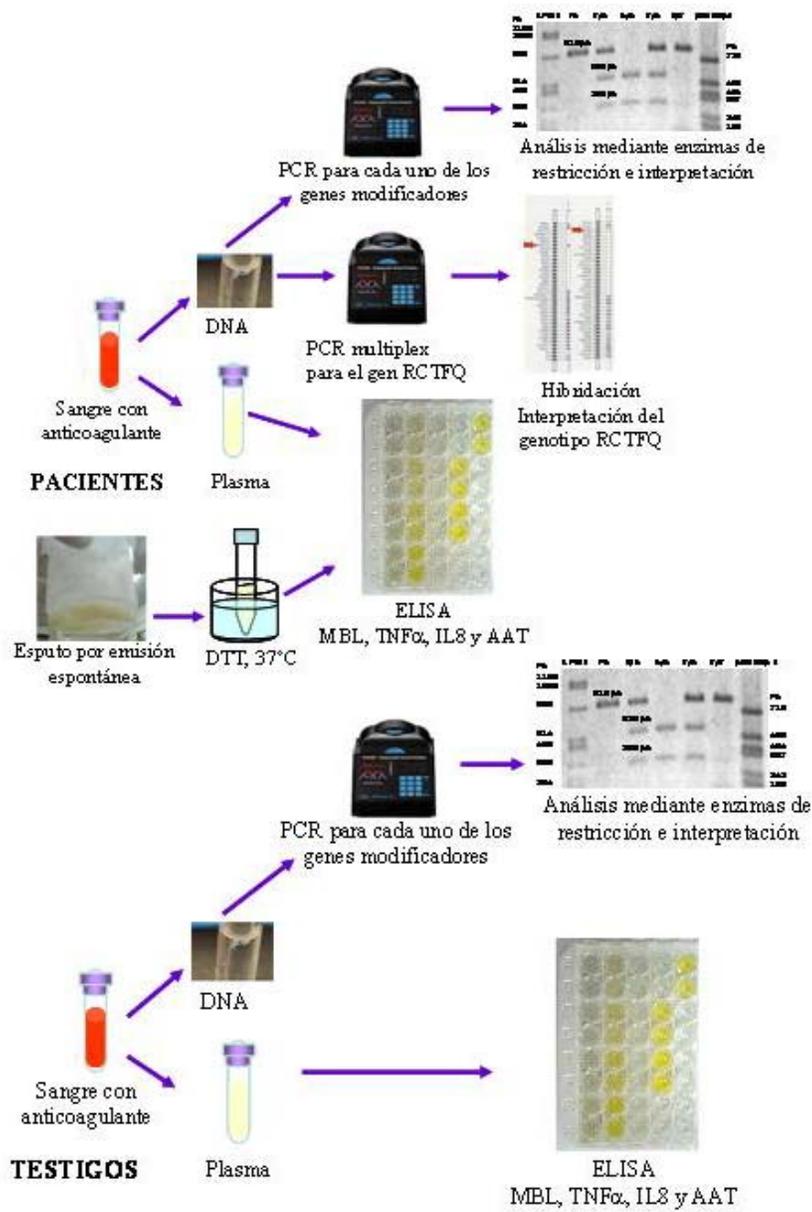


Figura 6. Estrategia general de trabajo. Diagrama de flujo del uso de las muestras provenientes de pacientes y testigos.

4.3 Establecimiento de un banco de datos de pacientes con FQ y de DNA de pacientes y testigos

4.3.1 Selección de pacientes con FQ

Los pacientes incluidos en este trabajo fueron atendidos en el CEPREP. Contestaron un cuestionario y firmaron una carta de consentimiento. Si los pacientes fueron menores de edad, la carta de consentimiento fue firmada por los padres.

Criterios de inclusión

- a) Electrolitos positivos en sudor
- b) Estudio genético de mutaciones en RCTFQ previo o a realizarse durante el desarrollo del trabajo. Con un alelo o dos positivos para mutación en RCTFQ (en casos excepcionales sin mutación diagnosticada si el cuadro clínico de FQ fue muy franco).
- c) Pacientes sin cuadro agudo al momento de la toma.
- d) Pacientes que no recibieron tratamiento 2 semanas antes de las toma de muestras.

Criterios de exclusión

- Pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión.
- Pacientes que abandonaron el estudio
- Pacientes a quienes se les diagnosticó algo diferente a FQ
- Personas que no firmaron la carta de consentimiento o no accedieron entrar al estudio

4.3.2 Establecimiento de banco de datos de los pacientes con FQ

Para incluir al paciente en el banco de datos, fue requisito que hubiera asistido regularmente a consulta (un mínimo de dos veces al año) y que en el expediente se hubieran registrado los siguientes datos:

1. Fecha de nacimiento
2. Sexo
3. Edad de Diagnóstico
4. En caso de fallecimiento, edad del deceso
5. Grado de enfermedad Pulmonar, se clasificó como leve, moderada y severa. Para menores de 6 años se consideró el cuadro clínico y para mayores de 6 años se midió FEV₁ además del cuadro clínico.
6. Presencia de insuficiencia pancreática
7. Presencia de enfermedad hepática
8. Persistencia de enfermedad con *P. aeruginosa* demostrada por cultivo
9. Persistencia de enfermedad con *B. cepacia* demostrada por cultivo
10. Cor Pulmonale
11. Índice de masa corporal (IMC)
12. Ileo meconial
13. Estado socioeconómico (malo, regular, bueno)

4.3.3 Selección de personas testigo

Los testigos fueron sujetos sin FQ voluntarios del área médica, que contestaron un cuestionario y firmaron una carta de consentimiento. Se les tomó muestra de sangre que se empleó para el análisis de polimorfismos y citocinas en plasma.

Criterios de inclusión.

- a) Ser originarios del noreste de México, al menos desde dos generaciones previas.
- b) No padecer alguna de las siguientes enfermedades:
 - Infecciones respiratorias recurrentes (más de 10 veces al año)
 - Asma
 - Alergia

Criterios de exclusión:

- Testigos que no cumplan los criterios de inclusión.
- Testigos que no firmaron la carta de consentimiento o no accedieron entrar al estudio

4.3.4 Extracción de DNA a partir de sangre periférica

El DNA se extrajo a partir de sangre periférica con EDTA como anticoagulante, mediante la técnica de TSNT (Martínez-Jarreta 1999). El tubo conteniendo la sangre se centrifugó a 1,700 X g por 10 min. De la interfase se tomaron 500 μ L para recuperar el paquete de células blancas y se colocaron en un microtubo de 2.0 mL. Se agregaron 200 μ L de amortiguador de lisis TSNT (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCl pH 8 10mM, EDTA pH 8 1mM) y se mezcló por inversión o en vórtex durante 30 seg. Se agregaron 500 μ L de fenol saturado y se mezcló por inversión o en vórtex durante 30 seg. Se añadieron 100 μ L de sevag (Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v) y se mezcló en vórtex durante 5 min. Se añadieron 100 μ L de TE 1X y se mezcló por inversión o en vórtex durante 30 seg, y finalmente se centrifugó 8 min, a 20,800 X g.

Se transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló gentilmente por inversión. Se centrifugó la pastilla de DNA 8 min a 20,800 X g y se decantó el sobrenadante. Se lavó la pastilla agregando 500 μ L de etanol al 70%. Se centrifugó 8 min a 20,800 X g, se secó la pastilla de DNA a temperatura ambiente, y se resuspendió la pastilla en 200 μ L TE 1X (EDTA 100mM y Tris HCl 1M). El DNA fue cuantificado en el Nanodrop.

4.4 Determinación del perfil de frecuencias de mutaciones en RCTFQ

El diagnóstico de la mutación se realizó con el estuche comercial INNOLiPA CFTR36. Consistió en dos reacciones de PCR múltiplex con iniciadores biotinilados. Una vez verificada la amplificación en un gel de agarosa al 2%, los productos se hibridaron en sondas unidas a membrana. Un resultado positivo se manifestó como la aparición de una banda color violeta. El procedimiento experimental completo se describió en el Anexo 1.

4.5 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de genes modificadores en pacientes y testigos

Los iniciadores y las estrategias se adaptaron de los métodos reportados en la literatura (Sandford *et al*, 1999a; Tin *et al*, 2005; Lee *et al*, 2005; Chen *et al*, 2006). Para estandarizar los procedimientos, se empleó el DNA proveniente de un testigo. Se realizaron gradientes de temperatura y una vez seleccionada la temperatura adecuada, se tituló la concentración de iniciadores y MgCl₂. Los productos amplificados se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLPs). Finalmente se procedió a procesar los DNA provenientes de los grupos de estudio de pacientes y testigos.

4.5.1 Identificación de los alelos A, B, C y D del exón 1 del gen MBL2

Se realizó basándose en el método descrito por Tin *et al*, 2005. La reacción de PCR para la amplificación del fragmento del exón 1 se muestra en la tabla 6, y el programa de PCR en el termociclador de Bio Rad se detalla en la tabla 7.

Tabla 6. Condiciones de la PCR para la detección de los alelos A, B, C y D del gen MBL2.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador 10X	1X
Iniciador E1-MBL F	0.5 μ M
Iniciador E1-MBL R	0.5 μ M
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP's	0.2 mM
Taq DNA polimerasa	2.5 U
DNA	0.2-1 μ g
Agua ultrapura estéril	CBP 25 μ l

Tabla 7. Programa de ciclos de la PCR para MBL2.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	30 seg
3	58	30 seg
4	72	30 seg
5	40 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

La identificación de los alelos A, B, C y D se realizó mediante digestión por separado con las enzimas de restricción *Mwo I*, *Mbo II* y *Ban I* respectivamente, para lo cual se empleó 6 μ L de producto amplificado. Las condiciones se especifican en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de digestión del producto amplificado de MBL2.

Codón	Enzima	Cantidad, U	Temperatura °C
52	<i>Mwo</i> I, 5 U/ μ L	1	60
54	<i>Mbo</i> II, 5 U/ μ L	1	37
57	<i>Ban</i> I, 20 U/ μ L	4	37

Las digestiones se incubaron a la temperatura indicada para cada caso, durante toda la noche. Los productos de las digestiones *Mwo* I y *Ban* I se analizaron en un gel de agarosa al 2%, y para *Mbo* II, se analizó en gel de agarosa al 3% (con 1% de Nusieve), teñido con bromuro de etidio. Se comparó contra el marcador de pares de bases pBS + *Msp* I, y producto amplificado sin digerir. La imagen se documentó en el sistema de foto documentación UVP.

4.5.2 Identificación del polimorfismo -251 T/A del gen que codifica para IL-8

Se realizó basándose en el método descrito por Lee *et al*, 2005. La reacción (tabla 9), y el programa de PCR en el termociclador PTC 100 de MJ Research (tabla 10) se describen a continuación.

Tabla 9. Condiciones de la PCR para la detección del polimorfismo -251 T/A de IL-8.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador 10X	1X
Iniciador IL-8-F2	0.2 μ M
Iniciador IL-8-R	0.2 μ M
MgCl ₂	2 mM
dNTP's	0.2 mM
Taq DNA polimerasa	2.5 U
DNA	0.2-1 μ g
Agua ultrapura estéril	CBP 25 μ l

Tabla 10. Programa de ciclos de la PCR para IL-8.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	95	5 min
2	95	1 min
3	55	1 min
4	72	5 m
5	30 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

Para la identificación de los alelos -251T/A se sometió a digestión 6 μ L de producto amplificado con 1 unidad de la enzima *Mfe* I (5 U/ μ L) a 37°C durante toda la noche. Los productos de las digestiones se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se comparó contra el marcador de pares de bases pBS + *Msp* I, y producto amplificado sin digerir. La imagen se documentó en el sistema de foto documentación UVP.

4.5.3 Identificación del polimorfismo -308 G/A del promotor del gen que codifica para TNF α

La identificación de los alelos TNF1 (G) y TNF2 (A) del promotor del gen de TNF α (Chen *et al*, 2006), la reacción de PCR (tabla 11) y el programa de PCR en el termociclador Bio Rad (tabla 12) se muestran a continuación.

Tabla 11. Condiciones de la PCR para la detección de los alelos TNF1/TNF2.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador 10X	1X
Iniciador TNF308-F	0.5 μ M
Iniciador TNF308-R	0.5 μ M
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP's	0.2 mM
Taq DNA polimerasa	2.5 U
DNA	0.2-1 μ g
Agua ultrapura estéril	CBP 25 μ l

Tabla 12. Programa de ciclos de la PCR para TNF1/TNF2.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	30 seg
3	61	30 seg
4	72	30 seg
5	40 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

La identificación de las versiones normal (G) y mutante (A) del polimorfismo -308 se realizó por digestión de 6 μ L de producto amplificado con 0.3 U de la enzima *Nco* I (5 U/ μ L) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Los productos de las digestiones se analizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se comparó contra el marcador de pares de bases pBS + *Msp* I, y producto amplificado sin digerir. La imagen se documentó en el sistema de foto documentación UVP.

4.5.4 Identificación de los alelos S y Z del gen que codifica para la AAT

Las condiciones para la reacción de PCR (Sandford *et al*, 1999a) para ambas variantes (tablas 13 y 14), y el programa de PCR en el termociclador PTC 100 de MJ Research (tabla 15) se muestran a continuación.

Tabla 13. Condiciones de la PCR para la detección del alelo S de la AAT.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador 10X	1X
Iniciador AATS-F	1 μ M
Iniciador AATS-R	1 μ M
MgCl ₂	2 mM
dNTP's	0.2 mM
Taq DNA polimerasa	2.5 U
DNA	0.2-1 μ g
Agua ultrapura estéril	CBP 25 μ l

Tabla 14. Condiciones de la PCR para la detección del alelo Z de la AAT.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador 10X	1X
Iniciador AATZ-F	0.5 μ M
Iniciador AATZ-R	0.5 μ M
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP's	0.2 mM
Taq DNA polimerasa	2.5 U
DNA	0.2-1 μ g
Agua ultrapura estéril	CBP 25 μ l

Tabla 15. Programa de ciclos de la PCR para AATS/Z.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	30 seg
3	57	30 seg
4	72	30 seg
5	35 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

La identificación de las versiones normal y mutante de los alelos S y Z de AAT se realizó mediante digestión con la enzima de restricción *Taq* I, para lo cual se sometió a digestión 6 μ L de producto amplificado con 4 U de *Taq* I (20 U/ μ L) y se incubó a 65°C durante toda la noche. Las digestiones se analizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se comparó contra el marcador de pares de bases pBS + *Msp* I y producto amplificado sin digerir. La imagen se documentó en el sistema de foto documentación UVP.

4.6 Cuantificación de proteínas en suero/plasma y esputo de pacientes y testigos mediante ELISA

Para la detección de los niveles de citocinas en muestras de suero/plasma y esputo almacenadas a -70°C se emplearon estuches comerciales de ELISA (R&D Systems, ALPCO y AntibodyShop). Los protocolos completos para cada ELISA se describieron en los anexos 3 al 6.

4.6.1 Procesamiento de esputo

El esputo se colectó por emisión espontánea en un recipiente estéril. Se siguió el método proporcionado por el Dr. Sagel del Children's Hospital de Denver, Colorado (comunicación personal).

Se determinó el peso de la muestra de esputo. Se mezcló 1 parte de esputo con 3 partes de PBS estéril a temperatura ambiente y 4 partes de esputolisina al 10% recién preparada. Se incubó en un baño de agua a 37°C con agitación a 160-170 rpm por 15 min, mezclando el espécimen con una pipeta de transferencia de polietileno cada 5 min para asegurar la homogenización completa.

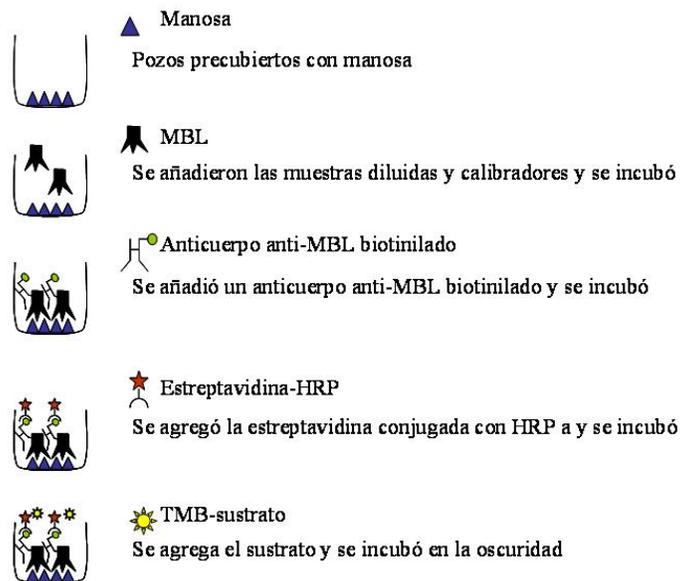
Se centrifugó el homogenado a $250 \times g$, 10 min, a 4°C . Se transfirió el sobrenadante con una pipeta de transferencia de polietileno por aspiración en otro tubo de polipropileno de centrifuga. Se centrifugó el sobrenadante a $4000 \times g$ por 20 min a 4°C para colectar los restos celulares. Se transfirió el sobrenadante con una pipeta de transferencia de polietileno a un tubo de centrifuga de polipropileno.

Se almacenó a -70°C una parte del sobrenadante en alícuotas de 1 mL en tubos de 2 mL etiquetado como “sin inhibidores”, con la identificación del paciente para estudios posteriores.

Al resto se le agregó PMSF 100 mM a razón de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y EDTA 200 mM a razón de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (ambos componentes actúan como antiproteasas). Se almacenó en alícuotas de 1 mL en tubos de 2 mL etiquetado como “con inhibidores”, con la identificación del paciente, y se almacenó a -70°C . Todas las pastillas fueron almacenadas a -70°C para estudios futuros.

4.6.2 Cuantificación de MBL funcional

Se utilizó el estuche comercial MBL Mannanan-binding ELISA Kit (AntibodyShop, estuche 030). Este ensayo fue altamente selectivo para medir la actividad de MBL oligomerizada y funcionalmente activa. El ensayo se realizó en micropozos cubiertos con manosa proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. Las muestras de plasma, suero y esputo se diluyeron en el amortiguador con calcio. La MBL unida a la manosa de la superficie se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-MBL biotinilado. Ésto se cuantificó mediante un conjugado de peroxidasa de rábano y estreptavidina con posterior incubación con el sustrato cromógeno, lo cual permitió la cuantificación de MBL funcional presente en el calibrador o muestra añadida mediante un lector de placas de ELISA. Los calibradores de 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ng/mL, así como las muestras fueron analizados por duplicado. El método en general se presenta en la figura 7.



La reacción se bloqueó con medio ácido y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Figura 7. Esquema general del desarrollo de ELISA para medir MBL funcional.

4.6.3 Cuantificación de IL-8

Se utilizó el estuche Quantikine Human CXCL8/IL-8 (R&D Systems). Se empleó la técnica cuantitativa de enzimo-inmunoensayo tipo sándwich. Los calibradores y las muestras se colocaron en pozos pre-cubiertos con anticuerpos monoclonales anti IL-8, los cuales capturaron la IL-8 presente en suero. Se agregó un anticuerpo policlonal anti IL-8 conjugado con peroxidasa. Finalmente para la reacción de color se añadió tetrametilbencidina a los calibradores y muestras. La cuantificación de IL-8 se realizó mediante un lector de placas de ELISA. Los calibradores de 5, 7.3, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 pg/ml, así como las muestras fueron analizados por duplicado (figura 8).

4.6.4 Cuantificación de TNF α

Se utilizó el estuche Quantikine Human TNF- α /TNFSF1A (R&D Systems). Se empleó la técnica cuantitativa de enzimo-inmunoensayo tipo sándwich. Se agregaron los calibradores y las muestras en pozos pre-cubiertos con anticuerpos monoclonales anti TNF α . Posteriormente se agregó un anticuerpo policlonal anti TNF α conjugado con peroxidasa. La adición final de tetrametilbencidina como sustrato cromógeno permitió la cuantificación de TNF α presente en el calibrador o muestra añadida mediante un lector de placas de ELISA. Los calibradores de 5.0, 7.3, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 pg/ml, así como las muestras se analizaron por duplicado (figura 8).

4.6.5 Cuantificación de AAT

Se utilizó el estuche α 1-Antitripsin Clearance EIA (Alpco Diagnostics, Cat. No. 30-6752). El ensayo consistió en la técnica cuantitativa de enzimo-inmunoensayo tipo sándwich, con 2 anticuerpos policlonales que se unieron a AAT humana. Los calibradores y las muestras pre-diluidas se agregaron en pozos pre-cubiertos con anticuerpos policlonales de alta afinidad para AAT. Durante la primera incubación, la AAT se fijó por el anticuerpo inmovilizado. Después se agregó un anticuerpo anti AAT conjugado con peroxidasa. Se utilizó tetrametilbencidina como sustrato cromógeno, y se cuantificó la AAT presente en el calibrador o muestra añadida mediante un lector de placas de ELISA. Los calibradores de 3.3, 10, 30 y 90 $\mu\text{g/L}$, así como las muestras fueron analizados por duplicado (figura 8).

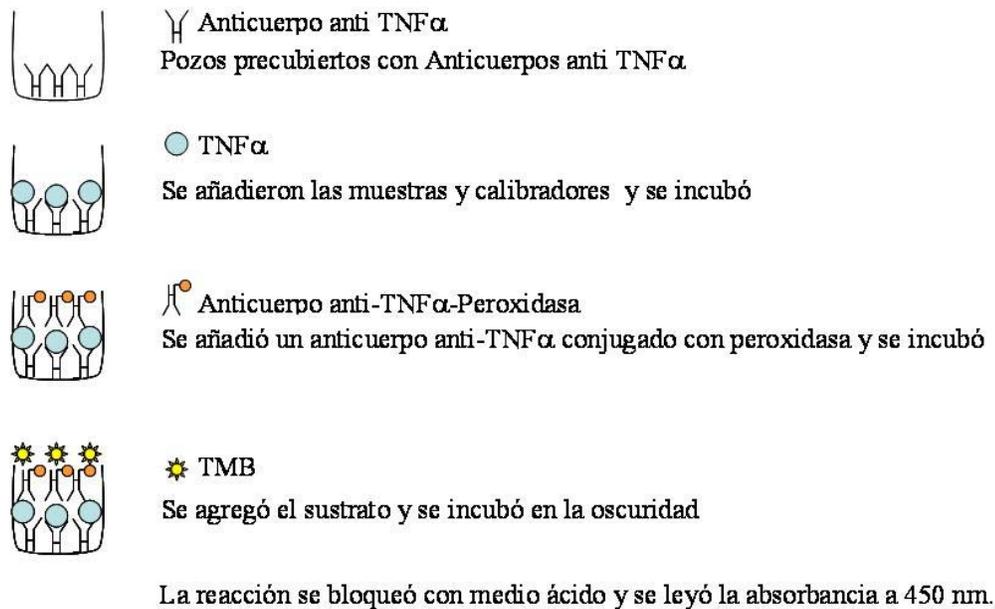


Figura 8. Esquema general del desarrollo del ELISA para medir $\text{TNF}\alpha$. El mismo esquema es válido para IL-8 y AAT.

4.7 Correlación entre los polimorfismos de genes modificadores, genotipos en RCTFQ, variables clínicas y fenotipo pulmonar

Para determinar la presencia de correlación entre las variables analizadas y el fenotipo pulmonar se simplificó el genotipo en RCTFQ clasificando los pacientes como $\Delta F508/\Delta F508$, $\Delta F508/X$ y X/X , donde X es una mutación (conocida o desconocida) diferente a $\Delta F508$. Para MBL, como otros autores lo han reportado (Garred, 1999; Buranawti, 2007), en ocasiones se agrupó a los portadores heterocigotos de una mutación (A/D, A/B o A/C) como A/O y a los homocigotos o heterocigotos compuestos como O/O, siendo el genotipo normal el A/A. El resto de los resultados fueron analizados estadísticamente de manera directa.

4.8 Análisis estadísticos

Se emplearon los programas Excel, Minitab y SPSS.

- Las frecuencias de los genes modificadores se analizaron empleando la prueba de ajuste de bondad mediante la Chi cuadrada (X^2) para determinar si la muestra de la población del Noreste de México se encontraba en Equilibrio de Hardy-Weinberg,
- La comparación de genotipos de genes modificadores de pacientes contra testigos se realizó con pruebas de independencia basadas en X^2 y Razón de momios (OR).
- Los niveles de proteínas en suero/plasma de pacientes y testigos se compararon mediante la Prueba U de Mann-Whitney.
- La correlación entre los polimorfismos en los genes modificadores, el genotipo en RCTFQ, las variables clínicas y el fenotipo pulmonar se determinó mediante la prueba de correlación de Rho de Spearman (r_s).
- La sobrevida de los pacientes para encontrar factores clínicos y genéticos determinantes, se verificó mediante gráficas de Kaplan-Meier.

5. RESULTADOS

5.1 Establecimiento de un banco de DNA de pacientes con FQ y testigos

5.1.1 Características del grupo de pacientes y tipos de muestras obtenidas

I. Obtención del DNA

Se reunieron 81 DNAs de pacientes con FQ en cantidad y calidad adecuadas para el análisis molecular en RCTFQ y frecuencias alélicas y genotípicas de genes modificadores, con las siguientes características:

- a) Del banco de DNA de la Unidad de Diagnóstico Molecular: positivos para una o dos mutaciones (n=41).
- b) Pacientes nuevos: positivos para una o dos mutaciones (n=36).
- c) Casos especiales: pacientes con todos los datos clínicos característicos de FQ negativos para las 36 mutaciones analizadas (n=4).

II. Muestras biológicas adicionales.

De 11 pacientes se recolectó suero/plasma y cinco de éstos fueron productores espontáneos de esputo y fue recolectado y procesado para el análisis de proteínas (figura 9).

5.1.2 Características del grupo de testigos y tipos de muestras obtenidas

I. DNA

Se colectaron 104 DNAs de testigos sanos de las cuales por lo menos tres generaciones previas fueron originarias de la región noreste de México (figura 10). La edad promedio fue 25.94 ± 7.65 , y el 80% fueron mujeres. Estos DNAs se emplearon para el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de genes modificadores.

II. Muestras biológicas adicionales.

Se recolectó suero/plasma de un subgrupo de 16 testigos (figura 9).

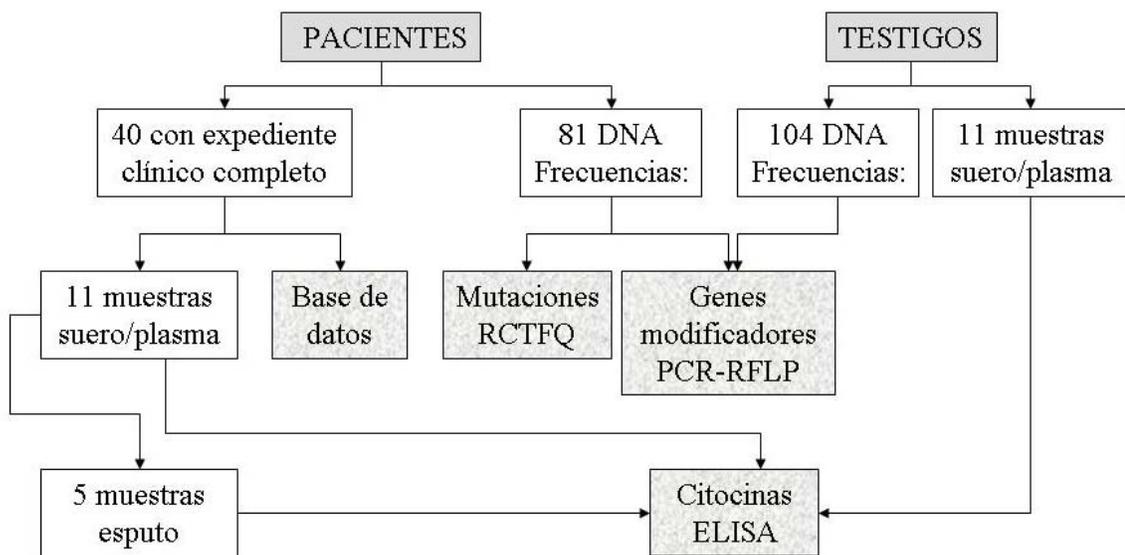


Figura 9. Muestras de DNA, suero/plasma y esputo recolectadas de los grupos de estudio y tipo de análisis realizados.

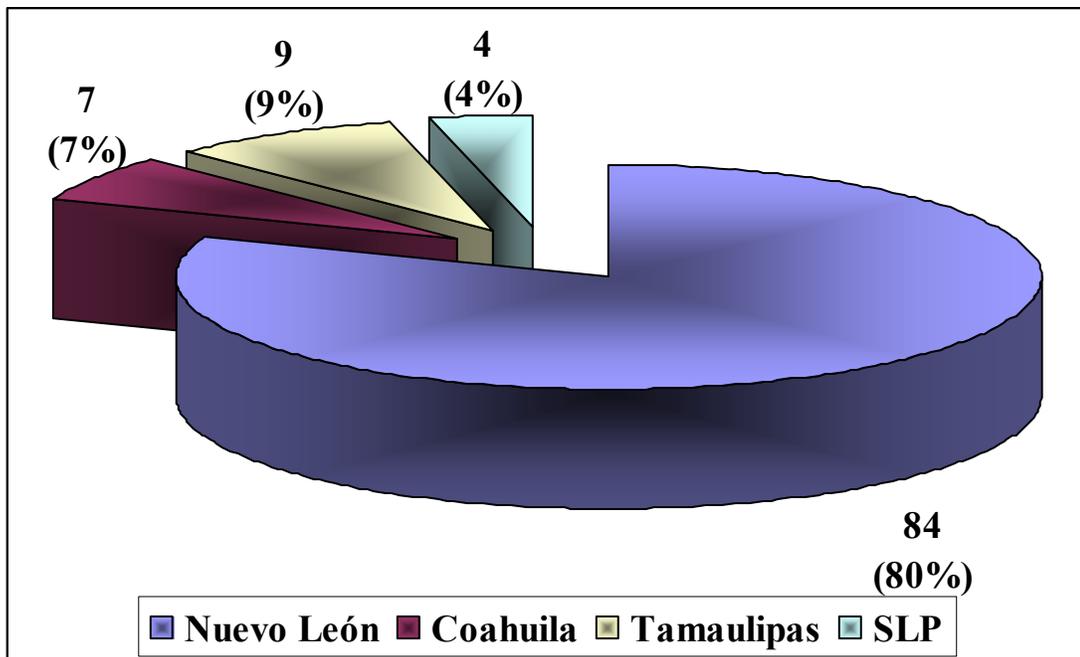


Figura 10. Distribución geográfica de los 104 testigos incluidos en el trabajo. Se indica el número de testigos y entre paréntesis el porcentaje correspondiente para cada estado del Noreste de México.

5.2 Establecimiento de un banco de datos de pacientes con FQ

40 de los 81 pacientes incluidos en los estudios de frecuencias contaron con expediente clínico completo para los estudios de correlación. De ellos a continuación se presentan los datos demográficos más relevantes:

- *Sexo*: 21 pacientes hombres y 19 mujeres.
- *Edad de diagnóstico*: edad promedio 5.1 años, mediana: 3 años, moda: 1 año (desviación estándar de 6.4), con un rango de edades de 0 a 34 años.
- *Fenotipo pulmonar*. 10 con cuadro leve, 14 con cuadro moderado y 16 con cuadro severo.
- *Edad de fallecimiento*: 16 pacientes: 10 mujeres y 6 hombres, de un promedio de edad de 13.4 años, con mediana y moda de 8 años (desviación estándar 10.99). El rango fue de 2 a 38 años.
- *Insuficiencia pancreática*: 18 hombres y 18 mujeres.
- *Enfermedad hepática*: 6 hombres y 1 mujer.
- *Infección con P. aeruginosa y B. cepacia*: 18 positivos para *P. aeruginosa*, 14 positivos para *P. aeruginosa* y *B. cepacia*, y 8 negativos para ambas.
- *Cor pulmonale*: 8 hombres y 10 mujeres, perteneciendo cuatro al fenotipo pulmonar moderado y 14 al severo.

La distribución geográfica de los pacientes se muestra en la figura 11.

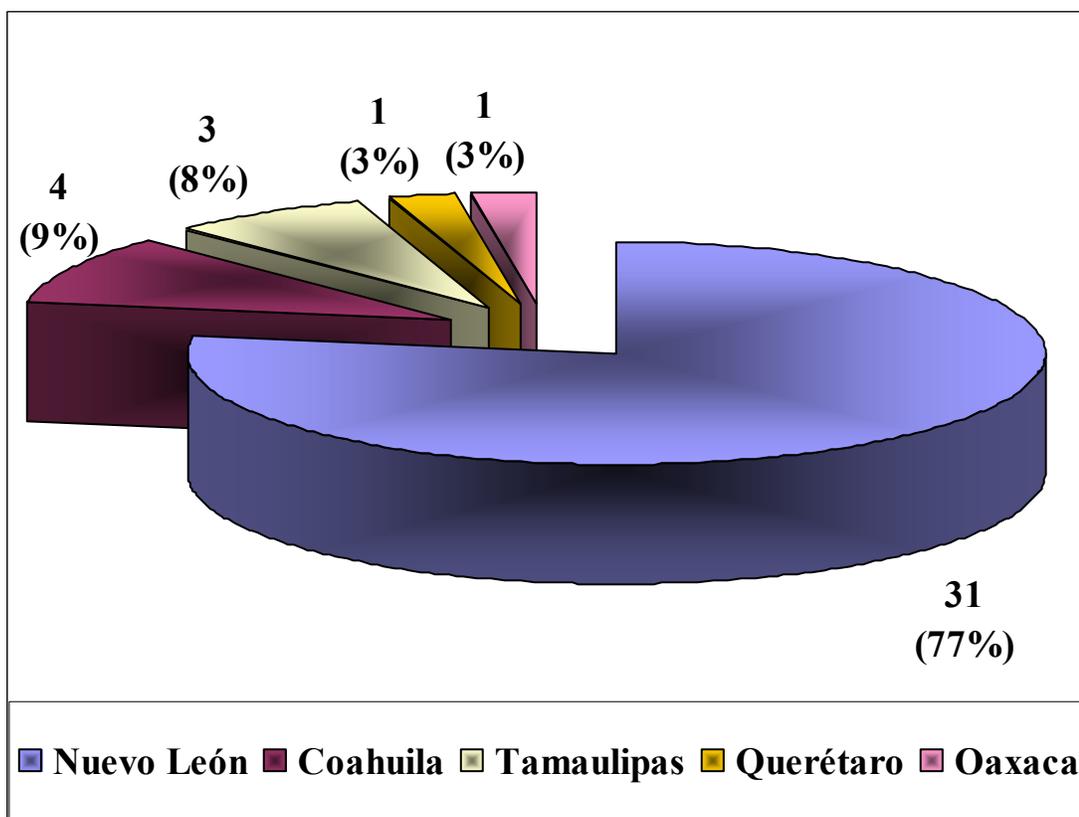


Figura 11. Distribución geográfica de los 40 pacientes con expediente clínico incluidos en el trabajo. Se indica el número de pacientes y entre paréntesis el porcentaje correspondiente para cada estado.

5.2.1 Características del subgrupo de pacientes homocigotos $\Delta F508$

Debido a la frecuencia de la mutación $\Delta F508$, se describió las características clínicas del grupo de homocigotos (tabla 16), donde los eventos con mayor frecuencia fueron la insuficiencia pancreática y la infección por *P. aeruginosa*.

Tabla 16. Características clínicas del subgrupo de pacientes homocigotos $\Delta F508$ (n=12).

Signo clínico	No. de Pacientes	%
Enfermedad pulmonar leve	3	23
Enfermedad pulmonar moderada	4	33
Enfermedad pulmonar severa	5	42
Insuficiencia pancreática	12	100
Enfermedad hepática	4	33
Infección recurrente con <i>P. aeruginosa</i>	10	83
Infección recurrente con <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. cepacia</i>	3	25
Cor Pulmonale	6	50
Fallecimiento	6	50

5.2.2 Genotipos de RCTFQ en pacientes fallecidos

De los 16 pacientes que fallecieron, predominaron aquellos que portaron la mutación $\Delta F508$ en uno (n=5) o ambos (n=6) alelos. Una paciente $\Delta F508$ homocigoto con enfermedad pulmonar leve, presentó cuadro hepático e insuficiencia pancreática que influyeron en la sobrevivencia. Los tres pacientes fallecidos con enfermedad moderada, con genotipos en RCTFQ 2789+5G→A/X, $\Delta F508/X$ y $\Delta F508$ homocigoto, fueron diagnosticados entre los 10 y 21 años. Se graficó la distribución de número de pacientes fallecidos y los correspondientes genotipos (figura 12).

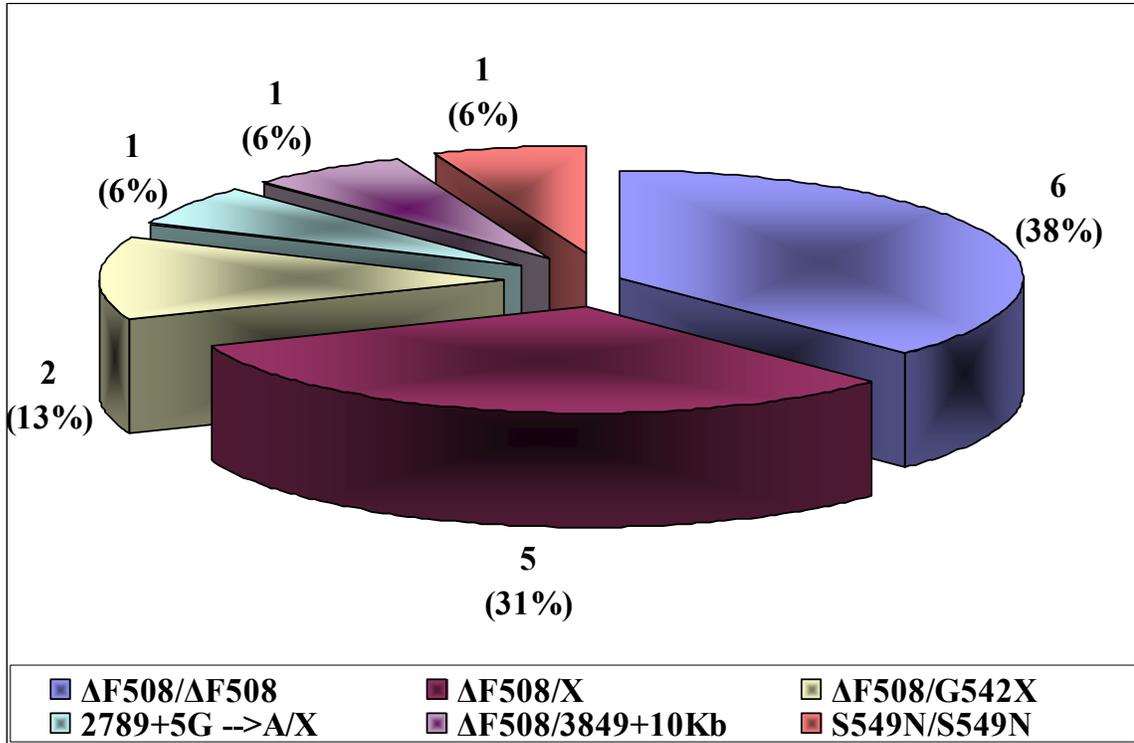


Figura 12. Distribución de número de pacientes fallecidos de acuerdo al genotipo. Se incluye entre paréntesis el número de pacientes por genotipo y el porcentaje del total.

5.3 Perfil de frecuencias de mutaciones en RCTFQ

De las 81 muestras de DNA de pacientes con diagnóstico clínico de FQ, 41 de ellas se analizaron las mutaciones en RCTFQ durante el desarrollo de la tesis mediante hibridación con sondas oligo-alelo específicas. Las mutaciones en RCTFQ del resto (40) fueron previamente analizadas mediante estuches de hibridación con sondas ASO de 16 y 26 mutaciones (Roche). La prueba empleada en esta tesis detectó tanto la versión normal como la mutante para cada una de las 36 mutaciones analizadas, por lo que fue posible determinar el estado de homocigoto, heterocigoto, o un segundo alelo desconocido (figura 13). Una lista de las mutaciones incluidas se describió en el anexo 1. En el 55% de los pacientes se detectaron ambos alelos mutantes, mientras que en el 40% se detectó un alelo mutante (figura 14) Aquellos en los que no se detectó mutación, que corresponde a un 5%, no fueron descartados pues poseen el cuadro clínico característico y sus DNA serán secuenciados.

La tabla 17 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas de los 81 pacientes con FQ analizados. Permanecieron sin identificar el 25% de los alelos.

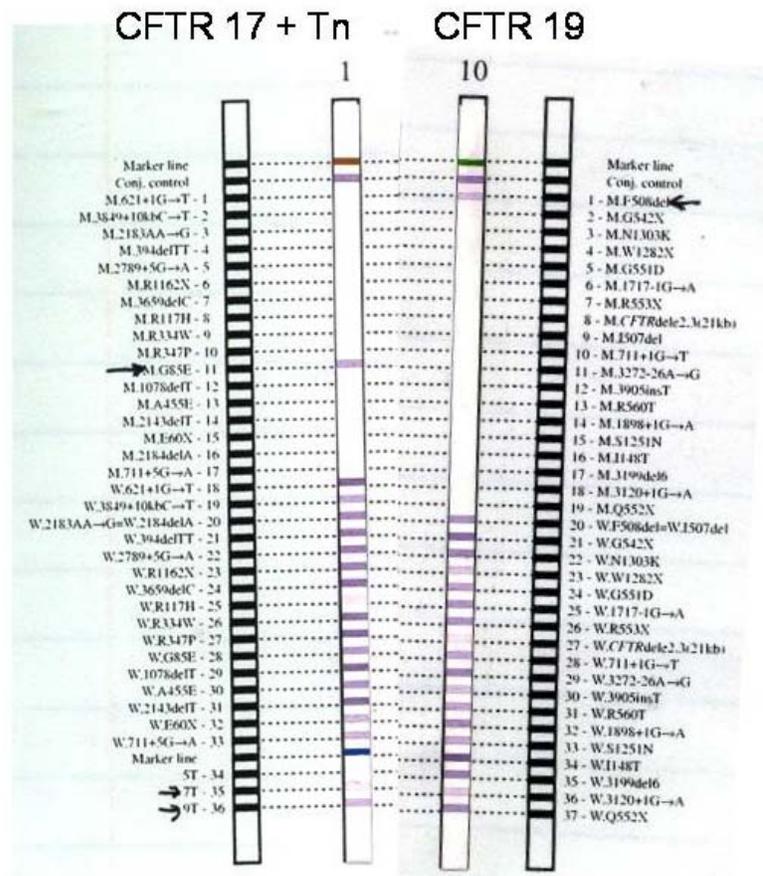


Figura 13. Análisis del DNA de un paciente con FQ mediante el estuche INNOLiPA CFTR36 (Innogenetics), el cual presentó un genotipo heterocigoto compuesto Δ F508/G85E. La mitad superior de cada tira detecta los alelos mutantes, mientras que la mitad inferior revela las versiones normales correspondientes.

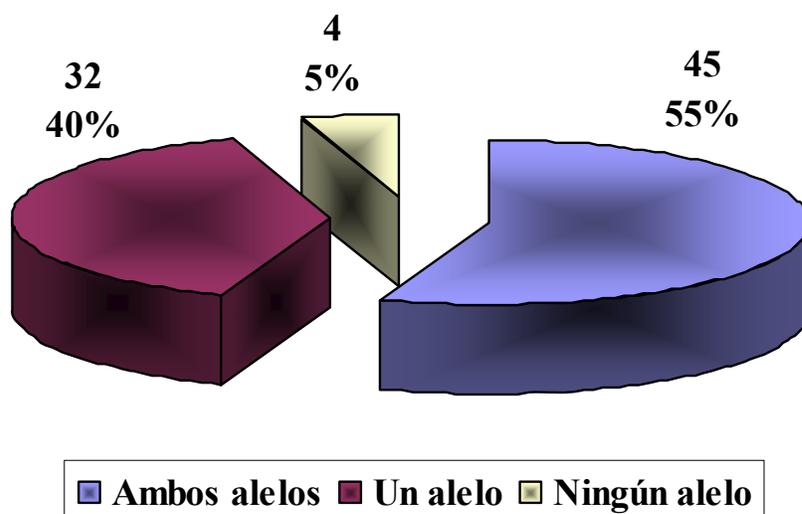


Figura 14. Detección de genotipos de los 81 pacientes incluidos el estudio de frecuencias de mutaciones en RCTFQ. Se muestra el número de pacientes en cada categoría y su porcentaje para la detección de ambos alelos, uno o ningún alelo mutante.

Tabla 17. Frecuencias de genotipos y alelos RCTFQ en 81 pacientes con FQ.

GENOTIPOS	No	%	ALELOS	No.	%
Δ F508/ Δ F508	29	35.8	Δ F508	96	60.0
Δ F508/X	26	32.1	G542X	8	5.0
Δ F508/G542x	5	6.17	S549N	5	3.1
Δ F508/3849+10kb	3	3.7	2789+5G→A	4	2.5
Δ F508/S549N	1	1.23	3849+10kb	3	1.9
Δ F508/L206W	1	1.23	G85E	1	0.6
Δ F508/2789+5G→A	1	1.23	R1162X	1	0.6
Δ F508/G85E	1	1.23	I148T	1	0.6
S549N/S549N	2	2.47	R334W	1	0.6
2789+5G→A/2789+5G→A	1	1.23	Δ I507	1	0.6
G542X/R1162X	1	1.23	L206W	1	0.6
G542X/X	2	2.47	X	40	25.0
2789+5G→A/X	1	1.23	N=	162	
Δ I507/X	1	1.23			
I148T*	1	1.23			
R334W*	1	1.23			
X/X	4	5			
Total	81	100			

5.4 Frecuencias genotípicas y alélicas de genes modificadores en pacientes y testigos

Se presentan a continuación los patrones de PCR-RFLPs (figuras 15 a la 18) y la interpretación para cada uno de los polimorfismos analizados, mediante los cuales se determinó el estado homocigoto normal, homocigoto mutante y heterocigoto (tabla 18). En la mayoría de los casos, las enzimas presentan un sitio de reconocimiento para las versiones normales de las variantes analizadas, excepto para el alelo C de MBL, el cual presenta un sitio de restricción para la versión mutante.

Tabla 18. Resumen de las estrategias experimentales e interpretación para el análisis de las variantes analizadas de los genes modificadores.

Gen	Alelos analizados	Enzima de restricción	PCR-RFLP normal	PCR-RFLP mutante	Referencia
MBL2	A, B, C y D	<i>Ban</i> I <i>Mbo</i> II <i>Mwo</i> I	A: 95+39 pb A: 134 pb A 109+25 pb	B: 134 pb C: 78+56 pb D: 134 pb	Tin <i>et al</i> , 2005
IL-8	-251 A/T	<i>Mfe</i> I	-251A: 520 + 296 pb	-251T: 816 pb	Lee <i>et al</i> , 2005
TNF α	-308G/A TNF1, TNF2	<i>Nco</i> I	TNF1: 126+16 pb	TNF2: 142 pb	Chen <i>et al</i> , 2006
AAT	M, S y Z	<i>Taq</i> I	M: 78 pb M: 123 pb	S: 98 pb Z: 144 pb	Sandford <i>et al</i> , 1999a

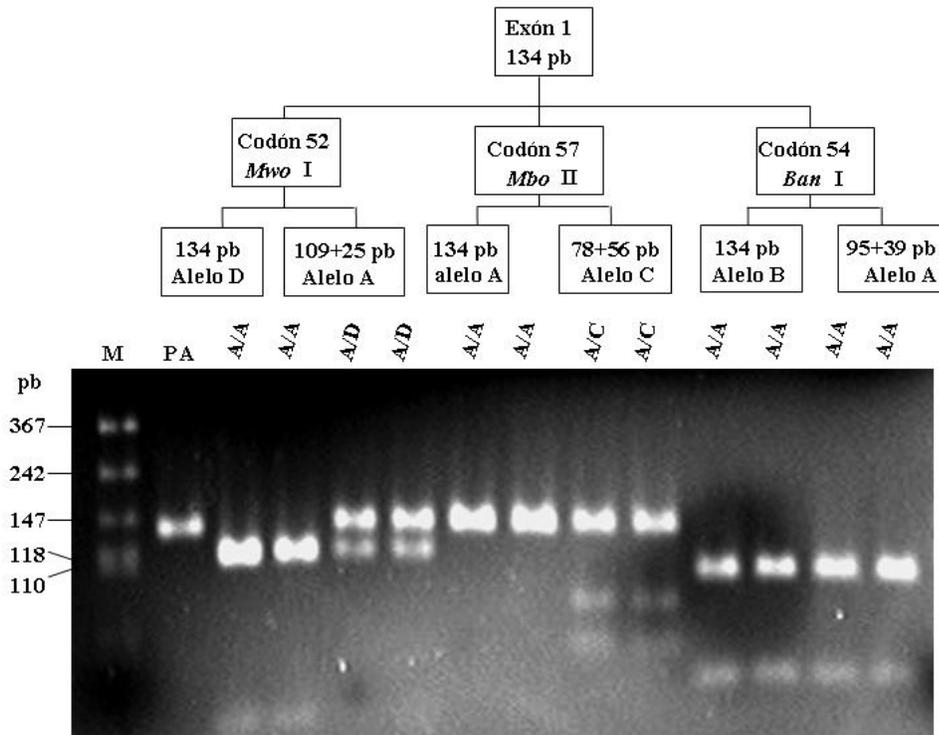


Figura 15. Diagrama del análisis de los polimorfismos del exón 1 del gen MBL2. Para los codones 52 y 54, los alelos mutantes (B y D) permanecieron sin cortar con las respectivas endonucleasas de restricción, mientras que los alelos normales (A) se digirieron. Para el codón 57, el alelo mutante C se digirió con la enzima mientras que el alelo silvestre (A) permaneció sin cortar. M: marcador de pares de bases, PA: producto amplificado.

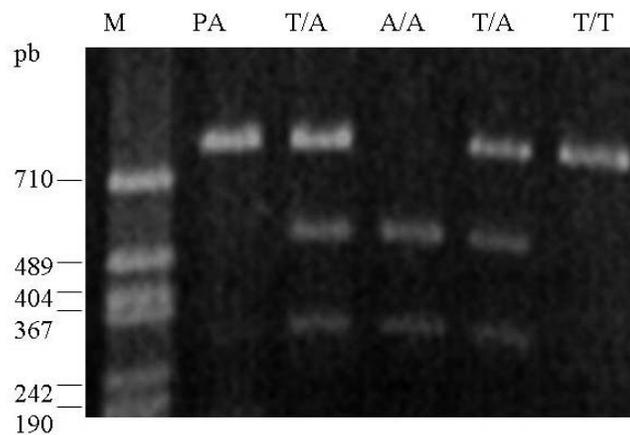


Figura 16. Análisis del polimorfismo -251A/T de IL-8. El alelo ancestral A generó dos fragmentos de 520 y 296 pb con la enzima de restricción *Mfe* I, mientras que la variante T permaneció sin cortar (N, 816 pb). M: marcador de pares de bases. PA: producto amplificado.

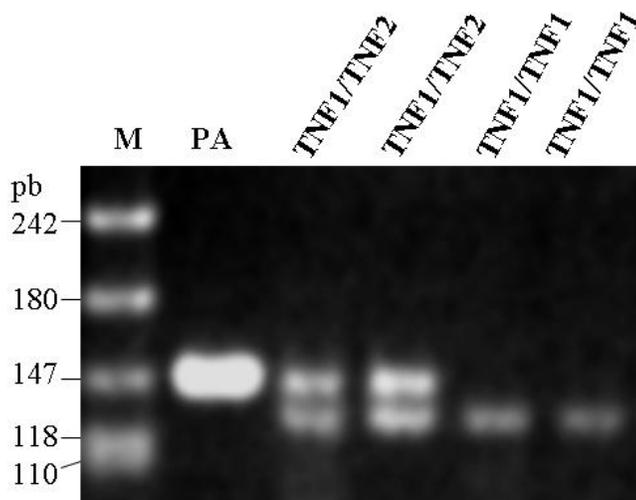


Figura 17. Análisis del polimorfismo -308G/A de TNF α . El alelo normal TNF1 generó un fragmento de 126 pb con la enzima de restricción *Nco* I, mientras que el alelo mutante TNF2 permaneció sin cortar (142 pb). M: marcador de pares de bases. A. producto amplificado.

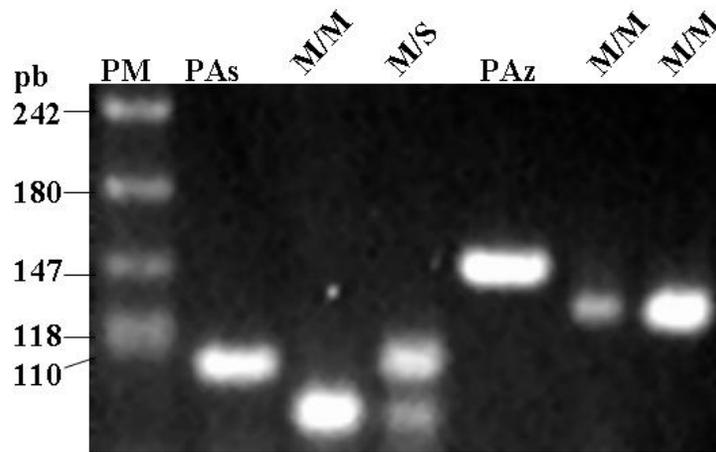


Figura 18. Análisis de las variantes S y Z de la AAT. Las versiones normales (M) generaron dos fragmentos de 78 y 123 pb con la enzima *Taq* I en ausencia de los alelos S y Z respectivamente, mientras que si las mutaciones estuvieron presentes permanecieron sin cortar (98 pb para el alelo S y 144 pb para el alelo Z). PM: marcador de pares de bases. PAs y PAz productos amplificados sin cortar.

Las frecuencias genotípicas y alélicas para pacientes y testigos se presentan en las tablas 19 y 20. Para los testigos, se determinó que las frecuencias se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población analizada, cuyos cálculos se incluyeron en el anexo 7.

Tabla 19. Frecuencias de los genotipos analizados en los genes modificadores en pacientes y testigos.

Polimorfismo	Pacientes			Testigos		
	Homocigoto normal	Heterocigoto	Homocigoto mutante	Homocigoto normal	Heterocigoto	Homocigoto mutante
MBL A/D	96.3	3.8	0	90.3	9.7	0
MBL A/B	63.8	33.8	2.5	73.8	22.3	3.9
MBL A/C	96.3	3.8	0.0	89.2	10.8	0.0
MBL A/O	57.5	38.8	3.8	61.2	31.1	7.7
IL-8 -251A/T	16.5	51.9	31.6	18.6	49.0	32.4
TNF1/TNF2	82.5	17.5	0.0	94.2	5.8	0.0
AAT M/S	97.5	2.5	0.0	97.1	2.9	0.0
AAT M/Z	100	0.0	0.0	100	0.0	0.0

Tabla 20. Frecuencias alélicas de pacientes y testigos para los genes modificadores analizados.

	A/D	A/B	A/C	A/O	IL-8 -251 A/T	TNF1/TNF2	M/S	M/Z
Pacientes	98.1/1.9	80.6/19.4	98.1/1.9	76.9/23.1	42.4/57.6	91.3/8.8	98.8/1.2	100/0
Testigos	95.1/4.9	85.0/15.0	94.6/5.4	76.7/23.3	43.1/56.9	97.1/2.9	98.6/1.4	100/0

La tabla 21 muestra que los alelos variantes AATS y AATZ son los menos variados en nuestra población, mientras que los genotipos variantes MBL O y el alelo B, así como IL-8 presentaron una alta frecuencia.

5.5 Prueba de asociación y razón de momios en genotipos de pacientes contra testigos

Para determinar si los genotipos de los genes modificadores analizados se comportaron como variables independientes (H_0) o dependientes (H_a) de la enfermedad (FQ), se realizaron pruebas de independencia basadas en X^2 y razón de momios (OR). Para TNF α , se encontró que TNF1/TNF2 se comportó como un genotipo de riesgo (OR: 3.43, p: <0.05,

X^2 : 6.3, p: <0.05) mientras que TNF1/TNF1 resultó un genotipo protector (OR: 0.29, p: <0.05, X^2 : 6.3, p: <0.05).

5.6 Niveles de proteínas en pacientes y testigos

5.6.1 Niveles de proteínas en suero/plasma de pacientes y testigos

El número de muestras de suero/plasma y esputo analizados estuvo determinado por los pacientes en seguimiento del CEPREP que accedieron a proporcionar nuevas muestras de sangre para colectar plasma y suero fresco (n=11) que fueron procesados junto con 16 muestras de suero/plasma de 16 testigos. Para las cuatro citocinas analizadas, el valor promedio en pacientes fue mayor que en testigos (tabla 21). Sin embargo, el análisis de ambos grupos para cada proteína analizada mediante la prueba estadística para datos no paramétricos de Mann Whitney, mostró diferencia significativa únicamente para la IL-8 (figura 19).

Tabla 21. Valores promedio y rango de niveles de proteínas en suero/plasma por ELISA en pacientes y testigos.

Citocina	Pacientes	Testigos
MBL (ng/mL)	2272.6 (0 a 4778)	1894 (0 a 5177)
IL-8 (pg/mL)	20.8 (8.7-43.2)	9.1 (5.6-11.0)
TNF α (pg/mL)	7.5 (5.05-10.04)	7.0 (5.4-9.0)
AAT (mg/L)	2447 (337-4863)	1424 (173-3158)

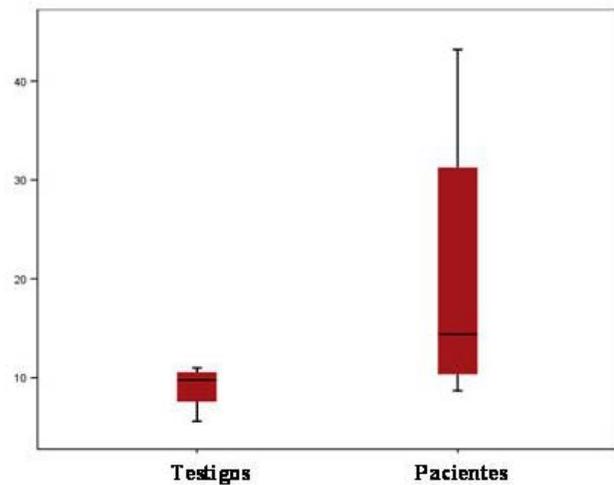
A

	Var 1	N	Rango promedio	Suma de rangos
IL-8	1.00	11	19.36	213
	2.00	16	10.31	165
	Total	27		

B

	Var 2
Mann-Whitney U	29.000
Wilcoxon W	165.000
Z	-2.920
Asymp. sign. (2 colas)	.003
Exact Sig. [2*(1-cola Sig.)]	.003

C



D

Estadística descriptiva

Grupo	N	Percentiles		
		25vo	50vo (mediana)	75vo
Testigos	16	7.50	9.60	10.40
Pacientes	11	9.80	14.40	31.8

Figura 19. Resultados de la prueba estadística (A, B y D) de Mann Whitney y gráfico descriptivo (medianas y percentiles, D) de los resultados de ELISA en suero para la IL-8 en pacientes y testigos.

5.6.2 Niveles de proteínas en esputo de pacientes con FQ

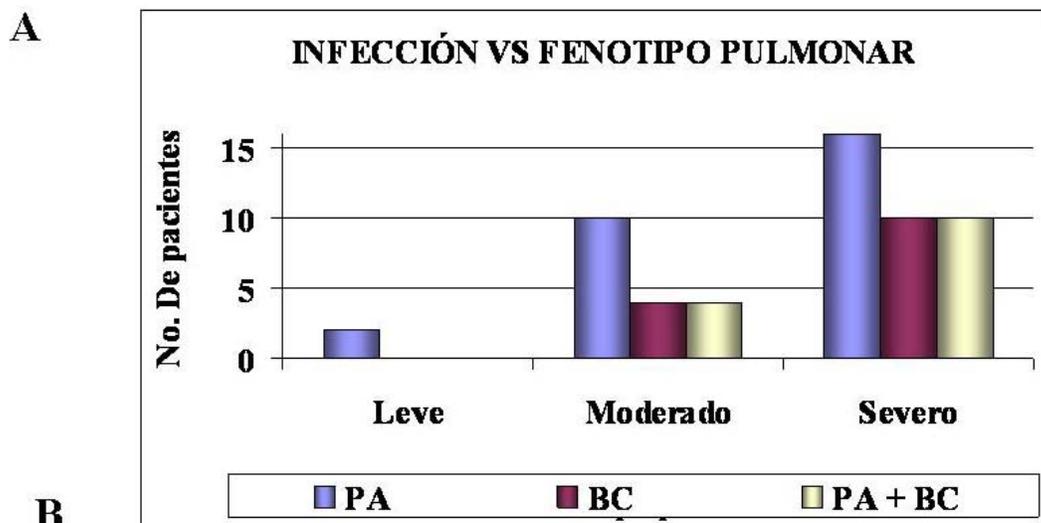
De los 11 pacientes que accedieron a proporcionar muestras de suero/plasma, 5 fueron productores de esputo. Se detectaron IL-8, TNF α y AAT pero no MBL en el esputo de los pacientes. Los niveles de IL-8, fueron 10,000 veces mayores en esputo que en suero/plasma (tabla 22). Los pacientes del 1 al 4 presentaron enfermedad pulmonar moderada. El paciente marcado como No. 5 presentó un fenotipo severo y niveles elevados de TNF α e IL-8 en esputo.

Tabla 22. Comparación de niveles de citocinas en suero/plasma y esputo de 5 pacientes.

	IL 8			AAT			TNF		
	suero/plasma	Esputo		suero/plasma	Esputo		suero/plasma	Esputo	
Paciente	pg/ml	ng/ml	Polimorfismo	mg/L	mg/L	Polimorfismo	pg/ml	pg/ml	Polimorfismo
1	16.0	117	T/T	3855	127.44	M/M	6.21	6.3	TNF1/TNF1
2	9.8	80.04	T/A	4275	4.71	M/M	6.73	3.88	TNF1/TNF1
3	14.4	49.71	T/A	3878	10.32	M/M	6.08	2.07	TNF1/TNF1
4	42.4	56.63	T/T	1771	0	M/M	9.6	3.75	TNF1/TNF1
5	43.2	317	T/A	337	9.12	M/M	7.25	105.0	TNF1/TNF1

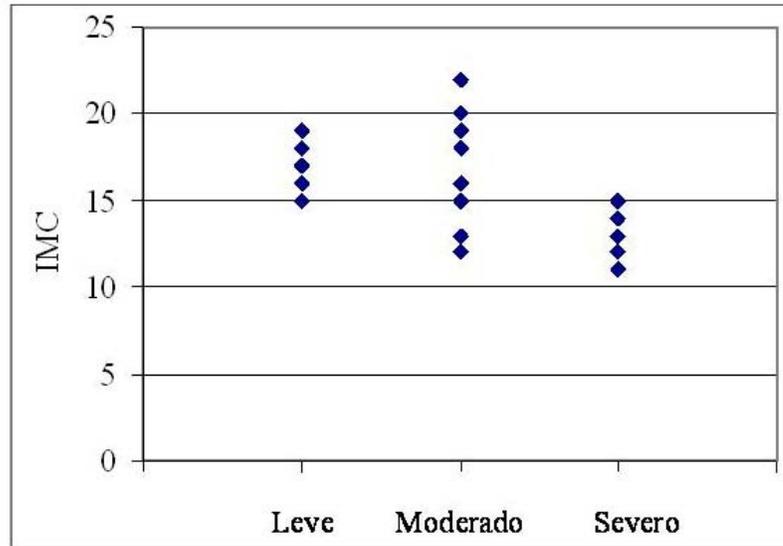
5.7 Correlación entre los polimorfismos de los genes modificadores, genotipo en RCTFQ, variables clínicas y fenotipo pulmonar

Tomando como base la clasificación de acuerdo al fenotipo pulmonar leve (n=10), moderado (n=14) y severo (n=16), la prueba de correlación no paramétrica de Rho de Spearman mostró una correlación moderada del fenotipo pulmonar con infección con *P. aeruginosa* e índice de masa corporal (IMC). Se muestran las distribuciones de ambos factores respecto al fenotipo pulmonar en las figuras 20 y 21.



		Fenotipo pulmonar	<i>P. aeruginosa</i>
Fenotipo pulmonar	Coefficiente de correlación	1.000	0.693
	Sig (2 colas)	-	<1X10 ⁻⁶
	N	40	40
<i>P. aeruginosa</i>	Coefficiente de correlación	0.693	1.000
	Sig (2 colas)	<1X10 ⁻⁶	-
	N	40	40

Figura 20. Gráfico de distribución de datos (A) y tabla de resultados (B) de la prueba r_s de fenotipo pulmonar contra infección (*P. aeruginosa* PA y *B. cepacia* BC), para un total de 40 pacientes.



		Fenotipo pulmonar	IMC
Fenotipo pulmonar	Coefficiente de correlación	1.000	0.683
	Sig. (2 colas)	-	$<2 \times 10^{-6}$
	N	40	40
IMC	Coefficiente de correlación	0.683	1.000
	Sig. (2 colas)	$<2 \times 10^{-6}$	-
	N	40	40

Figura 21. Gráfico de distribución de datos y tabla de resultados de la prueba r_s de fenotipo pulmonar contra IMC, para un total de 40 pacientes.

5.8 Niveles de proteínas contra genotipos de genes modificadores en pacientes y testigos

Para el genotipo normal de MBL (A/A, n=6 pacientes y 8 testigos) el valor promedio resultó mayor en pacientes que en testigos (4016 y 3274 ng/ml respectivamente, figura 22). Para estos promedios, la prueba de Mann-Whitney no demostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.5157$). Los portadores de dos alelos mutantes (O/O n=2 testigos y 2 pacientes) presentaron niveles nulos de MBL, mientras que en portadores de una mutación (A/O, n=6 testigos y 3 pacientes), los niveles se encontraron reducidos comparados a A/A, siendo menor el promedio en pacientes que en testigos. (302 y 687 ng/ml respectivamente, figura 22).

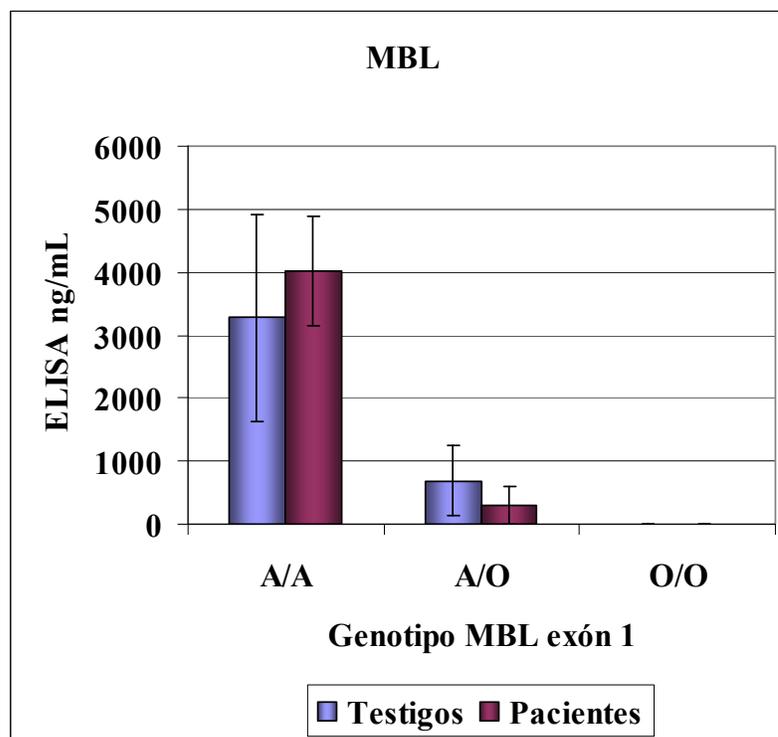


Figura 22. Niveles de MBL (ng/mL) en suero en testigos y pacientes y genotipo.

Se realizó una prueba de correlación de Spearman de genotipo contra niveles de MBL en testigos y pacientes que demostró que existió una elevada correlación entre el genotipo y los niveles de MBL. (tabla 23).

Tabla 23. Resultados de correlación entre genotipo y niveles de proteína para MBL en pacientes y testigos.

	Rho de Spearman	P
Testigos	0.831	0.0001
Pacientes	0.907	0.0001

Para IL-8 (A/A n=6 testigos y 1 paciente; T/A n=6 testigos y 5 pacientes; T/T n=5 testigos y 5 pacientes) se graficó los niveles de proteína y genotipo (figura 23). No se observaron tendencias en los niveles de proteína contra genotipo.

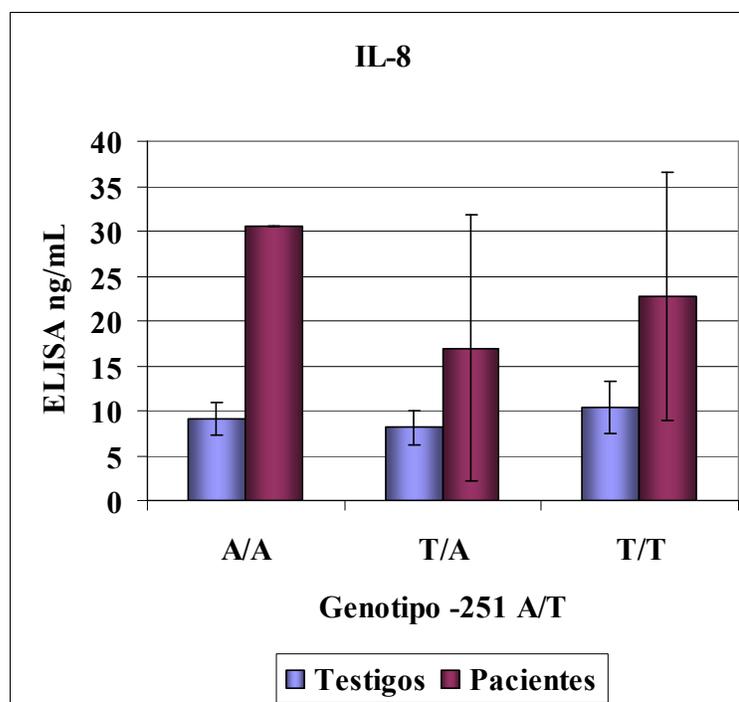


Figura 23. Niveles de IL-8 (pg/mL) en suero/plasma de testigos y pacientes y genotipo.

5.9 Niveles de proteínas en suero y plasma y fenotipo pulmonar en pacientes con FQ

El número de pacientes con resultados de ELISA para cada subgrupo de fenotipo pulmonar fueron leve n=4, moderado n=6 y severo n=1, por lo que no fue posible realizar pruebas estadísticas. Se graficó los niveles de citocinas en plasma/suero para cada grupo (figura 24), las cuales no muestran tendencias de acuerdo al fenotipo pulmonar.

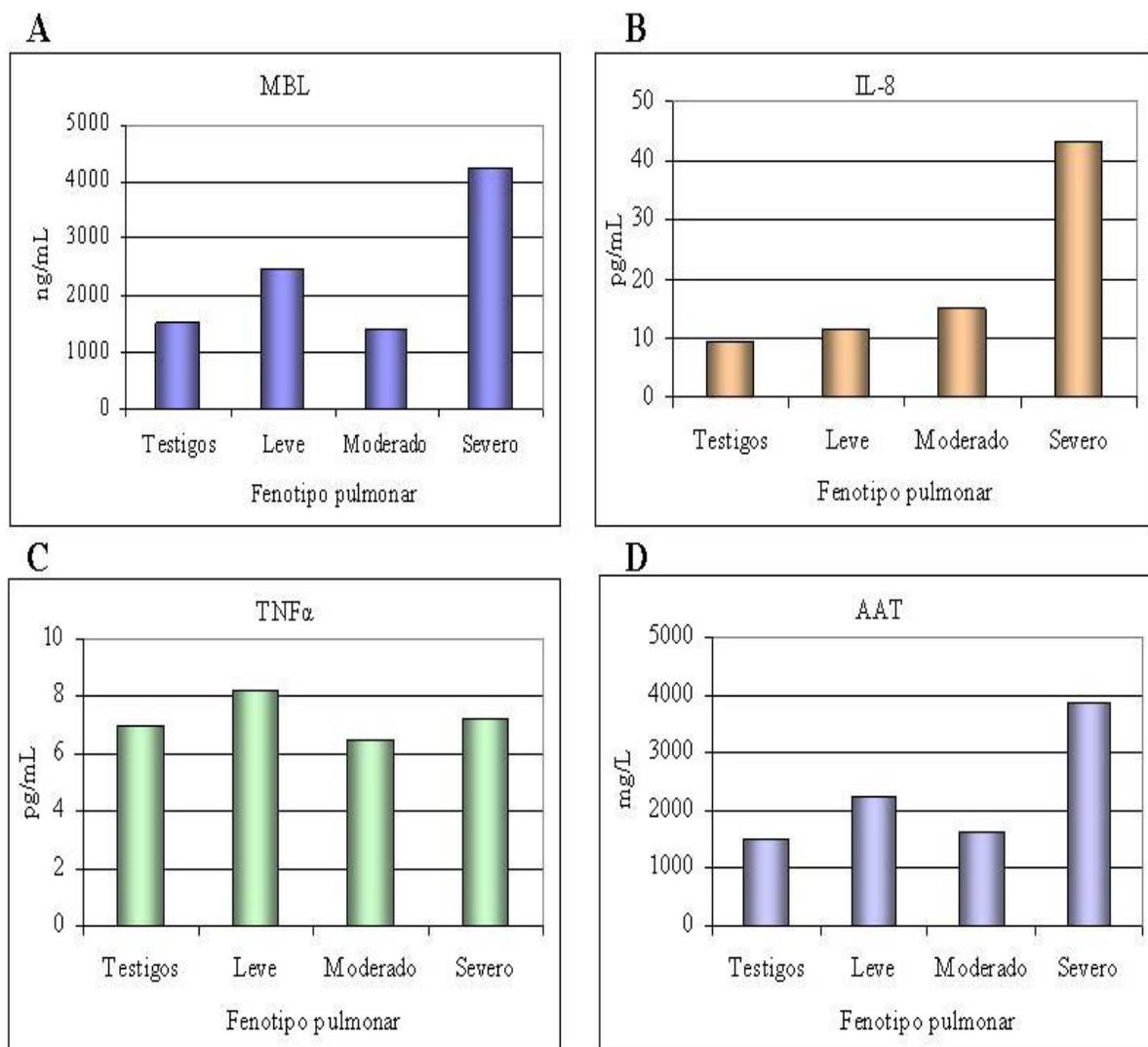


Figura 24. Gráfica de medianas de las concentraciones séricas de las proteínas (A: MBL, B: IL-8, C: TNF α , y D: AAT) contra fenotipo pulmonar de los 11 pacientes con FQ analizados, clasificados como leve (n=4), moderado (n=6) y severo (n=1). Como referencia, se muestra los valores de mediana para los testigos (n=16).

5.10 Análisis de supervivencia

Empleando los datos de fecha de diagnóstico, edad actual y edad de fallecimiento (en los casos pertinentes), se construyeron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. La enfermedad pulmonar severa presenta una influencia significativa ($p=0.00555$, figura 25A) en la sobrevida. La línea celeste muestra que cuando la enfermedad pulmonar severa se encuentra presente, la sobrevida es menor a los 12 años a partir del diagnóstico de FQ; mientras que no existe diferencia en presentar cuadro pulmonar leve o moderado. El estado socioeconómico parece tener mayor influencia en la sobrevida: ($p < 1 \times 10^{-5}$, figura 25B), pues la línea morada muestra una marcada influencia del estado socioeconómico bajo para una sobrevida menor a 12 años a partir del diagnóstico de FQ.

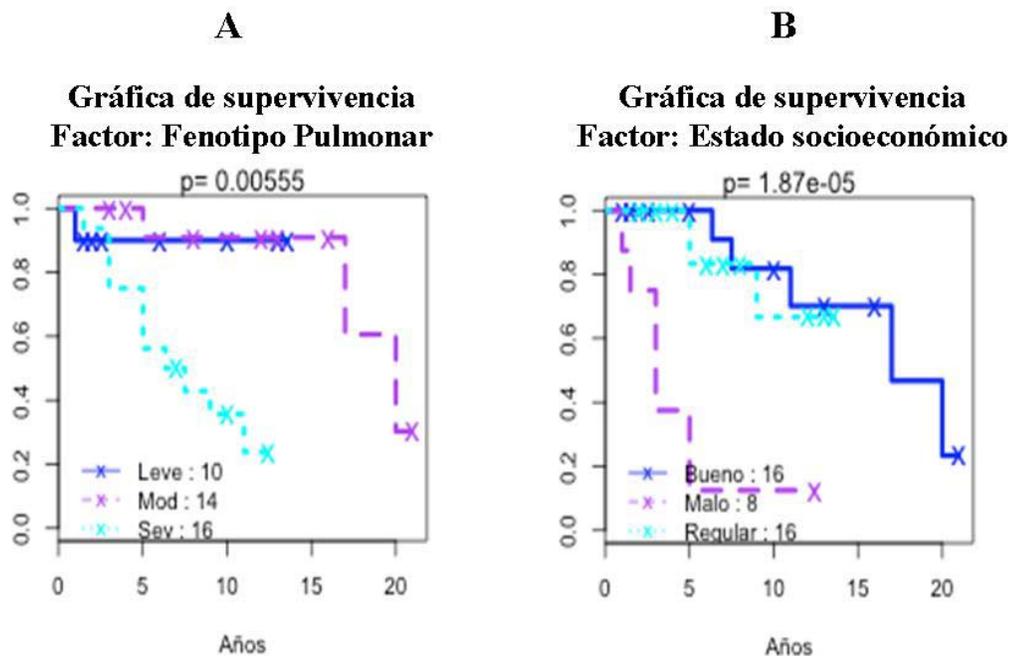


Figura 25. Gráficas de Kaplan Meier que muestran la influencia de la enfermedad pulmonar (A) y el estado socioeconómico (B) en la supervivencia de los pacientes. En la figura 25A, la línea celeste mostró el comportamiento del fenotipo pulmonar severo ($p=0.0055$). Para la figura 25B, la línea morada mostró una marcada influencia del estado socioeconómico bajo para una sobrevida menor a 12 años.

Para Insuficiencia pancreática, Infección recurrente con *P. aeruginosa* y *B. cepacia*, a pesar que se observó una tendencia no existió influencia estadísticamente significativa en la supervivencia. Para enfermedad hepática (EH) esta tendencia nose observó (figura 26).

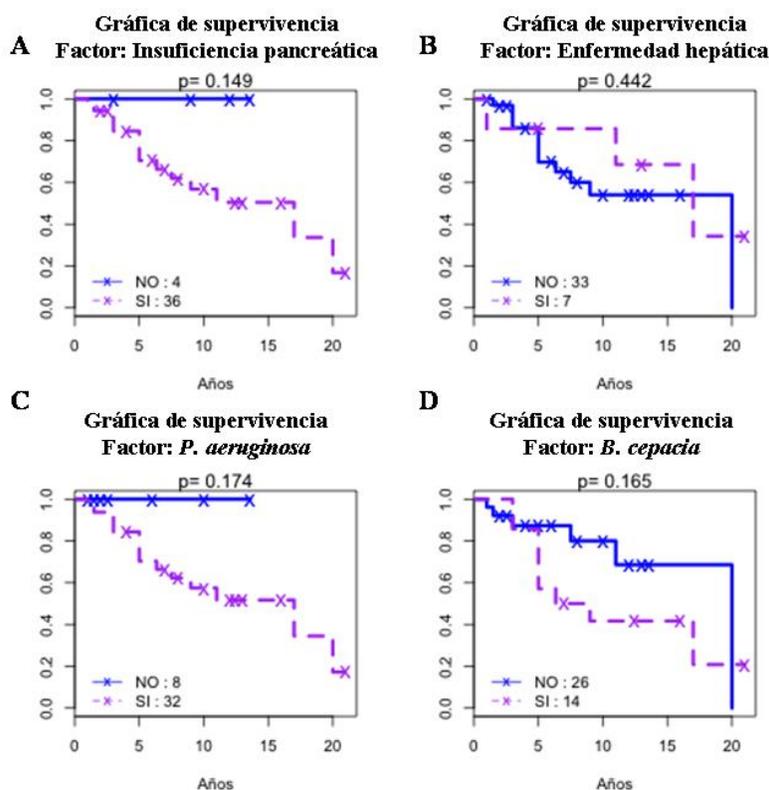


Figura 26. Gráficas de Kaplan-Meier para insuficiencia pancreática (A), enfermedad hepática (B), *P.aeruginosa* (C) y *B. cepacia* (D). No se observó influencia estadísticamente significativa.

Para los polimorfismos de los genes modificadores, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la sobrevida y los genotipos combinados de las diferentes variantes del exón 1 de la MBL (figura 27). Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, para el genotipo A/D (figura 27A, línea morada, n=3) se observa una tendencia a disminuir la sobrevida a menos de 5 años a partir del diagnóstico, pues dos

pacientes fallecieron y el tercero está aún dentro del período de 5 años del diagnóstico. En los otros genotipos sólo se tuvo un paciente.

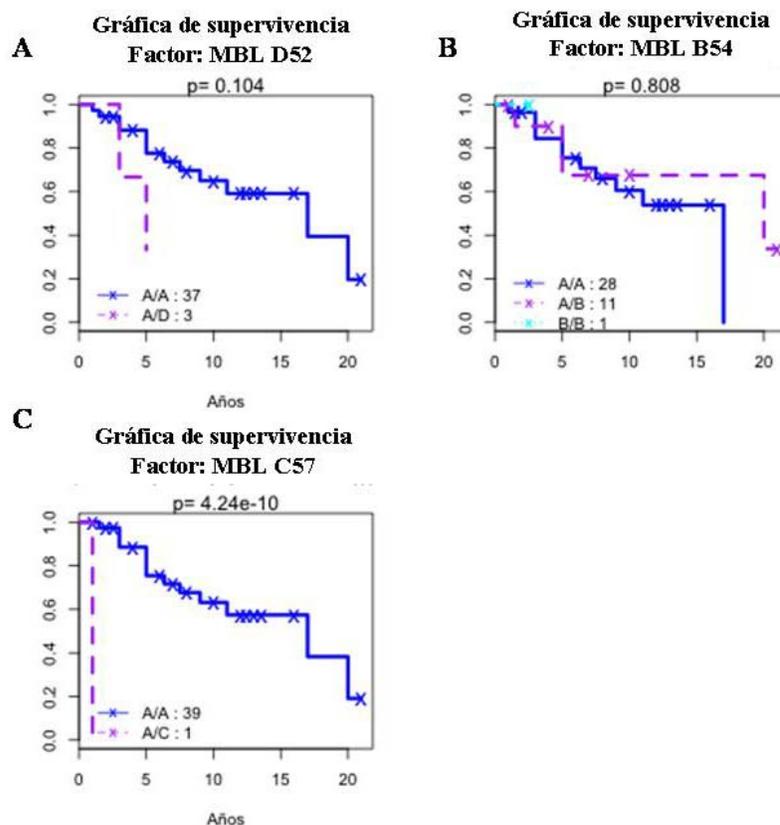


Figura 27. Gráficas de Kaplan-Meier para las variantes de MBL2. Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, para el genotipo A/D (27A, n=3) se observó una tendencia a disminuir la supervivencia a menos de 5 años a partir del diagnóstico.

6. DISCUSIÓN

Este proyecto fue propuesto con la finalidad de contestar la interrogante: ¿Qué factores genéticos y clínicos ejercen influencia en el fenotipo pulmonar de la FQ?. El encontrar factores genéticos de riesgo permitiría tres cosas:

- a) Comprender el proceso fisiopatológico de la FQ y los mecanismos que están involucrados en el progreso de la enfermedad.
- b) Determinar un perfil de riesgo. Aquel paciente con diagnóstico de FQ que además presente las variantes de riesgo, sería candidato a seguimiento cuidadoso y tratamiento profiláctico temprano, a fin de retardar o evitar las manifestaciones más severas de la enfermedad.
- c) Diseño de terapias. Para las variantes que producen un exceso de proteína que agrava el cuadro inflamatorio, se pueden administrar antagonistas, como para TNF α (Volpini, 2003). En el caso de las variantes que producen cantidades de proteína reducidas, como MBL, se puede administrar la proteína de manera recombinante (Garred *et al*, 2002; Kilpatrick, 2003; Summerfield, 2003).

La FQ es la enfermedad hereditaria más común en caucásicos. En Europa y EUA, existen redes de grupos de estudio, en los cuales se intercambia información acerca de su fisiopatología, incluyendo las teorías del funcionamiento del receptor mutante, el reporte de nuevas mutaciones, la evaluación de los paneles diagnósticos actuales, los mecanismos de enfermedad de infecciones oportunistas como *P. aeruginosa*, estudios en modelos animales, y por supuesto se proponen nuevos genes modificadores candidato para su estudio. Las conferencias anuales norteamericana (<http://www.nacfconference.org/>) y europea (www.europeancfconference.org) de FQ son una prueba de su importancia en la

Salud Pública. Sin embargo, no se debe considerar a la FQ una enfermedad únicamente de caucásicos. Los mexicanos somos producto del mestizaje (Cerde-Flores *et al*, 2002), y debemos considerar a la FQ como un problema de salud.

Con la idea clara de que tenemos un amplio espectro de posibilidades, la búsqueda de otros factores que contribuyan al cuadro clínico de la FQ no es fácil. Las revisiones bibliográficas nos muestran la gran cantidad de estudios al respecto. Algunos que seleccionamos hasta la fecha siguen siendo considerados como importantes, como son MBL, TNF α y AAT. Curiosamente IL-8 no había sido evaluada hasta un artículo publicado recientemente (Hillian *et al*, 2008).

Algunos genes y sus análisis se descartan por no ser reproducibles en otras poblaciones, sin considerar que la diversidad genética puede influir en los estudios de asociación además del diseño y las condiciones del estudio. Se demostró que separar los grupos de estudio en niños y adultos proporciona conclusiones muy diferentes que el grupo en total (Buranawuti *et al*, 2007).

En nuestro país existen muy pocos reportes científicos de FQ en mexicanos: 20 artículos de 1989 al 2008, y no existen reportes de genes modificadores en la población mexicana ni hispana. Los genes modificadores seleccionados y sus respectivas mutaciones presentan reportes en otras poblaciones y permitirían comparar con nuestros resultados.

La metodología de PCR-RFLP una vez estandarizada es reproducible, y tiene la ventaja de que permite trabajar desde una hasta varias docenas de muestras, evitando gastos innecesarios de materiales y reactivos. No descartamos en un futuro trasladarla a técnicas más modernas como tiempo real y microarreglos de SNPs. Éstos podrían proporcionar más información, pero los costos son elevados para ofrecerse como servicio a pacientes que en

su mayoría no poseen los recursos, pero por otro lado, proporcionaría valiosa información si se realizara como un nuevo proyecto de investigación.

6.1 Establecimiento de un banco de datos de pacientes con FQ y de DNA de pacientes y testigos

De acuerdo a la página de la asociación Mexicana de Fibrosis Quística A.C. (AMFQ), Alrededor de 400 niños nacen cada año en México con FQ, sin embargo, con los recursos e infraestructura actuales, solamente el 15% de ellos son diagnosticados con vida. El resto fallece antes de cumplir los 4 años de edad por complicaciones respiratorias y desnutrición. Se cree que existen actualmente en México alrededor de 6,000 niños con FQ los cuales no tienen acceso a un tratamiento especializado (www.fibrosisquistica.org.mx). En la localidad del noreste de México, la Asociación Regiomontana de Fibrosis Quística A.C. (ARFQ), que canaliza pacientes al CEPREP y fundada en 1999, a la fecha tiene registrados 190 pacientes (<http://fibrosisqmonterrey.org/>). Sin embargo, existen pacientes que no han sido canalizados a la institución o que no han recibido el diagnóstico de FQ. El CEPREP es la unidad regional especializada para FQ, pero no todos los pacientes con FQ asisten a él. Aquellos que cuentan con IMSS son atendidos en dicha institución.

Procedencia de los pacientes. Tomando en cuenta los criterios de inclusión y de exclusión y una vez descartados aquellos pacientes que fallecieron poco después de nacer y los que después de su diagnóstico no regresaron a tratamiento y seguimiento, se recolectaron los datos clínicos de 40 pacientes con FQ. Es un número adecuado de pacientes considerando que el registro de la ARFQ es de 190 pacientes en casi 10 años, y de ellos alrededor de 100

realizaron su seguimiento en el CEPREP (datos proporcionados por la Dra. Bustamante). El 95% de ellos nació en el Noreste de México. Dos proceden de otras regiones como Oaxaca y Querétaro, que se vinieron a vivir a Nuevo León.

Edades de diagnóstico y fallecimiento. El rango de edades de diagnóstico fue bastante amplio (0-34 años, promedio 5.1 y mediana de 3). Catorce (35%) de los pacientes fueron diagnosticados a una edad igual o inferior al año. Para la edad de fallecimiento se observó de igual manera un amplio rango de distribución (2-38 años, promedio 11.8, mediana y moda de 8). Existen picos en diagnóstico a los 1 y 5 años, así como de fallecimiento a los 8 años. Se asume que la expectativa de vida en países como el nuestro es baja. Un estudio multicéntrico en 30,469 pacientes del período 1982-1998, mostró entre otros resultados, que el simple hecho de ser hispano está asociado con un alto riesgo de muerte (O'Connor *et al*, 2002). En 1989 la sobrevida fue de 27 años para EUA y de 32 años para Canadá, mientras que de 1982 a 1988 la media de supervivencia fue de 6 años en el Registro Latino Americano. Lamentablemente debido al inadecuado registro y seguimiento de los pacientes no se tiene la expectativa de vida como en otros países (Torres-Vela, 2002). Según la AMFQ, con los recursos e infraestructura actuales los pacientes alcanzan en promedio una sobrevida de 12 años (www.fibrosisquistica.org.mx). Sin embargo, en este estudio los expedientes clínicos muestran pacientes diagnosticados en una infancia temprana que en estos momentos ya alcanzaron la adultez en condiciones estables. También se diagnosticaron pacientes tardíamente en etapas muy avanzadas de la enfermedad. Por ejemplo, una paciente que fue diagnosticada a los 34 años con un genotipo homocigoto

ΔF508. Ella permaneció desde su diagnóstico con tratamiento y seguimiento cuidadoso y fue candidato a trasplante de pulmón. Falleció durante la etapa de escritura de esta tesis.

Grado de enfermedad pulmonar. Nuestro grupo de pacientes tuvo representación en los tres grupos de clasificación de fenotipo pulmonar leve, moderado y severo. Este parámetro fue muy importante de establecer ya que los grados de correlación entre variables y fenotipo pulmonar se establecieron una vez definida esta clasificación.

P. aeruginosa y B. cepacia. En este trabajo la infección por *B. cepacia* se presentó una vez que la infección con *P. aeruginosa* se estableció. Está descrito que una vez establecida la infección con *P. aeruginosa*, su erradicación se hace imposible y la enfermedad pulmonar se agrava con el tiempo, por lo que al complicarse con *B. cepacia* el pronóstico empeora y en muchos casos desencadena la muerte del paciente. Se ha comprobado que los organismos identificados como *B. cepacia* forman un grupo muy heterogéneo y constituyen un complejo de 11 especies fenotípicamente similares (LiPuma, 2001).

Insuficiencia pancreática. En este estudio se encontró IP en el 90% de los pacientes, como se ha reportado en las estadísticas de otros países (Cutting, 2005). Virtualmente todos los pacientes con FQ manifiestan anormalidades en la función pancreática exócrina. Aproximadamente el 85 al 90% de los pacientes requieren suplementación con enzimas pancreáticas (Welsh *et al*, 2001).

Enfermedad hepática. En este estudio, encontramos 7 pacientes con enfermedad hepática (17.5%), con un rango de edades de 1 a 13 años, donde 3 de ellos fallecieron. Un estudio en 241 pacientes canadienses mostró una prevalencia del 18, 29, y 41% después de 2, 5 y 12 años de seguimiento, respectivamente. Además no se relacionó al tipo de mutaciones en el RCTFQ (Lamireau, 2004).

Cor pulmonale. La mitad de los pacientes de este trabajo presentó Cor pulmonale, lo que indica un avanzado estado de afectación de la capacidad pulmonar y cardíaca. Aunque el Cor pulmonale está descrito dentro del cuadro pulmonar severo de FQ, prácticamente no hay estudios en esta área pues no se encontraron referencias bibliográficas. Se define Cor pulmonale como el estado de hipertrofia del ventrículo derecho originado por diferentes enfermedades que alteran la función o estructura de los pulmones (Martínez, 2003). El Cor pulmonale como complicación de FQ fue divulgado desde 1951. Se ha reportado de un 15% a un 46% de pacientes con FQ de edad igual o mayor de 15 años, con falla en el ventrículo derecho, por lo menos dos semanas antes de su muerte (Gotz *et al*, 1989).

Banco de DNA de pacientes y testigos. Como se ha comentado antes, el porcentaje de pacientes detectados por clínica y positivos por diagnóstico molecular es bajo sin contar que muchos de ellos han fallecido, por lo cual el banco de DNA de pacientes es muy valioso. En la medida que sea posible, los DNA serán empleados en nuevos estudios encaminados a entender la FQ, con la debida aprobación de los pacientes que así lo deseen y previo dictamen del comité de ética de la institución donde se lleve al cabo dicho trabajo. El banco de DNA de los 104 testigos también podrá ser empleado en estudios de otros

genes modificadores y para nuevos proyectos, al igual que las muestras de suero, plasma y esputo en estudios de proteómica, previo aviso a las personas que donaron su muestra. Con la ayuda de la clínica de FQ del Children's Hospital en Denver, Colorado EUA, que proporcionó el protocolo de procesamiento y almacenamiento a -80°C de muestras de esputo, se implementó el banco de esputo procesado en la UDM a partir de esta tesis.

6.2 Determinación del perfil de frecuencias de mutaciones en RCTFQ

Las frecuencias alélicas obtenidas y las reportadas en otros estudios en mexicanos, poblaciones hispanas y caucásicas, se presentan en la tabla 24. Aunque se conocen más de 1500 mutaciones, el número de mutaciones causantes de enfermedad podría ser mas bajo. Algunas mutaciones como la I148T, a pesar que están incluidas en los paneles de diagnóstico, no se consideran como un alelo causal, sino que forman parte de alelos complejos, es decir, se co-segregan junto con alelos como 3199del6 o 3395insA y, son estos últimos aparentemente los causantes de enfermedad (Claustres *et al*, 2004).

Tabla 24. Comparación de frecuencias alélicas de RCTFQ contra otros estudios realizados en mexicanos, hispanos y caucásicos.

	Este trabajo 2009 N (%)	Mexicanos Villalobos <i>et al</i> , 1997 N (%)	Mexicanos Orozco <i>et al</i> , 2000 %	Mexicanos Yokoyama- Rebollar <i>et al</i> , 2007 %	Hispanos Garcbe <i>et al</i> , 1994 N(%)	Hispanos Sugaman <i>et al</i> , 2004 N(%)	Hispanos Shrivjer <i>et al</i> , 2005 %	Población general Consortio de FQ %	Estados de América McKone <i>et al</i> , 2003 %	España Federación española de FQ %
AF508	96 (60)	36 (45)	54.48	59.3	59 (46)	118 (37.11)	28.96	66	69.4	53
G542X	8 (5.0)	0.4 (5)	8.28	10.8	7(5.4)	11 (3.46)	3.83	2.4	2.3	8.4
SS49N	5 (3.1)	0.1 (1.25)	3.45	2.1		2 (0.63)	<1	0.1	0.1	
2789+5G→A	4 (2.5)							0.1	0.3	
3849+10 b C→ T	3 (1.9)	2 (2.5)	<1	1.8	3 (2.3)	3 (0.94)		0.2	0.7	
G85E	1 (0.6)					2 (0.63)		0.2	0.3	
R1162X	1 (0.6)				2 (1.6)			0.3	0.3	1.6
I148T	1 (0.6)		2.07	1.2		2 (0.63)				
R334W	1 (0.6)				2 (1.6)	11 (3.46)	1.09	0.1	0.2	1.6
A1507	1 (0.6)		3.45				<1	0.2	1.6	
L206W	1 (0.6)						1.64			
G551D					0 (0)	1 (0.31)		2.4		
R553X			<1		1 (8)	1 (0.31)	1.09	1.3		
W1282X					1 (8)			2.1		
N1303K		0.1 (1.25)	2.76			4 (1.39)		1.3		
621 + 1 G→T		1 (1.25)				1 (0.31)		0.7		
406-1G→A			2.07				3.28			
Otras		35 (43.7)			0 (0)			65		
Total de alelos analizados	162	80	194	640	129	318	514	42849*	35706	

Hasta el momento existen ocho reportes de 1992 al 2008 sobre mutaciones en RCTFQ en población mexicana. Los más recientes están centrados en mutaciones específicas (Flores-Martinez *et al*, 2008; Laguna *et al*, 2008) y dos son importantes como referencia para el análisis de mutaciones (Orozco *et al*, 2000; Villalobos-Torres *et al*, 1997). Existe un reporte más reciente presentado en el XXXII Congreso Nacional de Genética Humana (Yokoyama-Rebollar *et al*, 2007). Los tipos de estuches comerciales empleados, que varían entre 16, 24, 33 y 36 mutaciones, la tecnología empleada en el diagnóstico, además de los criterios establecidos para incluir los pacientes pueden haber influido en las estadísticas previamente reportadas para hispanos, mexicanos y otras poblaciones (tabla 24).

En este trabajo de tesis, la frecuencia del alelo $\Delta F508$ fue del 60%. Esto es mayor que la reportada anteriormente (45%) por el mismo grupo de trabajo en población Mexicana (Villalobos-Torres *et al*, 1997). Ellos analizaron 40 pacientes mexicanos provenientes de Monterrey, Guadalajara y Puebla con un estuche comercial de hibridación con sondas ASO de 16 mutaciones (Roche) mientras que el nuestro es de 36.

Nuestra frecuencia del alelo $\Delta F508$ es similar a los dos reportes del Centro de México (Orozco *et al*, 2000; Yokoyama-Rebollar *et al*, 2007; 54.5 y 59% respectivamente). Orozco *et al* 2000 analizaron 97 familias sin especificar origen geográfico, 12 mutaciones mediante diversas técnicas como mutagénesis sitio-dirigida por PCR, y PCR-RFLPs, y los alelos no identificados por polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), heteroduplex, y secuenciación. Yokoyama-Rebollar *et al*, 2007 actualizaron el trabajo de Orozco e incluyeron nuevos pacientes de Sonora y Puebla, además de que emplearon el estuche de 36 mutaciones de este trabajo.

Con respecto a las demás poblaciones, la frecuencia $\Delta F508$ es similar a la reportada para españoles, caucásicos y la estadística mundial (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, McKone *et al*, 2003; Aliño-Pellicer *et al*, 2003).

En hispanos, los reportes de la frecuencia del alelo $\Delta F508$ van del 29 al 46% (Grebe *et al*, 1994; Sugarman *et al*, 2004; Schrijver *et al*, 2005). Grebe *et al*, 1994 analizaron 23 mutaciones en pacientes hispanos del sur de California y del suroeste de EUA. Emplearon técnicas individuales para cada mutación reportados por diversos autores. Sugarman *et al*, 2004 analizaron hispanos residentes de EUA sin especificar los criterios de clasificación, provenientes principalmente de California, Nueva York y Texas. Utilizaron un panel de 187 mutaciones mediante hibridación con sondas ASO. Shrivjer *et al*, 2005 analizaron pacientes auto identificados como hispanos, donde 49 de 257 estudiados tuvieron mezcla racial (extracción española o portuguesa, americano-mexicano, centroamericano, meridional, y del Caribe). Utilizaron la prueba Ambry para FQ mediante el análisis electroforético del gradiente temporal de temperatura (TTGE) seguido de secuenciación.

En Caucásicos, el consorcio reporta las estadísticas globales respecto a un panel de las 24 mutaciones más frecuentes a nivel mundial. McKone *et al*, 2003 analizaron con un panel de 24 mutaciones a 17,853 pacientes provenientes del Registro Nacional de la Fundación de FQ de EUA, por el período comprendido entre 1991-1999. Aliño-Pellicer *et al*, 2003 reportaron las estadísticas de la población española pero no el método empleado.

En este trabajo observamos que en 83% de los pacientes con FQ presentaron la mutación $\Delta F508$ en uno o ambos alelos. Esta alta frecuencia sugiere hacer primero el análisis de la mutación $\Delta F508$ mediante otras técnicas más sencillas económicas como PCR y electroforesis, en pacientes con cuadro clínico sugestivo de FQ y prueba de electrolitos en

sudor con resultados positivos o dudosos. En caso de resultar negativo, considerar el estudio de las 36 mutaciones mediante el estuche comercial.

En este estudio se diagnosticaron además 10 mutaciones diferentes a $\Delta F508$, lo cual corresponde al 16% de los cromosomas analizados. Las frecuencias de los alelos G542X, R1162X y R334W reflejan la influencia española sobre nuestra población. Para las mutaciones S549N y 2789+5G→A la federación española de FQ no tiene reporte de frecuencias. Para S549N nuestro resultado es del 3.1%, más alta que la reportada anteriormente (1.25%) por el mismo grupo de trabajo en población Mexicana (Villalobos-Torres *et al*, 1997) y el reporte reciente del centro de México (Yokoyama-Rebollar *et al*, 2007; 2.1%). En otros grupos de hispanos y en caucásicos, así como en la estadística mundial, la frecuencia reportada es menor al 1%, al igual que para 2789+5G→A. Esto parece indicar que dentro de la población hispana, estas dos mutaciones son más frecuentes en mexicanos que en otras comunidades. Dado que no está descrita la población de origen de la mutación, es difícil explicar su prevalencia. En particular, en el caso homocigoto S549N se sabe que existe consanguinidad.

Un 25% de los alelos permaneció sin identificar. Debido a esto, es importante realizar pruebas menos costosas en nuestro país y de ser posible, el tamizaje del gen completo.

Es indispensable detectar las mutaciones desconocidas propias de nuestro grupo étnico, como las que se han reportado previamente (Orozco *et al*, 2000). Los análisis descritos para este trabajo ayudarán a coadyuvar la carencia de pruebas moleculares que puedan de una forma rápida y barata, hacer una correlación entre la frecuencia de las mutaciones y la población blanco que está presentándose a la consulta.

Además de lo anterior, se piensa que pacientes con FQ son diagnosticados erróneamente. Síntomas como tos, dificultad para respirar y disnea en niños y adultos, pueden ser ocasionadas por FQ, asma, alergia, infección por *Bordetella pertussis*, disquinesia ciliar primaria, anormalidades de vías aéreas, bronquitis, etc. (Weinberger y Abu-Hasan, 2007; Slaughter, 2007). Esto representa no solo un mal diagnóstico, sino además un perjuicio al paciente, dado que los signos y síntomas se agravan con el tiempo por la falta de un tratamiento adecuado. Finalmente, el paciente enfermo con FQ no tendrá una calidad de vida adecuada.

6.3 Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de genes modificadores en pacientes y testigos

Una revisión de los últimos meses sobre genes modificadores, nos muestra que su estudio está siendo aplicado a áreas como enfermedad de Huntington (Weydt *et al*, 2009), cáncer colorrectal no poliposo (Scott y Lubinski, 2009), cáncer de mama (Ripperger *et al*, 2008), hipertensión pulmonar arterial (Fujiwara *et al*, 2008), carcinoma hepatocelular (Feo *et al*, 2008), desorden depresivo mayor (Ruhe *et al*, 2009), Alzheimer (Bertram *et al*, 2008), diabetes autoinmune (Parry y Brooks, 2008), esclerosis múltiple (Caillier *et al*, 2008), aterosclerosis (Seidelmann *et al*, 2008), asma (Smith *et al*, 2008) y riñón poliquístico (Stefanakis *et al*, 2008), entre otros. Sin embargo, FQ sigue siendo la enfermedad genética donde se han abordado un mayor número de genes candidato, por su variabilidad fenotípica, debido a que se observa constantemente en los últimos años el estudio de genes modificadores. Esto es debido a la incapacidad de explicar dicha variabilidad principalmente en el fenotipo pulmonar con el gran número de mutaciones detectadas.

En este trabajo, de acuerdo a una extensa revisión bibliográfica, se seleccionaron cuatro citocinas para el análisis de genes modificadores. Para tratar de correlacionar los polimorfismos de los genes modificadores con la enfermedad, debemos de empezar a analizar las diferentes tablas de frecuencias, lo cual nos llevará a concluir si dichos polimorfismos son relevantes o no como factores de riesgo asociados a FQ en la muestra de los pacientes del noreste de México.

Las tablas de frecuencias alélicas y genotípicas en las bases de datos de SNPs para población normal de distintos grupos étnicos se incluyeron en el Anexo 8 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Podemos observar que en la mayoría de los casos, nuestras frecuencias son similares a las reportadas en otras poblaciones, por lo que se deduce que no ha existido un desequilibrio en la segregación de dichos alelos que favoreciera el aumento del polimorfismo variante.

6.3.1 Comparación de frecuencias de MBL2 con otros reportes en testigos y pacientes con FQ.

No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de cada uno de los genotipos de MBL analizados entre pacientes y testigos. Las frecuencias para ambos grupos son similares a otros reportes en pacientes con FQ y testigos de acuerdo a la tabla 25, excepto para la frecuencia del genotipo A/B, la cual se encontró marcadamente elevada en pacientes mexicanos respecto a las otras poblaciones (33.8 contra 18.3 en promedio). Esto parece indicar un desequilibrio en la transmisión del alelo mutante. La frecuencia del genotipo A/A en testigos es similar a Dinamarca, y mayor que la reportada en EUA, Bélgica y Suecia, mientras que en pacientes la frecuencia de nuestro trabajo es menor en

todos los casos. La frecuencia del genotipo A/O en testigos es menor a los reportes presentados en la tabla 25 y en pacientes es ligeramente mayor excepto en Bélgica. Finalmente, la frecuencia del genotipo O/O en todos los reportes es baja (menor o igual al 9%).

Tabla 25. Comparación de frecuencias de genotipos para MBL2 en pacientes con FQ y testigos de diferentes poblaciones.

Grupo	A/A	A/B	A/C	A/D	A/O	B/B	B/C	B/D	C/D	D/D	O/O	Autor y población
P (n=81)	57.5	33.8	3.8	2.5	38.8	2.5	-	1.3	0.0	0	3.8	Este trabajo
T (n=104)	61.2	22.3	4.9	10.8	31.4	3.9	2.0	2.0	1.0	0	7.7	
P (n=149)	64.4	17.8	2.1	13.0	32.9	1.4	0.7	-	-	0.7	2.7	Garred <i>et al</i> , 1999b Dinamarca
T (n=250)	62.8	19.2	5.2	10.0	34.4	1.2	-	1.2	-	0.4	2.8	
P (n=112)	63.9				39.7						2.5	Yarden <i>et al</i> , 2004 Bélgica
T (n=187)	58.8				34.6						6.6	
P (n=112)	58	18.8	0.9	17	36.7	1.8	0.9	0.9	0.9	0.9	5.4	Carlsson <i>et al</i> , 2005 Suecia
T (n=200)	58	21	1	13	35	3.0	0	1	1	2	7	
P _n (n=101)	62.4				28.7						8.9	Buranawuti <i>et al</i> , 2007 USA
P _a (n=115)	66.9				31.3						1.7	
P _{af} (n=38)	55.3				31.6						13	
T (n=127)	55				36						9	

P: pacientes, T: testigos, P_n: pacientes niños, P_a: pacientes adultos, P_{af}: pacientes adultos fallecidos

6.3.2 Comparación de frecuencias de IL-8 con otros reportes en testigos y pacientes con FQ.

En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias del polimorfismo -251A/T de pacientes y testigos. Es sorprendente que a pesar de que IL-8 es una proteína con influencia significativa en el cuadro inflamatorio pulmonar, sólo existe un reporte de IL-8 en FQ (Hillian *et al*, 2008). La tabla 26 muestra además resultados de reportes relacionados a otras enfermedades, incluyendo un estudio en población mexicana, indicando el número de muestras analizadas y el tipo de población estudiada. Nuestras frecuencias en testigos son similares a las reportadas por Garza-González, 2007 en el estudio de cáncer gástrico en mexicanos, y a los valores reportados

para enfermedad pulmonar moderada en pacientes con FQ (Hillian *et al*, 2008). En muchos de los casos se reporta una mayor proporción del alelo variante T respecto al alelo ancestral A (tabla 26).

Tabla 26. Comparación de frecuencias de genotipos para IL-8 -251 A/T en pacientes con FQ y otras enfermedades, así como testigos de diferentes poblaciones.

Grupos	A/A	A/T	T/T	Autor y población
P (n=81)	16.5	51.9	31.6	Este trabajo
T (n=104)	18.6	49.0	32.4	
P _m (n=732)	29.7	48.2	27.1	Hillian <i>et al</i> , 2008
P _s (n=380)	19.6	47.9	32.5	FQ, USA
<i>P (n=122)</i>	<i>33.0</i>	<i>45.0</i>	<i>22.0</i>	<i>Arinir et al, 2005</i>
<i>T (n=385)</i>	<i>30.0</i>	<i>50.0</i>	<i>21.0</i>	<i>EPOC, Alemania</i>
<i>P_g (n=207)</i>	<i>20.3</i>	<i>46.9</i>	<i>32.9</i>	<i>Garza-Gonzalez et al, 2007</i>
<i>P_{cg} (n=78)</i>	<i>20.5</i>	<i>60.3</i>	<i>19.2</i>	<i>Cáncer gástrico</i>
<i>T (n=189)</i>	<i>17.5</i>	<i>46.0</i>	<i>36.5</i>	<i>México</i>
<i>P_a (n=313)</i>	<i>20.4</i>	<i>47.3</i>	<i>32.3</i>	<i>Puthothu et al, 2006</i>
<i>P_{RSV} (n=133)</i>	<i>19.5</i>	<i>54.9</i>	<i>25.6</i>	<i>Asma y RSV</i>
<i>T (n=268)</i>	<i>26.1</i>	<i>46.3</i>	<i>27.6</i>	<i>Alemania</i>

P. pacientes, T: testigos, P_m: pacientes con FQ con cuadro pulmonar moderado, P_s: pacientes con FQ con cuadro pulmonar severo, P_g: pacientes con gastritis, P_{cg}: pacientes con cáncer gástrico, P_a: pacientes con asma, P_{RSV}: pacientes con virus sincitial respiratorio. Itálicas: estudios no realizados en FQ.

6.3.3 Comparación de frecuencias de TNF α con otros reportes en testigos y pacientes con FQ.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias del polimorfismo -308G/A de pacientes y testigos (X^2 : 6.3, p :<0.05). Se muestran reportes para TNF α -308G/A relacionados a FQ, así como a otras enfermedades (tabla 27), incluyendo un estudio en población mexicana, indicando el número de muestras analizadas y el tipo de población estudiada. Los reportes se enfocaron en la comparación de subgrupos de pacientes por lo que no incluyeron frecuencias en testigos. No encontramos el genotipo TNF2/TNF2 en pacientes ni testigos, y en los reportes en pacientes mostrados la frecuencia

reportada fue baja (0-5.3%). La frecuencia de TNF1/TNF2 fue menor en nuestros pacientes comparados con los reportes de pacientes con FQ de otros países. El reporte más reciente en población mexicana (Vargas-Alarcon *et al*, 2006) presentó una frecuencia del genotipo TNF1/TNF2 ligeramente mayor en testigos que las de nuestro trabajo (8.6 contra 5.8% respectivamente).

Tabla 27. Comparación de frecuencias de genotipos para TNF α -308G/A en pacientes con FQ y testigos de diferentes poblaciones.

Grupos	TNF1/TNF1	TNF1/TNF2	TNF2/TNF2	Autor y población
P (n=81)	82.5	17.5	0.0	Este trabajo
T (n=104)	94.2	5.8	0.0	
P _{>70%FEV1} (n=57)	75.4	24.6	0	Hull y Thomson, 19988 Reino Unido
P _{<70%FEV1} (n=54)	85.5	12.7	1.8	
P _n (n=101)	66.3	31.7	2	Buranawuti <i>et al</i> , 2007 USA
P _a (n=115)	73	23.5	3.5	
P _{af} (n=38)	71	23.7	5.3	
P _e (n=84)	73.8	22.6	3.6	<i>Sakao et al, 2002, Japón</i>
P _{Spa} (n=229)	86	12.7	1.3	<i>Vargas-Alarcon et al, 2006</i> <i>Espondiloartritis, México</i>
T (n=162)	91.4	8.6	0.0	

P: pacientes, T: testigos, P_{>70%FEV1}: pacientes con FQ con FEV1>70%, P_{<70%FEV1}: pacientes con FQ con FEV1<70%, P_n: pacientes niños, P_a: pacientes adultos, P_{af}: pacientes adultos fallecidos, P_e: pacientes con EPOC, P_{Spa}: pacientes con espondiloartritis. Itálicas: estudios no realizados en FQ.

6.3.4 Comparación de frecuencias de AAT S/Z con otros reportes en testigos y pacientes con FQ.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias las variantes S y Z de pacientes y testigos. Los resultados de las frecuencias para AAT de este trabajo, así como reportes bibliográficos relacionados a FQ y a otras enfermedades, indicando el número de muestras analizadas y el tipo de población estudiada se muestran a continuación (tabla 28). Dichos reportes presentaron pacientes o subgrupos y no incluyeron frecuencias en testigos. En este trabajo no encontramos los genotipos M/Z, S/S, S/Z ni Z/Z en pacientes ni testigos. La frecuencia de este trabajo M/S (2.5%) es menor que los reportes mostrados

en otros grupos de pacientes (5.1-10%). Ésta baja prevalencia indica que es poco probable que AATS y AATZ sean candidatos para genes modificadores en estudios de correlación en futuros estudios.

Tabla 28. Comparación de frecuencias de genotipos para AATS Y AATZ en pacientes con FQ y testigos de diferentes poblaciones.

Grupos	Resultados	Autor y población
P (n=81) T (n=104)	M/M: 97.5% M/S: 2.5% M/M: 97.1% M/S: 2.9%	Este trabajo
P (n=79, 7 fallecidos en la infancia y 72 transplantados)	MS: 5.1% (3 transplantados, 1 fallecido) M/Z: 2.5% (1 transplantado, 1 fallecido)	Mahadeva <i>et al</i> , 1998a Inglaterra
P (n=716)	M/M: 86% MS/SS/MZ: 14%	Frangolias <i>et al</i> , 2003 Canadá
<i>F_e</i> (n=193)	<i>M/M: 91% MS/SS: 9%</i>	<i>Sandford et al, 1999b</i>
<i>F_{SO}</i> (n=73)	<i>M/M: 94% MZ: 6%</i> <i>M/M: 90% MS/SS: 10%</i> <i>M/M: 100% MZ: 0%</i>	<i>EPOC, Canadá</i>

P: pacientes, T: testigos, *F_e*: fumadores con EPOC, *F_{SO}*: fumadores sin obstrucción. Itálicas: estudios no realizados en FQ.

6.4 Comparación de los niveles de proteínas en suero/plasma y esputo de pacientes y testigos.

En la prueba de ELISA para MBL, la presencia de mutaciones en el gen dió como consecuencia la unión débil a la manosa debido a MBL pobremente oligomerizada, la cual supone que se eliminó mediante los lavados y no se detectó valor alguno en las muestras analizadas. Adicionalmente, los valores encontrados por el fabricante en 108 muestras de población abierta danesa, van de 5 a 4798 ng/mL, con una media y mediana de 1056 y 833 ng/mL.

Para IL-8, el fabricante reporta la medición de 34 muestras, las cuales presentaron valores inferiores a 31.2 pg/mL. En el caso de TNF α , el fabricante reportó la medición de 40 muestras, las cuales presentaron valores inferiores a 15.6 pg/mL. Finalmente, para AAT el

fabricante reportó como valor normal en suero de 900-1800 mg/L. En los testigos, los niveles se encontraron dentro de lo reportado por los fabricantes, excepto para AAT, en que los valores fueron mayores.

Con todo lo anterior, en la tabla 29 se presenta una comparación de nuestros resultados y los reportados en la literatura. La mayoría de los estudios, mostraron el análisis de IL-8 y TNF α en esputo, y su correlación a infección con *P. aeruginosa* o *B. cepacia*. Nosotros sólo encontramos diferencias significativas para IL-8 pero no para TNF α en suero/plasma de pacientes y testigos. Respecto a los niveles en esputo, la literatura mostró algunas diferencias las cuales pudieron deberse al método de recolección y procesamiento de muestras, como se discutirá enseguida, así como los métodos de análisis. Algunos trabajos, incluyendo éste, realizaron un procesamiento bajo tiempos y temperaturas estrictos de procesamiento, para la licuefacción con ditiotreitól (DTT) a 37°C, con la finalidad de reducir la extrema viscosidad de las secreciones y permitir una consistencia adecuada para su manipulación. Además se añadieron inhibidores de proteasas para evitar la degradación, y se almacenaron en alícuotas a -80°C. Otros trabajos únicamente diluyeron con salina 1:5 y almacenan sin inhibidores de proteasas (Kelly *et al*, 2002). Sobre el análisis de mediadores de fase fluida, los niveles en plasma y esputo de IL-8 y TNF α tendieron a ser más elevados en la paciente con cuadro pulmonar severo.

Tabla 29. Comparación de niveles de citocinas en plasma y esputo en pacientes con FQ con otros reportes publicados.

Citocina	Plasma	Esputo	Referencia
IL-8	20.8 pg/mL (8.7-43.2)	124 ng/mL (50-317)	Este estudio
IL-8	---	183 ng/mL (42-490)	Ordonez <i>et al</i> , 2001
IL-8	---	20 ng/mL (1.4-60)	McGarvey <i>et al</i> , 2002
IL-8	---	641 pg/mL (305-1350) Infecc. PA 253 pg/mL (158-406) No infecc PA	Nixon <i>et al</i> , 2002
IL-8	---	13.65 ng/mL (5.5-56.5) PA transmisible	Jones <i>et al</i> , 2003
IL-8	---	30 ng/mL \pm 4	Xiao <i>et al</i> , 2005
IL-8	---	42.4 ng/mL \pm 18.9 Infecc BC 45.9 ng/mL \pm 36.4 No infecc BC	Downey <i>et al</i> , 2007
TNF α	7.5 pg/mL (5.05-10.04)	25 pg/mL (2-105)	Este estudio
TNF α	---	28 pg/mL (17-59)	Ordonez <i>et al</i> , 2001
TNF α	---	11 pg/mL (0-169.3)	Jones <i>et al</i> , 2003
TNF α	---	74 pg/mL \pm 31	Xiao <i>et al</i> , 2005
MBL	2272.6 ng/mL (0 a 4778)	N.D.	Este estudio
MBL	1442 ng/mL (379-2734)	---	Carlsson <i>et al</i> , 2005
AAT	2,447 mg/L (337-4,863)	30 mg/L (0-127)	Este estudio
AAT	\leq 2,400 mg/L	---	Frangolias <i>et al</i> , 2003

PA: *Pseudomonas aeruginosa*, BC: *Burkholderia cepacia*, N.D. niveles no detectables

Debido a que la mayoría de los pacientes analizados presentaron alelos normales para todos los genes modificadores analizados (ver tablas 19 y 20) no se pudo realizar pruebas de correlación de niveles de proteína y genotipo.

6.5 Correlación entre los polimorfismos de genes modificadores, genotipo en RCTFQ, variables clínicas y fenotipo pulmonar

Dentro de las variables clínicas, nosotros encontramos correlación moderada con infección por *P. aeruginosa* e IMC (r_s moderada en el rango 0.5-0.7, elevada mayor a 0.7 y menos de 0.5 no se considera que existe correlación). Los reportes indican que la colonización-infección por *P. aeruginosa* se relaciona claramente con mayores índices de morbilidad y mortalidad en el paciente con FQ. Se ha evidenciado un deterioro progresivo de la función pulmonar y una disminución de la supervivencia; además se ha comprobado que su

adquisición en edades tempranas influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad (Gibson *et al*, 2003). Los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* durante los primeros 5 años de vida tienen un riesgo mayor de mortalidad (2.6 veces) que el de los pacientes con FQ no colonizados por este microorganismo. También se observan unos valores significativamente más bajos de FEV₁, menor percentil de peso y aumento del número de hospitalizaciones (Oliver *et al*, 2009).

No se estableció una correlación entre los polimorfismos de los genes modificadores analizados y el fenotipo pulmonar. Sin embargo, de acuerdo a las frecuencias de la variante TNF1/TNF2, se presentó un riesgo relativo (OR= 3.43) en pacientes con FQ. Estudios como el de Hillian, 2008 reportan una correlación entre el alelo T de IL-8 -251 y varones, con el cuadro pulmonar severo, y un efecto dominante o semi-dominante del alelo A y el fenotipo moderado (n=737). Sin embargo, se desconoce el efecto de las variantes sobre el promotor de IL-8. Dicho reporte presenta un ensayo de expresión empleando luciferasa como gen reportero, mediante transfección transitoria en células 9HTEo⁻. La inducción mediante una mezcla de citocinas, mostró aumentos en ambas variantes A/T, siendo los valores de la variante T de 2 a 3 veces mayores que la variante A. Un trabajo anterior, (Hacking *et al*, 2004) mostró datos similares para el mismo experimento, sin embargo cuando los niveles de transcritos endógenos se comparan en células epiteliales primarias, la estimulación con TNF α produce niveles marginales más elevados del haplotipo que presenta el alelo A.

Por otro lado, el tamaño de muestra, la etnicidad de la población y el número de pacientes portadores de los genotipos variantes como en el caso de AAT, cuya frecuencia es muy baja

(0 y 2.5% para MZ y MS), influye en la incapacidad de demostrar la correlación entre genes modificadores y fenotipos.

Se demostró una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de pacientes contra testigos para IL-8. No se observó una correlación entre el genotipo y los niveles séricos de proteína. Los niveles de IL-8 en esputo son 10,000 veces mayores que en suero, siendo mayores en la paciente con fenotipo severo (tabla 22). No se detectó MBL en esputo de pacientes, concordando con la ausencia de reportes de este tipo.

Las frecuencias de genotipo para MBL2 e IL-8 permitieron realizar un análisis de correlación con los niveles de proteína detectada por ELISA, existiendo una alta correlación sólo para MBL.

Para niveles de proteínas por ELISA no se observaron datos relevantes en relación a AAT y TNF α . El paciente No. 5 con fenotipo severo presentó los niveles más altos de TNF α e IL-8 en esputo.

El número de muestras analizadas por ELISA no permitió realizar pruebas estadísticas entre niveles de proteínas y fenotipo pulmonar por lo que sólo se presentaron los resultados de manera gráfica. Los autores generalmente sólo compararon los niveles promedio de pacientes y controles, sin agrupar por severidad pulmonar (tabla 29).

6.6 Gráficas de supervivencia

En nuestra población resultó evidente en primer lugar el estado socioeconómico, y en segundo lugar la enfermedad pulmonar. Aunque *P. aeruginosa* y *B. cepacia* parecen estar presentes sobre todo en etapas severas, no alcanzó significancia estadística. Otros reportes han mostrado la influencia de los genotipos mutantes en MBL en FQ (Garred *et al*, 1999b Buranawuti *et al*, 2007) por lo que en nuestro caso, la posible influencia del genotipo A/D y en general de los genotipos mutantes de MBL debe ser evaluada en un mayor número de pacientes.

7. CONCLUSIONES

- Se determinó la frecuencia del alelo $\Delta F508$, la cual fue del 60%. Además se detectaron 10 mutaciones más que constituyeron un 16%. Estas incluyeron G542X, S549N, 2789+5G→A, 3849+10kb, G85E, R1162X, I148T, R334W, $\Delta I507$ y L206W. Con estos resultados se alcanzó un índice de detección de alelos del 70%.
- Se encontró que las frecuencias de los polimorfismos de los genes modificadores analizados en la población del noreste de México están en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Se observó una baja frecuencia del alelo AATS (1.2 y 1.4% para pacientes y testigos respectivamente), y la ausencia del alelo AATZ, lo cual no permitió un análisis de correlación con la presencia de enfermedad.
- Se presentó una alta frecuencia de los genotipos variantes de MBL2 e IL-8 (alelo O: 23.1 y 23.3%; alelo -251T: 57.6 y 56.9%, para pacientes y testigos respectivamente), sin embargo no se demostró dependencia con la enfermedad.
- Se demostró la dependencia entre el genotipo TNF1/TNF2 y enfermedad y se comportó como factor de riesgo, mientras que el genotipo TNF1/TNF1 se comportó como factor de protección.
- Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IL-8 en suero de pacientes contra testigos y una elevada correlación entre el genotipo y los niveles de MBL en suero (0.907 y 0.831 en pacientes y testigos).
- No se demostró una correlación entre los polimorfismos de los genes modificadores analizados y la enfermedad pulmonar leve, moderada o severa.

- Se estableció una correlación moderada entre el fenotipo pulmonar e infección con *P. aeruginosa* e índice de masa corporal (0.693 y 0.683).
- Se presentó una influencia estadísticamente significativa de la enfermedad pulmonar severa en la sobrevida ($p=0.00555$). Sin embargo, el estado socioeconómico pareció ejercer mayor influencia ($p < 1 \times 10^{-5}$).
- Se concluyó de los resultados de este trabajo, que el análisis inicial de la mutación $\Delta F508$ en pacientes con sospecha de FQ sigue siendo la mejor opción, debido a que el 83% de los pacientes presentaron la mutación en uno o ambos alelos. Para severidad pulmonar es conveniente realizar un programa de control a pacientes con infección por *P. aeruginosa* y bajo IMC; y para la sobrevivencia se debe considerar la presencia de enfermedad pulmonar severa, estado socioeconómico bajo, y posiblemente la mutación D del gen MBL2.

8. PERSPECTIVAS

Deseamos enfatizar la dificultad para el diagnóstico y seguimiento de pacientes, lo cual tiene como consecuencia un reducido número de pacientes con diagnóstico molecular y la falta de expedientes completos. A pesar de contar con una unidad especializada para atender a estos pacientes, existe el inconveniente de los costos del diagnóstico, tratamiento y seguimiento. De los resultados de este trabajo, se puede considerar de aplicación inmediata el análisis inicial de la mutación $\Delta F508$ en pacientes con sospecha de FQ. En pacientes confirmados con FQ, considerar como factores de influencia en la severidad pulmonar la infección por *P. aeruginosa* y bajo IMC, y para la sobrevivencia de los pacientes, considerar a aquellos con enfermedad pulmonar severa y estado socioeconómico bajo, así como pacientes portadores de la mutación D de MBL2. Además se debe considerar el genotipo TNF1/TNF2, y poner especial atención en los picos de edad de fallecimiento.

Para continuar con este trabajo, nosotros recomendamos lo siguiente:

- Difundir en el área médica las características y manejo de pacientes con FQ.
- Continuar recolectando muestras para analizarlas en una futura etapa.
- Para los genes modificadores, realizar estudios de expresión que permitan comprender la relación enfermedad, genotipo, niveles de RNA y de proteína.
- Diseñar un estuche adecuado al perfil de mutaciones en nuestra población.
- Realizar colaboraciones con otros grupos del país y de otros países.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akabas, M.H., 2000. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275, 3729-32.
2. Aldallal, N., McNaughton, E.E., Manzel, L.J., Richards, A.M., Zabner, J., Ferkol, T.W. and Look, D.C., 2002. Inflammatory response in airway epithelial cells isolated from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1248-56.
3. Aliño-Pellicer, S.F., Antelo-Landeira, M.C., Baamonde-Vidarte, A., Beltrán-Bengoechea, B., Berná-Torres, N., Calvo-Medina, V., Casals-Senent, T., Castillo-Arenal, T., Cobos-Barroso, N., Costa-Seglar, V., Dapena-Fernández, J., De la Iglesia-Cánovas, P., Escobar-Castro, H., Escribano-Montaner, A., Esteban-Romaní, L., Ferrer-Calvete, J., Ferrer-González, P., Galán-Santamaría, P., Gartner-Tizzano, S., González-Nieto, P., Lama-More, R., López-Puchol, S., Lozano-Ruiz, C., Máiz-Carro, L., Morales-Marín, P., Morant-Guillém, P., Nadal-Ortega, J.M., Peñarranda-Monteagudo, C., Pérez-Aguilar, F., Pérez-Frías, J., Pulido, J.M.R., Ramos-Jimeno, A., Roncero-Oncela, M., Salcedo-Posadas, A., Sánchez-Solís de Querol, M., Solé-Jover, A., Suárez-Cortina, L. and Vázquez-Cordero, C., 2003. Federación Española contra la Fibrosis Quística. Libro Blanco de atención a la fibrosis quística, Madrid, España.
4. Arinir, U., Klein, W., Rohde, G., Stemmler, S., Epplen, J.T. and Schultze-Werninghaus, G., 2005. Polymorphisms in the interleukin-8 gene in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Electrophoresis* 26, 2888-91.
5. Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M.F., Schjeide, B.M., Hooli, B., Divito, J., Ionita, I., Jiang, H., Laird, N., Moscarillo, T., Ohlsen, K.L., Elliott, K., Wang, X., Hu-Lince, D., Ryder, M., Murphy, A., Wagner, S.L., Blacker, D., Becker, K.D. and Tanzi, R.E., 2008. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet* 83, 623-32.
6. Boucher, R.C., 2003. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 445, 495-8.
7. Bradbury, N.A., 1999. Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev* 79, S175-91.
8. Brookes, A.J., Lehvaslaiho, H., Siegfried, M., Boehm, J.G., Yuan, Y.P., Sarkar, C.M., Bork, P. and Ortigao, F., 2000. HGBASE: a database of SNPs and other variations in and around human genes. *Nucleic Acids Res* 28, 356-60.
9. Buranawuti, K., Boyle, M.P., Cheng, S., Steiner, L.L., McDougal, K., Fallin, M.D., Merlo, C., Zeitlin, P.L., Rosenstein, B.J., Mogayzel, P.J., Jr., Wang, X. and Cutting, G.R., 2007. Variants in mannose-binding lectin and tumour necrosis factor alpha affect survival in cystic fibrosis. *J Med Genet* 44, 209-14.
10. Caillier, S.J., Briggs, F., Cree, B.A., Baranzini, S.E., Fernandez-Vina, M., Ramsay, P.P., Khan, O., Royal, W., 3rd, Hauser, S.L., Barcellos, L.F. and Oksenberg, J.R., 2008. Uncoupling the roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 genes in multiple sclerosis. *J Immunol* 181, 5473-80.
11. Cantin, A., 1995. Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 939-41.

12. Carlsson, M., Sjöholm, A.G., Eriksson, L., Thiel, S., Jensenius, J.C., Segelmark, M. and Truedsson, L., 2005. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. *Clin Exp Immunol* 139, 306-13.
13. Cerda-Flores, R.M., Budowle, B., Jin, L., Barton, S.A., Deka, R. and Chakraborty, R., 2002. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am J Hum Biol* 14, 429-39.
14. Claustres, M., Altieri, J.P., Guittard, C., Templin, C., Chevalier-Porst, F. and Des Georges, M., 2004. Are p.I148T, p.R74W and p.D1270N cystic fibrosis causing mutations? *BMC Med Genet* 5, 19.
15. Collaco, J.M. and Cutting, G.R., 2008. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 14, 559-66.
16. Collaco, J.M., Vanscoy, L., Bremer, L., McDougal, K., Blackman, S.M., Bowers, A., Naughton, K., Jennings, J., Ellen, J. and Cutting, G.R., 2008. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *Jama* 299, 417-24.
17. Collins, F.S., 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774-9.
18. Collins, F.S., Drumm, M.L., Cole, J.L., Lockwood, W.K., Vande Woude, G.F. and Iannuzzi, M.C., 1987. Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis. *Science* 235, 1046-9.
19. Corey, M., Durie, P., Moore, D., Forstner, G. and Levison, H., 1989. Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 115, 274-7.
20. Corvol, H., Boelle, P.Y., Brouard, J., Knauer, N., Chadelat, K., Henrion-Caude, A., Flamant, C., Muselet-Charlier, C., Boule, M., Fauroux, B., Vallet, C., Feingold, J., Ratjen, F., Grasemann, H. and Clement, A., 2008. Genetic variations in inflammatory mediators influence lung disease progression in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 43, 1224-32.
21. Corvol, H., Fitting, C., Chadelat, K., Jacquot, J., Tabary, O., Boule, M., Cavaillon, J.M. and Clement, A., 2003. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L997-1003.
22. Cotton, R.G., Auerbach, A.D., Brown, A.F., Carrera, P., Christodoulou, J., Claustres, M., Compton, J., Cox, D.W., De Baere, E., den Dunnen, J.T., Greenblatt, M., Fujiwara, M., Hilbert, P., Jani, A., Lehvaslaiho, H., Nebert, D.W., Verma, I. and Vihinen, M., 2007. A structured simple form for ordering genetic tests is needed to ensure coupling of clinical detail (phenotype) with DNA variants (genotype) to ensure utility in publication and databases. *Hum Mutat* 28, 931-2.
23. Courtney, J.M., Ennis, M. and Elborn, J.S., 2004. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3, 223-31.
24. Cox, T.M. and Sinclair, J., 1998. *Biología Molecular en Medicina* Primera Edición, 120-124.
25. Cutting, G.R., 2005. Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 237-60.

26. Chen, Y.P., Pfab, T., Slowinski, T., Richter, C.M., Godes, M. and Hocher, B., 2006. Impact of genetic variation of tumor necrosis factor-alpha on gestational hypertension. *Chin Med J (Engl)* 119, 719-24.
27. Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R. and Smith, A.E., 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-34.
28. Choi, J.Y., Lee, M.G., Ko, S. and Muallem, S., 2001. Cl(-)-dependent HCO₃-transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Jop* 2, 243-6.
29. Davies, J., Alton, E. and Griesenbach, U., 2005a. Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med* 98 Suppl 45, 47-54.
30. Davies, J., Neth, O., Alton, E., Klein, N. and Turner, M., 2000. Differential binding of mannose-binding lectin to respiratory pathogens in cystic fibrosis. *Lancet* 355, 1885-6.
31. Davies, J.C., Griesenbach, U. and Alton, E., 2005b. Modifier genes in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 39, 383-91.
32. Davies, J.C., Turner, M.W. and Klein, N., 2004. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. *Eur Respir J* 24, 798-804.
33. De Braekeleer, M., Allard, C., Leblanc, J.P., Simard, F. and Aubin, G., 1997. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet* 101, 208-11.
34. de Serres, F.J., 2003. Alpha-1 antitrypsin deficiency is not a rare disease but a disease that is rarely diagnosed. *Environ Health Perspect* 111, 1851-4.
35. Demeo, D.L., Sandhaus, R.A., Barker, A.F., Brantly, M.L., Eden, E., McElvaney, N.G., Rennard, S., Burchard, E., Stocks, J.M., Stoller, J.K., Strange, C., Turino, G.M., Campbell, E.J. and Silverman, E.K., 2007. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 62, 806-13.
36. Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M.A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., Cuppens, H., des Georges, M., Ferec, C., Macek, M., Pignatti, P.F., Scheffer, H., Schwartz, M., Witt, M., Schwarz, M. and Girodon, E., 2009. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17, 51-65.
37. Downey, D.G., Martin, S.L., Dempster, M., Moore, J.E., Keogan, M.T., Starcher, B., Edgar, J., Bilton, D. and Elborn, J.S., 2007. The relationship of clinical and inflammatory markers to outcome in stable patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 42, 216-20.
38. Drumm, M.L., Konstan, M.W., Schluchter, M.D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., Zariwala, M., Fargo, D., Xu, A., Dunn, J.M., Darrah, R.J., Dorfman, R., Sandford, A.J., Corey, M., Zielenski, J., Durie, P., Goddard, K., Yankaskas, J.R., Wright, F.A. and Knowles, M.R., 2005. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353, 1443-53.
39. Duan, S., Zhang, W., Cox, N.J. and Dolan, M.E., 2008. FstSNP-HapMap3: a database of SNPs with high population differentiation for HapMap3. *Bioinformatics* 3, 139-41.
40. Dugueperoux, I. and De Braekeleer, M., 2005. The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur Respir J* 25, 468-73.

41. Eden, E., Hammel, J., Rouhani, F.N., Brantly, M.L., Barker, A.F., Buist, A.S., Fallat, R.J., Stoller, J.K., Crystal, R.G. and Turino, G.M., 2003. Asthma features in severe alpha1-antitrypsin deficiency: experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest* 123, 765-71.
42. Farrell, P.M., Shen, G., Splaingard, M., Colby, C.E., Laxova, A., Kosorok, M.R., Rock, M.J. and Mischler, E.H., 1997. Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 100, E2.
43. Feo, F., Frau, M. and Pascale, R.M., 2008. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. *World J Gastroenterol* 14, 6601-15.
44. Flores-Martinez, S.E., Martinez, J.F., Machorro-Lazo, M.V., Garcia-Zapien, A.G., Salgado-Goytia, L., Cruz-Quevedo, E.G., Moran-Moguel, M.C. and Sanchez-Corona, J., 2008. XV-2c/KM19 haplotypes analysis of cystic fibrosis patients from western Mexico. *Acta Physiol Hung* 95, 313-25.
45. Frangolias, D.D., Ruan, J., Wilcox, P.J., Davidson, A.G., Wong, L.T., Berthiaume, Y., Hennessey, R., Freitag, A., Pedder, L., Corey, M., Sweezey, N., Zielenski, J., Tullis, E. and Sandford, A.J., 2003. Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 390-6.
46. Fujiwara, M., Yagi, H., Matsuoka, R. and Saji, T., 2008. [Analysis of genetic mutation and modifier genes in pulmonary arterial hypertension]. *Nippon Rinsho* 66, 2071-5.
47. Gabolde, M., Guilloud-Bataille, M., Feingold, J. and Besmond, C., 1999. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study. *Bmj* 319, 1166-7.
48. Gabolde, M., Hubert, D., Guilloud-Bataille, M., Lenaerts, C., Feingold, J. and Besmond, C., 2001. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Med Genet* 38, 310-1.
49. Gan, K.H., Veeze, H.J., van den Ouweland, A.M., Halley, D.J., Scheffer, H., van der Hout, A., Overbeek, S.E., de Jongste, J.C., Bakker, W. and Heijerman, H.G., 1995. A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease. *N Engl J Med* 333, 95-9.
50. Garred, P., Madsen, H.O., Halberg, P., Petersen, J., Kronborg, G., Svejgaard, A., Andersen, V. and Jacobsen, S., 1999a. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42, 2145-52.
51. Garred, P., Pressler, T., Lanng, S., Madsen, H.O., Moser, C., Laursen, I., Balstrup, F., Koch, C. and Koch, C., 2002. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* 33, 201-7.
52. Garred, P., Pressler, T., Madsen, H.O., Frederiksen, B., Svejgaard, A., Hoiby, N., Schwartz, M. and Koch, C., 1999b. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 104, 431-7.
53. Garza-Gonzalez, E., Bosques-Padilla, F.J., Mendoza-Ibarra, S.I., Flores-Gutierrez, J.P., Maldonado-Garza, H.J. and Perez-Perez, G.I., 2007. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 7, 70.

54. Genuneit, J., Weinmayr, G., Radon, K., Dressel, H., Windstetter, D., Rzehak, P., Vogelberg, C., Leupold, W., Nowak, D., von Mutius, E. and Weiland, S.K., 2006. Smoking and the incidence of asthma during adolescence: results of a large cohort study in Germany. *Thorax* 61, 572-8.
55. Gibson, R.L., Burns, J.L. and Ramsey, B.W., 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 918-51.
56. Goss, C.H., Newsom, S.A., Schildcrout, J.S., Sheppard, L. and Kaufman, J.D., 2004. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 816-21.
57. Gotz, M.H., Burghuber, O.C., Salzer-Muhar, U., Woloszczuk, W., Weissel, M. and Hartter, E., 1989. Cor pulmonale in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 82 Suppl 16, 26-31.
58. Graham, A., Kalsheker, N.A., Bamforth, F.J., Newton, C.R. and Markham, A.F., 1990. Molecular characterisation of two alpha-1-antitrypsin deficiency variants: proteinase inhibitor (Pi) Null(Newport) (Gly115----Ser) and (Pi) Z Wrexham (Ser-19---Leu). *Hum Genet* 85, 537-40.
59. Grebe, T.A., Seltzer, W.K., DeMarchi, J., Silva, D.K., Doane, W.W., Gozal, D., Richter, S.F., Bowman, C.M., Norman, R.A., Rhodes, S.N. and et al., 1994. Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 54, 443-6.
60. Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N. and Lukacs, G.L., 1999. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 274, 21873-7.
61. Hacking, D., Knight, J.C., Rockett, K., Brown, H., Frampton, J., Kwiatkowski, D.P., Hull, J. and Udalova, I.A., 2004. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility. *Genes Immun* 5, 274-82.
62. Hanrahan, J.W. and Wioland, M.A., 2004. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc* 1, 17-21.
63. Heinzmann, A., Ahlert, I., Kurz, T., Berner, R. and Deichmann, K.A., 2004. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 114, 671-6.
64. Hernandez-Pacheco, G., Flores-Dominguez, C., Rodriguez-Perez, J.M., Perez-Hernandez, N., Fragoso, J.M., Saul, A., Alvarez-Leon, E., Granados, J., Reyes, P.A. and Vargas-Alarcon, G., 2003. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease. *J Autoimmun* 21, 59-63.
65. Hillian, A.D., Londono, D., Dunn, J.M., Goddard, K.A., Pace, R.G., Knowles, M.R. and Drumm, M.L., 2008. Modulation of cystic fibrosis lung disease by variants in interleukin-8. *Genes Immun* 9, 501-8.
66. Hull, J., Thomson, A. and Kwiatkowski, D., 2000. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 55, 1023-7.
67. Hull, J. and Thomson, A.H., 1998. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 53, 1018-21.

68. Iannuzzi, M.C., Dean, M., Drumm, M.L., Hidaka, N., Cole, J.L., Perry, A., Stewart, C., Gerrard, B. and Collins, F.S., 1989. Isolation of additional polymorphic clones from the cystic fibrosis region, using chromosome jumping from D7S8. *Am J Hum Genet* 44, 695-703.
69. John, M., Ecclestone, E., Hunter, E., Couroux, P. and Hussain, Z., 1994. Epidemiology of *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 18, 108-13.
70. Jones, A.M., Martin, L., Bright-Thomas, R.J., Dodd, M.E., McDowell, A., Moffitt, K.L., Elborn, J.S. and Webb, A.K., 2003. Inflammatory markers in cystic fibrosis patients with transmissible *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* 22, 503-6.
71. Kalin, N., Claass, A., Sommer, M., Puchelle, E. and Tummeler, B., 1999. DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 103, 1379-89.
72. Kamdar, O., Le, W., Zhang, J., Ghio, A.J., Rosen, G.D. and Upadhyay, D., 2008. Air pollution induces enhanced mitochondrial oxidative stress in cystic fibrosis airway epithelium. *FEBS Lett* 582, 3601-6.
73. Kartner, N., Augustinas, O., Jensen, T.J., Naismith, A.L. and Riordan, J.R., 1992. Mislocalization of delta F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat Genet* 1, 321-7.
74. Kelly, M.M., Keatings, V., Leigh, R., Peterson, C., Shute, J., Venge, P. and Djukanovic, R., 2002. Analysis of fluid-phase mediators. *Eur Respir J Suppl* 37, 24s-39s.
75. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M. and Tsui, L.C., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-80.
76. Kilpatrick, D.C., 2003. Introduction to mannan-binding lectin. *Biochem Soc Trans* 31, 745-7.
77. Kirvela, O., Stern, R.C., Askanazi, J., Doershuk, C.F., Rothkopf, M.M. and Katz, D.P., 1993. Long-term parenteral nutrition in cystic fibrosis. *Nutrition* 9, 119-26.
78. Laguna, T.A., Sagel, S.D., Sontag, M.K. and Accurso, F.J., 2008. The clinical course of a Mexican female with cystic fibrosis and the novel genotype S531P/S531P. *J Cyst Fibros* 7, 454-6.
79. Lai, H.J., Cheng, Y., Cho, H., Kosorok, M.R. and Farrell, P.M., 2004. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 159, 537-46.
80. Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L.J., Klimecki, W.J., Silverman, E.K., Richter, B., Riva, A., Ramoni, M., Martinez, F.D., Weiss, S.T. and Kwiatkowski, D.J., 2002. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 190, 9-25.
81. Lee, W.P., Tai, D.I., Lan, K.H., Li, A.F., Hsu, H.C., Lin, E.J., Lin, Y.P., Sheu, M.L., Li, C.P., Chang, F.Y., Chao, Y., Yen, S.H. and Lee, S.D., 2005. The -251T allele of the interleukin-8 promoter is associated with increased risk of gastric carcinoma featuring diffuse-type histopathology in Chinese population. *Clin Cancer Res* 11, 6431-41.
82. LiPuma, J.J., 2001. *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis? *Transpl Infect Dis* 3, 149-60.

83. Mahadeva, R., Stewart, S., Bilton, D. and Lomas, D.A., 1998a. Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 53, 1022-4.
84. Mahadeva, R., Westerbeek, R.C., Perry, D.J., Lovegrove, J.U., Whitehouse, D.B., Carroll, N.R., Ross-Russell, R.I., Webb, A.K., Bilton, D. and Lomas, D.A., 1998b. Alpha1-antitrypsin deficiency alleles and the Taq-I G-->A allele in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 11, 873-9.
85. Mall, M., Grubb, B.R., Harkema, J.R., O'Neal, W.K. and Boucher, R.C., 2004. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10, 487-93.
86. Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W. and Boucher, R.C., 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005-15.
87. McGarvey, L.P., Dunbar, K., Martin, S.L., Brown, V., Macmahon, J., Ennis, M. and Elborn, J.S., 2002. Cytokine concentrations and neutrophil elastase activity in bronchoalveolar lavage and induced sputum from patients with cystic fibrosis, mild asthma and healthy volunteers. *J Cyst Fibros* 1, 269-75.
88. McKone, E.F., Emerson, S.S., Edwards, K.L. and Aitken, M.L., 2003. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 361, 1671-6.
89. McKone, E.F., Goss, C.H. and Aitken, M.L., 2006. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest* 130, 1441-7.
90. Mekus, F., Ballmann, M., Bronsveld, I., Bijman, J., Veeze, H. and Tummeler, B., 2000. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res* 3, 277-93.
91. Merlo, C.A. and Boyle, M.P., 2003. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* 141, 237-41.
92. Meyer, P., Braun, A. and Roscher, A.A., 2002. Analysis of the two common alpha-1-antitrypsin deficiency alleles PiMS and PiMZ as modifiers of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in cystic fibrosis. *Clin Genet* 62, 325-7.
93. Monton, C. and Torres, A., 1998. Lung inflammatory response in pneumonia. *Monaldi Arch Chest Dis* 53, 56-63.
94. Muhlebach, M.S., MacDonald, S.L., Button, B., Hubbard, J.J., Turner, M.L., Boucher, R.C. and Kilpatrick, D.C., 2006. Association between mannan-binding lectin and impaired lung function in cystic fibrosis may be age-dependent. *Clin Exp Immunol* 145, 302-7.
95. Nixon, G.M., Armstrong, D.S., Carzino, R., Carlin, J.B., Olinsky, A., Robertson, C.F., Grimwood, K. and Wainwright, C., 2002. Early airway infection, inflammation, and lung function in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 87, 306-11.
96. O'Connor, G.T., Quinton, H.B., Kahn, R., Robichaud, P., Maddock, J., Lever, T., Detzer, M. and Brooks, J.G., 2002. Case-mix adjustment for evaluation of mortality in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 33, 99-105.
97. O'Connor, G.T., Quinton, H.B., Kneeland, T., Kahn, R., Lever, T., Maddock, J., Robichaud, P., Detzer, M. and Swartz, D.R., 2003. Median household income and mortality rate in cystic fibrosis. *Pediatrics* 111, e333-9.

98. Oliver, A., Alarcon, T., Caballero, E. and Canton, R., 2009. [Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 89-104.
99. Olveira, G. and Olveira, C., 2008. [Nutrition, cystic fibrosis and the digestive tract]. *Nutr Hosp* 23 Suppl 2, 71-86.
100. Ordonez, C.L., Stulbarg, M., Grundland, H., Liu, J.T. and Boushey, H.A., 2001. Effect of clarithromycin on airway obstruction and inflammatory markers in induced sputum in cystic fibrosis: a pilot study. *Pediatr Pulmonol* 32, 29-37.
101. Orozco, L., Velazquez, R., Zielenski, J., Tsui, L.C., Chavez, M., Lezana, J.L., Saldana, Y., Hernandez, E. and Carnevale, A., 2000. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G-->A). *Hum Genet* 106, 360-5.
102. Parra-Rojas, I., Ruiz-Madrigal, B., Martinez-Lopez, E. and Panduro, A., 2006. Influence of the -308 TNF-alpha and -174 IL-6 polymorphisms on lipid profile in Mexican subjects. *Hereditas* 143, 167-72.
103. Parry, C.S. and Brooks, B.R., 2008. A new model defines the minimal set of polymorphism in HLA-DQ and -DR that determines susceptibility and resistance to autoimmune diabetes. *Biol Direct* 3, 42.
104. Picard, E., Aviram, M., Yahav, Y., Rivlin, J., Blau, H., Bentur, L., Avital, A., Villa, Y., Schwartz, S., Kerem, B. and Kerem, E., 2004. Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF. *Pediatr Pulmonol* 38, 292-7.
105. Piitulainen, E. and Sveger, T., 2002. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax* 57, 705-8.
106. Presanis, J.S., Kojima, M. and Sim, R.B., 2003. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochem Soc Trans* 31, 748-52.
107. Puthothu, B., Krueger, M., Heinze, J., Forster, J. and Heinzmann, A., 2006. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy* 4, 2.
108. Ramsey, B.W., 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 335, 179-88.
109. Ranganathan, R. and Ross, E.M., 1997. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* 7, R770-3.
110. Ratjen, F. and Doring, G., 2003. Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681-9.
111. Rich, D.P., Anderson, M.P., Gregory, R.J., Cheng, S.H., Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger, K.W., Smith, A.E. and Welsh, M.J., 1990. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347, 358-63.
112. Riordan, J.R., 1999. Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet* 64, 1499-504.
113. Ripperger, T., Gadzicki, D., Meindl, A. and Schlegelberger, B., 2008. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*.
114. Rodriguez-Carreón, A.A., Zuniga, J., Hernandez-Pacheco, G., Rodriguez-Perez, J.M., Perez-Hernandez, N., Montes de Oca, J.V., Cardiel, M.H., Granados, J. and Vargas-Alarcon, G., 2005. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism

- contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun* 24, 63-8.
115. Rodriguez-Perez, J.M., Cruz-Robles, D., Hernandez-Pacheco, G., Perez-Hernandez, N., Murguia, L.E., Granados, J., Reyes, P.A. and Vargas-Alarcon, G., 2005. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 98, 97-102.
 116. Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N. and et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-65.
 117. Ross, O.A., O'Neill, C., Rea, I.M., Lynch, T., Gosal, D., Wallace, A., Curran, M.D., Middleton, D. and Gibson, J.M., 2004. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish. *Hum Immunol* 65, 340-6.
 118. Rowe, S.M., Miller, S. and Sorscher, E.J., 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352, 1992-2001.
 119. Rowntree, R.K. and Harris, A., 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 67, 471-85.
 120. Ruhe, H.G., Ooteman, W., Booij, J., Michel, M.C., Moeton, M., Baas, F. and Schene, A.H., 2009. Serotonin transporter gene promoter polymorphisms modify the association between paroxetine serotonin transporter occupancy and clinical response in major depressive disorder. *Pharmacogenet Genomics* 19, 67-76.
 121. Sagel, S.D., Chmiel, J.F. and Konstan, M.W., 2007. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 4, 406-17.
 122. Sakao, S., Tatsumi, K., Igari, H., Watanabe, R., Shino, Y., Shirasawa, H. and Kuriyama, T., 2002. Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism with low attenuation areas on high-resolution CT in patients with COPD. *Chest* 122, 416-20.
 123. Sallakci, N., Akcurin, G., Koksoy, S., Kardelen, F., Uguz, A., Coskun, M., Ertug, H. and Yegin, O., 2005. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. *J Autoimmun* 25, 150-4.
 124. Sanchez-Dominguez, C.N., Buenfil-Lozano, J.A., Molina-Guajardo, C.A., Borjas-Almaguer, O.D., Castillo-Lartigue, A., Bustamante-Saenz, A., Martinez-Rodriguez, H.G., Alarcon, M.A., Reyes-Lopez, M.A. and Ortiz-Lopez, R., 2008. Frequency of S and Z alleles for alpha-1-antitrypsin and tumor necrosis factor alpha -308 promoter polymorphism in northeastern Mexico. *Allergy Asthma Proc* 29, 406-10.
 125. Sánchez-Domínguez, C.N., Ortiz-López, R., Bustamante-Sáenz, A. and Reyes-López, M.A., 2006. Tras las pistas de la Fibrosis Quística. *Conversus IPN*, 32-38.
 126. Sandford, A.J., Chagani, T., Spinelli, J.J. and Pare, P.D., 1999a. alpha1-antitrypsin genotypes and the acute-phase response to open heart surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1624-8.
 127. Sandford, A.J., Chagani, T., Weir, T.D., Connett, J.E., Anthonisen, N.R. and Pare, P.D., 2001. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 469-73.
 128. Sandford, A.J., Weir, T.D., Spinelli, J.J. and Pare, P.D., 1999b. Z and S mutations of the alpha1-antitrypsin gene and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 287-91.

129. Santis, G., Osborne, L., Knight, R.A. and Hodson, M.E., 1990. Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *Lancet* 336, 1081-4.
130. Scott, R.J. and Lubinski, J., 2009. Genetic epidemiology studies in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Methods Mol Biol* 472, 89-102.
131. Schechter, M.S., Shelton, B.J., Margolis, P.A. and Fitzsimmons, S.C., 2001. The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1331-7.
132. Schrijver, I., Ramalingam, S., Sankaran, R., Swanson, S., Dunlop, C.L., Keiles, S., Moss, R.B., Oehlert, J., Gardner, P., Wassman, E.R. and Kammesheidt, A., 2005. Diagnostic testing by CFTR gene mutation analysis in a large group of Hispanics: novel mutations and assessment of a population-specific mutation spectrum. *J Mol Diagn* 7, 289-99.
133. Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J. and Guggino, W.B., 1999. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79, S145-66.
134. Seidelmann, S.B., Kuo, C., Pleskac, N., Molina, J., Sayers, S., Li, R., Zhou, J., Johnson, P., Braun, K., Chan, C., Teupser, D., Breslow, J.L., Wight, T.N., Tall, A.R. and Welch, C.L., 2008. *Athsq1* is an atherosclerosis modifier locus with dramatic effects on lesion area and prominent accumulation of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2180-6.
135. Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M.J. and Milgram, S.L., 1998. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 19797-801.
136. Slaughter, M.C., 2007. Not quite asthma: differential diagnosis of dyspnea, cough, and wheezing. *Allergy Asthma Proc* 28, 271-81.
137. Sliker, M.G., Sanders, E.A., Rijkers, G.T., Ruven, H.J. and van der Ent, C.K., 2005. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2, 7-13.
138. Smith, A.K., Lange, L.A., Ampleford, E.J., Meyers, D.A., Bleecker, E.R. and Howard, T.D., 2008. Association of polymorphisms in *CASP10* and *CASP8* with FEV/FVC and bronchial hyperresponsiveness in ethnically diverse asthmatics. *Clin Exp Allergy*.
139. Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P. and Welsh, M.J., 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85, 229-36.
140. Soto-Vega, E., Richaud-Patin, Y. and Llorente, L., 2005. Human leukocyte antigen class I, class II, and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in a healthy elder Mexican Mestizo population. *Immun Ageing* 2, 13.
141. Stefanakis, N., Ziroyiannis, P., Trygonis, S. and Lamnissou, K., 2008. Modifier effect of the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 110, c101-6.
142. Sugarman, E.A., Rohlf, E.M., Silverman, L.M. and Allitto, B.A., 2004. CFTR mutation distribution among U.S. Hispanic and African American individuals: evaluation in cystic fibrosis patient and carrier screening populations. *Genet Med* 6, 392-9.

143. Summerfield, J.A., 2003. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. *Biochem Soc Trans* 31, 770-3.
144. Terheggen-Lagro, S.W., Rijkers, G.T. and van der Ent, C.K., 2005. The role of airway epithelium and blood neutrophils in the inflammatory response in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2, 15-23.
145. Tin, S.K., Lee, L.Y., Thumboo, J., Koh, D.R. and Fong, K.Y., 2005. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human mannose binding lectin (MBL-2) gene. *J Immunol Methods* 303, 148-51.
146. Torres-Vela, D., 2002. Estudio clínico epidemiológico de la Fibrosis Quística en el Instituto de Salud del Niño, Lima *Paediatrica* 4, 7-15.
147. Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J.W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plavsic, N. and et al., 1985. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230, 1054-7.
148. van der Kuyl, A.C., Polstra, A.M., Weverling, G.J., Zorgdrager, F., van den Burg, R. and Cornelissen, M., 2004. An IL-8 gene promoter polymorphism is associated with the risk of the development of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a case-control study. *Aids* 18, 1206-8.
149. Vankeerberghen, A., Wei, L., Jaspers, M., Cassiman, J.J., Nilius, B. and Cuppens, H., 1998. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet* 7, 1761-9.
150. Vargas-Alarcon, G., Casasola-Vargas, J., Rodriguez-Perez, J.M., Huerta-Sil, G., Perez-Hernandez, N., Londono, J., Pacheco-Tena, C., Cardiel, M.H., Granados, J. and Burgos-Vargas, R., 2006. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum Immunol* 67, 826-32.
151. Velázquez, A., Vela-Amieva, M., Naylor, E.W. and Chace, D.H., 2000. Tamiz neonatal ampliado. *Rev Mex Pediatr* 67, 206-213.
152. Villalobos-Torres, C., Rojas-Martinez, A., Villareal-Castellanos, E., Cantu, J.M., Sanchez-Anzaldo, F.J., Saiki, R.K. and Barrera-Saldana, H.A., 1997. Analysis of 16 cystic fibrosis mutations in Mexican patients. *Am J Med Genet* 69, 380-2.
153. Weinberger, M. and Abu-Hasan, M., 2007. Pseudo-asthma: when cough, wheezing, and dyspnea are not asthma. *Pediatrics* 120, 855-64.
154. Welsh, M.J., Ramsey, B.W., Accurso, F.J. and Cutting, G.R. 2001. Cystic Fibrosis. In the *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, P. Valle and W.S. Sly (Eds), McGraw-Hill, New York, pp. 5121-5188.
155. Welsh, M.J. and Smith, A.E., 1995. Cystic fibrosis. *Sci Am* 273, 52-9.
156. Weydt, P., Soyal, S.M., Gellera, C., Didonato, S., Weidinger, C., Oberkofler, H., Landwehrmeyer, G.B. and Patsch, W., 2009. The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease. *Mol Neurodegener* 4, 3.
157. Xiao, W., Hsu, Y.P., Ishizaka, A., Kirikae, T. and Moss, R.B., 2005. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* 128, 2316-26.
158. Yamamoto-Furusho, J.K., Uscanga, L.F., Vargas-Alarcon, G., Rodriguez-Perez, J.M., Zuniga, J. and Granados, J., 2004. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 95, 31-5.

159. Yarden, J., Radojkovic, D., De Boeck, K., Macek, M., Jr., Zemkova, D., Vavrova, V., Vlietinck, R., Cassiman, J.J. and Cuppens, H., 2004. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. *J Med Genet* 41, 629-33.
160. Yarden, J., Radojkovic, D., De Boeck, K., Macek, M., Jr., Zemkova, D., Vavrova, V., Vlietinck, R., Cassiman, J.J. and Cuppens, H., 2005. Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype. *Thorax* 60, 320-5.
161. Yokoyama-Rebollar, E., Chávez-Saldaña, M., Villarroel-Cortés, C., Carnevale-Cantoni, A., Lezana-Fernández, J.L., Cuevas, F. and Orozco, L., 2007. Frecuencia de mutaciones del gen CFTR en pacientes mexicanos con Fibrosis Quística. Congreso Mexicano de Genética Humana.
162. Zielenski, J., 2000. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67, 117-33.
163. Zielenski, J., Rozmahel, R., Bozon, D., Kerem, B., Grzelczak, Z., Riordan, J.R., Rommens, J. and Tsui, L.C., 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10, 214-28.
164. Zuniga, J., Vargas-Alarcon, G., Hernandez-Pacheco, G., Portal-Celhay, C., Yamamoto-Furusho, J.K. and Granados, J., 2001. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun* 2, 363-6.

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Análisis de mutaciones en el RCTFQ mediante hibridación con sondas ASO.

El estuche INNOLiPA CFTR36 es capaz de detectar las versiones normales y mutantes siguientes: $\Delta F508$, $\Delta I507$, G542X, 1717-1G \rightarrow A, G551D, R553X, R560T, Q552X, W1282X, S1251N, 3905insT, N1303K, 711 + 1G \rightarrow T, 1898 +1G \rightarrow A, I148T, 3120 + 1G \rightarrow A, 394delTT, G85E, E60X, 621 + 1G \rightarrow T, R117H, 1078del T, R347P, R334W, 2143delT, 2183AA \rightarrow G, 2184delA, 711 + 5G \rightarrow A, 2789 + G \rightarrow A, R1162X, 3659delC, 3849+10kbC \rightarrow T y A455E, dele2,3, 3272-26A \rightarrow G y 3199del6; además de los polimorfismos 5T, 7T, 9T.

I. Reacción de PCR

1. Se rotularon los tubos necesarios de acuerdo al número de pacientes que se va a trabajar.
2. Se preparó el master mix como a continuación se describe:

Reactivo	Sangre Parte 1 (PS1)	Sangre Parte 2 (PS2)	Cepillado bucal Parte 1 (PS1)	Cepillado bucal Parte 2 (PS2)
Agua	N x 14.4 μ L	N x 14.4 μ L	N x 11.4 μ L	N x 11.4 μ L
Amplificación Búfer	N x 6 μ L			
Primer solution	N x 6 μ L (tapa amarilla)	N x 6 μ L (tapa verde)	N x 6 μ L (tapa amarilla)	N x 6 μ L (Tapa verde)
Taq	N x 0.6 μ L (5 U/ μ l Taq)	N x 0.6 μ L (5 U/ μ l Taq)	N x 0.6 μ L (5 U/ μ l Taq)	N x 0.6 μ L (5 U/ μ l Taq)

N: No de pacientes + 1

El volumen por muestra será de 27 y 24 μ L respectivamente.

3. Se agregó 27 (o 24, si era cepillado bucal) μ L del master mix a cada tubo, teniendo cuidado de poner el mix correspondiente en el tubo correspondiente.
4. Se agregó a cada uno 3 μ l (0.1 a 1.5 μ g) de DNA genómico proveniente de sangre o 6 μ L si se trataba de cepillado bucal (50 a 300 ng/ μ L, con una A260/A280 mayor a 1.5). Para los controles negativos se empleó agua ultrapura estéril.
5. Se colocaron los tubos en el termociclador y se corrió el siguiente programa de PCR:

Paso	Acción	Tiempo/Temp	No. de ciclos
1	Desnat. Inicial Se recomienda Hot Start	15 min a 95°C	1
2	Amplificación	1 min a 95°C 1 min a 57°C 1 min a 68°C	30
3	Extensión final	10 min a 68°C	1
		Almacenar a 4°C	

II. Análisis del producto amplificado en el gel de agarosa.

1. Se preparó un gel de agarosa al 2%
2. Se tomó 5 μ L del producto amplificado y se mezcló con 1 μ L de jugo azul 6X
3. Se colocaron las muestras en el gel de agarosa al 2% y se realizó la electroforesis a 100V durante 1 h (aproximadamente la mitad del gel).
4. Se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio (2 μ g/mL) durante 5 min. Se lavó con agua corriente y se colocó en el transiluminador para observar las bandas amplificadas.

Región	PS16 pb
Intrón 10	491
Intrón 20	473
Intrón 16	460
Intrón 10/Exón 11	425
Exón 21	379
Exón 12	331
Exón/Intrón 4	304
Exón 5	144

Región	PS16 pb
Intrón 8/Exón 9	495
Exón 17a	473
Intrón 19	425
Exón 19	411
Intrón 17a/Exón 17b	395
Exón 7	341
Exón 2	328
Intrón 14b	320
Exón 3	311
Exón 13	181

III. Hibridación

1. Se calentó un baño de agua con agitación a 47 ± 0.5 °C. Se precalentó la Solución de hibridación (HS) y la solución astringente de lavado (SW) en un baño de agua a 37-47°C. Se Mezcló hasta que los cristales se disolvieron.
2. Usando unas pinzas, se removió el número requerido de tiras CFTR 19 y CFTR17+Tn y se marcaron con un lápiz.
3. Se agregó 10 μ L de Solución de desnaturalización (DS), 10 μ L de amplicón PS1 y 10 μ L de amplicón PS2 en la esquina superior de cada carril por duplicado para cada paciente y se mezcló por pipeteo.
4. Se mezcló la solución HS previamente calentada y se añadió cuidadosamente 2 mL al producto amplificado desnaturalizado en cada carril. Se mezcló suavemente por movimiento circular cuidando de no contaminar los carriles vecinos.
5. Se colocó inmediatamente la tiras marcadas con el lado marcado hacia arriba en su carril correspondiente (CFTR 19 en un carril y CFTR17+Tn en el segundo carril). Las tiras debieron estar completamente sumergidas en la solución.
6. Se colocó la charola en el baño de agua con agitación a 47 ± 0.5 °C a 80 r.p.m., se tapó y se incubó por 90 min (la charola debió estar 1/3 a 1/2 sumergida en el agua, e inmovilizada la charola con algo pesado para que no flote).

IV. Lavado astringente

1. Se sacó la charola, se inclinó ligeramente y se aspiró con vacío.
2. Se añadió 2 mL de solución de lavado astringente SW precalentada en cada carril y se enjuagó y se mezcló por movimiento circular lateral 10- 20 seg a temperatura ambiente.
3. Se aspiró la solución de cada carril y se repitió este breve lavado una vez más.
4. Se agregó 2 ml de SW precalentada en el baño de agua y se incubó con agitación a 47 ± 0.5 °C a 80 rpm por 30 min.

V. Desarrollo del color

1. Las incubaciones subsecuentes fueron a 20-25 °C en una plataforma agitadora.
2. Se lavó cada tira con 2 mL de RS diluida 1:5 por 1 min. Se repitió este paso una vez más.
3. Se añadió 2 mL de solución conjugado diluida a cada carril y se incubó 30 min en la plataforma agitadora.
4. Se lavó cada tira con 2 mL de RS diluida 1:5 por 1 min. Se repitió este paso una vez más.
5. Se Lavó cada tira con 2 mL de buffer de substrato (SB) por 1 min.
6. Se añadió 2 mL de solución de substrato diluida 1:100 (S, preparada 10 m antes de su uso) a cada carril y se incubó 30 min en el agitador.

7. Se aspiró la solución de sustrato. El desarrollo de color se detuvo lavando las tiras dos veces en 2 mL de agua destilada con agitación por 3 min.
8. Se removió el agua con vacío. Usando pinzas, se removió las tiras de los carriles y se colocaron sobre papel absorbente.
9. Se dejó secar completamente. Se leyeron los resultados con ayuda de plantillas.
10. Se almacenaron las tiras en la oscuridad.

V. Interpretación

Se determinó el estado homocigoto normal, homocigoto mutante, heterocigoto compuesto, o una mutación positiva con una segunda desconocida, mediante la presencia de líneas púrpura que concordaron con la plantilla correspondiente.

Anexo 2. Descripción de las mutaciones detectadas en RCTFQ en este trabajo.

Mutación	Cambio	Exón	Consecuencia	Autor y año	Población
$\Delta F508$	Delección de 3 pb entre 1652 y 1655	10	delección de Phe en 508	Rommens et al., Riordan et al., Kerem et al. 1989	
G542X	G a T en 1756	11	Gly a Alto en 542	Kerem et al. 1990	Española
S549N	G a A en 1778	11	Ser a Asn en 549	Cutting et al. 1990	
2789+ 5G \rightarrow A	G a A 2789+ 5	Intrón 14b	Defecto de procesamiento del RNAm	Highsmith et al. 1990	Española
3849+ 10kbC \rightarrow T	C a T	Intrón 19	Creación de un sitio aceptor de procesamiento de RNAm	Highsmith et al. 1994	
G85E	G a A ent 386	3	Gly a Glu en 85	Zielenski et al. 1991b	
R1162X	C a T en 3616	19	Arg a codón de alto en 1162	Gasparini et al. 1991	Italianos
I148T	T a C en 575	4	Ile a Thr en 148	Bozon et al. 1994	Franco-canadiense
R334W	C a T en 1132	7	Arg a Trp en 334	Estivill et al. 1991	
$\Delta I507$	Delección de 3 pb entre 1648 y 1653	10	Delección de Ile506 ó Ile507	Kerem et al. 1990; Schwarz et al. 1991	
L206W	T a G en 749	6a	Leu a Trp en 206	Claustres et al. 1993	

Datos obtenidos de la página <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Anexo 3. Protocolo de ELISA para MBL funcional

Los reactivos utilizados se sacaron de refrigeración (4°C) antes de comenzar con el ensayo para asegurar que al utilizarlos hubieran alcanzado la temperatura ambiente (20-25°C). Se removieron del empaque el número de tiras de pozos necesarias para el número de muestras a ensayar. Las muestras de suero y plasma se diluyeron 1:100 en diluyente de muestra para una primera lectura, y en caso de obtener lecturas fuera de rango se diluyeron apropiadamente. Las muestras de esputo se analizaron directas y diluidas 1:5.

1. A cada pozo se añadieron 100 µL de suero, plasma, esputo o calibrador.
2. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C) en una plataforma de agitación.
3. Después de la incubación se aspiró el contenido de cada pozo con ayuda de una línea de vacío y lavó tres veces con 300 µL de tampón de lavado diluido al 1X con agua ultrapura. Se secó sobre toallas de papel después del último lavado.
4. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 µL del conjugado anti-MBL biotinilado y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma de agitación.
5. La placa se lavó como en el paso 3.
6. -A cada pozo se le añadió 100 µL de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano)
7. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma de agitación.
8. La placa se lavó como en el paso 3.
9. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 µL de TMB (tetrametilbencidina).
10. Se incubó la placa durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad, cronometrando desde la primera adición de TMB.
11. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 µL de la solución de paro en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave por 20 seg. En los pocillos con MBL funcional detectable el color cambió de azul a amarillo.
12. Antes de 30 min, se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm y utilizando un filtro de referencia de 630 nm.
13. Se construyó la curva de calibración en el programa Excel.

Anexo 4. Protocolo de ELISA para TNF α

Los reactivos utilizados se sacaron de refrigeración (4°C) antes de comenzar con el ensayo para asegurar que al utilizarlos hubieran alcanzado la temperatura ambiente (20-25°C). Se removieron del empaque el número de tiras de pozos necesarias para el número de muestras a ensayar. Las muestras de suero y plasma se analizaron directas. Las muestras de esputo se analizaron directas y diluidas 1:5 en diluyente RD6-35.

1. A cada pozo se añadieron 50 μ L de Diluyente de ensayo RD1F, y posteriormente 200 μ L de suero, plasma, esputo o calibrador.
2. La placa se cubrió e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C).
3. Después de la incubación se aspiró el contenido de cada pozo con ayuda de una línea de vacío y lavó cuatro veces con 300 μ L de tampón de lavado diluido al 1X, secando sobre toallas de papel después del último lavado.
4. A cada pozo se le añadió 200 μ L de anti-TNF α -peroxidasa.
5. La placa se cubrió e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. La placa se lavó como en el paso 3.
7. A cada pocillo de la placa se añadieron 200 μ L de TMB (tetrametilbencidina).
8. Se incubó la placa durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad, cronometrando desde la primera adición de TMB.
9. A cada pocillo de la placa se añadieron 50 μ L de la solución de paro en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave. En los pocillos con TNF α detectable el color azul cambió a amarillo.
10. Antes de 30 min, se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm y utilizando un filtro de referencia de 570 nm.
11. Se construyó la curva de calibración en el programa Excel.

Anexo 5. Protocolo de ELISA para IL-8

Los reactivos utilizados se sacaron de refrigeración (4°C) antes de comenzar con el ensayo para asegurar que al utilizarlos hubieran alcanzado la temperatura ambiente (20-25°C). Se removieron del empaque el número de tiras de pozos necesarias para el número de muestras a ensayar. Las muestras de suero y plasma se analizaron directas, y en caso de obtener lecturas fuera de rango se diluyeron. Las muestras de esputo se analizaron directas y diluidas 1:5 en diluyente RD6Z.

1. A cada pozo se añadieron 100 µL de Diluyente de ensayo RD1-85, y posteriormente 50 µL de suero, plasma, esputo o calibrador.
2. La placa se cubrió e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C).
3. Después de la incubación se aspiró el contenido de cada pozo con ayuda de una línea de vacío y lavó cuatro veces con 300 µL tampón de lavado diluido al 1X, secando sobre toallas de papel después del último lavado.
4. A cada pozo se le añadió 100 µL de anti-IL-8-peroxidasa.
5. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. La placa se lavó como en el paso 3.
7. A cada pocillo de la placa se añadieron 200 µL de TMB (tetrametilbencidina).
8. Se incubó la placa durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, cronometrando desde la primera adición de TMB.
9. A cada pocillo de la placa se añadieron 50 µL de la solución de paro en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave. En los pocillos con IL-8 detectable el color azul cambió a amarillo.
10. Antes de 30 min, se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm y utilizando un filtro de referencia de 570 nm.
11. Se construyó la curva de calibración en el programa Excel.

Anexo 6. Protocolo de ELISA para AAT

Los reactivos utilizados se sacaron de refrigeración (4°C) antes de comenzar con el ensayo para asegurar que al utilizarlos hubieran alcanzado la temperatura ambiente (20-25°C). Se removieron del empaque el número de tiras de pozos necesarias para el número de muestras a ensayar. Las muestras de plasma y suero se diluyeron 1:250,000 en tampón de lavado diluido 1X, y las de esputo se analizaron directas y diluidas 1:5.

1. Se lavó cinco veces los pozos a utilizar con tampón de lavado diluido al 1X, secando sobre toallas de papel después del último lavado.
2. A cada pozo se añadieron 100 µL de suero, plasma, esputo o calibrador.
3. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Después de la incubación se aspiró el contenido de cada pozo con ayuda de una línea de vacío y lavó como en el paso 1.
5. A cada pozo se le añadió 100 µL del conjugado anti-AAT-peroxidasa.
6. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. La placa se lavó como en el paso 4.
8. A cada pocillo de la placa se añadieron 100 µL de TMB (tetrametilbencidina).
9. Se incubó la placa durante 15 min a temperatura ambiente, cronometrando desde la primera adición de TMB.
10. A cada pocillo de la placa se añadieron 50 µL de la solución de paro en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Se mezcló con agitación suave. En los pocillos con AAT detectable el color azul cambió a amarillo.
11. Antes de 30 min, se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm y utilizando un filtro de referencia de 630 nm.
12. Se construyó la curva de calibración en el programa Excel.

Anexo 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos analizados en el grupo de testigos.

MBL A/D		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	93	93.2
Heterocigoto:	10	9.5
Homocigoto variante:	0	0.2
Frecuencia del alelo variante:	0.05	
$X^2 =$	0.268117451	
Valor de P de la prueba $X^2 =$	0.604597	Con 1 grado de libertad

MBL A/B		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	76	74.3
Heterocigoto:	23	26.3
Homocigoto variante:	4	2.3
Frecuencia del alelo variante:	0.15	
$X^2 =$	1.651776236	
Valor de P de la prueba $X^2 =$	0.198717	Con 1 grado de libertad

MBL A/C		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	91	91.3
Heterocigoto:	11	10.4
Homocigoto variante:	0	0.3
Frecuencia del alelo variante:	0.05	
$X^2 =$	0.331337754	
Valor de P de la prueba $X^2 =$	0.564872	Con 1 grado de libertad

MBL2 A/O		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	63	60.6
Heterocigoto:	32	36.8
Homocigoto variante:	8	5.6
Frecuencia del alelo variante:	0.23	
$X^2 =$	1.762235397	
Valor de P de la prueba $X^2 =$	0.184346	Con 1 grado de libertad

AATS		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	101	101.0
Heterocigoto:	3	3.0
Homocigoto variante:	0	0.0
Frecuencia del alelo variante:		0.01
$X^2 =$		0.022272457
Valor de P de la prueba $X^2 =$		0.881365

Con 1 grado de libertad

TNF-308		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	97	97.1
Heterocigoto:	6	5.8
Homocigoto variante:	0	0.1
Frecuencia del alelo variante:		0.03
$X^2 =$		0.0927
Valor de P de la prueba $X^2 =$		0.760772

Con 1 grado de libertad

IL-8 -251		
Genotipos	Observado #	Esperado #
Homocigoto de referencia:	19	19.0
Heterocigoto:	50	50.0
Homocigoto variante:	33	33.0
Frecuencia del alelo variante:		0.57
$X^2 =$		6.26468E-05
Valor de P de la prueba $X^2 =$		0.993685

Con 1 grado de libertad

1. $S P < 0.05$ - no es consistente con el Equilibrio de Hardy-Weinberg

2. No es exacto si hay <5 individuos en cualquier grupo de genotipo

Michael H. Court (2005-

2008)

www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls

Anexo 8. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de los genes modificadores en diversas poblaciones

MBL2: B: rs1800450 Alelos C/T. Alelo ancestral: C

Población	Alelo C	Alelo T	Genotipos C C	Genotipos C T	Genotipos T T
Controles del Noreste de México	0.85	0.15	0.0.738	0.223	0.039
CSHL-HAPMAP:HapMap-CEU	0.850	0.150	0.700	0.300	0.017
CSHL-HAPMAP:HapMap-HCB	0.867	0.133	0.733	0.267	0.044
CSHL-HAPMAP:HapMap-JPT	0.867	0.133	0.733	0.267	0.022
CSHL-HAPMAP:HapMap-YRI	0.992	0.008	0.983	0.017	0.000
PERLEGEN:AFD CHN PANEL	0.771	0.229	0.583	0.375	0.042
PERLEGEN:AFD EUR PANEL	0.854	0.146	0.750	0.208	0.042
SEQUENOM:CEPH	0.660	0.340			

MBL2 C = rs1800451

Población	Alelos C	Alelos T	Genotipos C C	Genotipos C T	Genotipos T T
Controles del Noreste de México	0.96	0.04	0.913	0.087	0.000
APPLERA GI:AGI ASP population	0.821	0.179	0.641	0.359	
CSHL-HAPMAP:HapMap-CEU	0.967	0.033	0.933	0.067	
CSHL-HAPMAP:HapMap-HCB	1.000		1.000		
CSHL-HAPMAP:HapMap-JPT	1.000		1.000		
CSHL-HAPMAP:HapMap-YRI	0.725	0.275	0.517	0.417	0.067
SEQUENOM:CEPH	0.950	0.050			
SNP500CANCER:AFR1	0.833	0.167	0.667	0.333	
SNP500CANCER:CAUC1	1.000	unknown	1.000	unknown	
SNP500CANCER:HISP1	0.957	0.043	0.913	0.087	
SNP500CANCER:P1	0.951	0.049	0.902	0.098	
SNP500CANCER:PAC1	1.000	unknown	1.000	unknown	

MBL2 D = rs5030737

Población	Alelos A	Alelos G	Genotipos A G	Genotipos G G
Controles del Noreste de México	0.05	0.950	0.097	0.903
APPLERA GI:AGI ASP population	0.051	0.949	0.103	0.897
CSHL-HAPMAP:HapMap-CEU		1.000		1.000
CSHL-HAPMAP:HapMap-HCB		1.000		1.000
CSHL-HAPMAP:HapMap-JPT		1.000		1.000
CSHL-HAPMAP:HapMap-YRI		1.000		1.000
SNP500CANCER:AFR1	0.021	0.979	0.042	0.958
SNP500CANCER:CAUC1	0.097	0.903	0.194	0.806
SNP500CANCER:HISP1	0.043	0.957	0.087	0.913
SNP500CANCER:P1	0.044	0.956	0.088	0.912
SNP500CANCER:PAC1	unknown	1.000	unknown	1.000

IL-8 -251 A>T SNP (rs4073), Allelos A/T, Alelo ancestral: A

Población	Alelos A	Alelos T	Genotipos A A	Genotipos A T	Genotipos T T
Controles del Noreste de México	0.43	0.57	0.186	0.490	0.324
<u>KYUGEN:CP</u>	0.420	0.580			
<u>KYUGEN:JPK2</u>	0.340	0.660			
<u>PGA-UW-FHCRC:AAM GENO PANEL</u>	0.734	0.266	0.548	0.371	0.081
<u>PGA-UW-FHCRC:CEU GENO PANEL</u>	0.400	0.600	0.167	0.467	0.367
<u>PGA-UW-FHCRC:CHB GENO PANEL</u>	0.389	0.611	0.111	0.556	0.333
<u>PGA-UW-FHCRC:HSP GENO PANEL</u>	0.500	0.500	0.246	0.509	0.246
<u>PGA-UW-FHCRC:JPT GENO PANEL</u>	0.271	0.729	0.029	0.486	0.486
<u>PGA-UW-FHCRC:PGA-AFRICAN-PANEL</u>	0.771	0.229	0.583	0.375	0.042
<u>PGA-UW-FHCRC:PGA-EUROPEAN-PANEL</u>	0.341	0.659	0.136	0.409	0.455
<u>PGA-UW-FHCRC:YRI GENO PANEL</u>	0.825	0.175	0.667	0.317	0.017
<u>PHARMGKB_PARC:PA135270661</u>	0.611	0.389			
<u>SHGC:R24</u>	0.430	0.570			
<u>SNP500CANCER:AFR1</u>	0.792	0.208	0.667	0.250	0.083
<u>SNP500CANCER:CAUC1</u>	0.435	0.565	0.290	0.290	0.420
<u>SNP500CANCER:HISP1</u>	0.478	0.522	0.217	0.522	0.261
<u>SNP500CANCER:PI</u>	0.539	0.461	0.366	0.347	0.287
<u>SNP500CANCER:PAC1</u>	0.478	0.522	0.304	0.348	0.348

TNF α -308 (rs1800629) Alelos observados: A y G. Alelo ancestral: G

Población	Alelos (INDET)	Alelos A	Alelos G	Genotipos A A	Genotipos A G	Genotipos G G
Controles del Noreste de México		0.04	0.96	0.0	0.06	0.93
CSHL-HAPMAP:HapMap-CEU		0.217	0.783		0.433	0.567
CSHL-HAPMAP:HapMap-HCB		0.044	0.956		0.089	0.911
CSHL-HAPMAP:HapMap-JPT		0.022	0.978		0.044	0.956
CSHL-HAPMAP:HapMap-YRI		0.067	0.933		0.133	0.867
<u>EGP_SNPS:AAM GENO PANEL</u>		0.142	0.858	0.017	0.250	0.733
<u>EGP_SNPS:CEU GENO PANEL</u>		0.217	0.783		0.433	0.567
<u>EGP_SNPS:CHB GENO PANEL</u>		0.033	0.967		0.067	0.933
<u>EGP_SNPS:HSP GENO PANEL</u>		0.033	0.967		0.067	0.933
<u>EGP_SNPS:JPT GENO PANEL</u>		0.022	0.978		0.044	0.956
<u>EGP_SNPS:PDR90</u>		0.075	0.925	0.025	0.100	0.875
<u>EGP_SNPS:YRI GENO PANEL</u>		0.068	0.932		0.136	0.864
<u>FHCRC:POPU1</u>	0.050	0.100	0.850			
<u>ILLUMINA:CEU</u>		0.217	0.783		0.433	0.567
<u>ILLUMINA:CHB</u>		0.033	0.967		0.067	0.933
<u>ILLUMINA:JPT</u>		0.023	0.977		0.045	0.955
<u>ILLUMINA:YRI</u>		0.061	0.939		0.123	0.877
<u>KRIBB_YJKIM:KHP1</u>		0.050	0.950	unknown	0.100	0.900
<u>PGA-UW-FHCRC:AAM GENO PANEL</u>		0.123	0.877	0.018	0.211	0.772
<u>PGA-UW-FHCRC:CEU GENO PANEL</u>		0.218	0.782		0.436	0.564
<u>PGA-UW-FHCRC:CHB GENO PANEL</u>		0.033	0.967		0.067	0.933
<u>PGA-UW-FHCRC:HSP GENO PANEL</u>		0.019	0.981		0.038	0.962
<u>PGA-UW-FHCRC:JPT GENO PANEL</u>		0.023	0.977		0.047	0.953
<u>PGA-UW-FHCRC:PGA-AFRICAN-PANEL</u>		0.205	0.795	0.045	0.318	0.636
<u>PGA-UW-FHCRC:PGA-EUROPEAN-PANEL</u>		0.182	0.818		0.364	0.636
<u>PGA-UW-FHCRC:YRI GENO PANEL</u>		0.068	0.932		0.136	0.864
<u>PHARMGKB_PARC:PA135299591</u>		0.107	0.893			

AAT Glu264Val S "S" A1A rs17580 (rs455519139). Allelos: A/T, Alelo ancestral: A

Población	Grupo de individuos	No. De cromosomas	A/A	A/T	HWP	A	T
Controles	Noreste de México	208	0.971	.029		0.99	0.01
WIAF-CSNP-MITOGPOP4		38				0.975	0.025
HapMap-CEU	European	114	0.930	0.070	1.000	0.965	0.035
HapMap-HCB	Asian	90	1.000			1.000	
HapMap-JPT	Asian	90	1.000			1.000	
HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	1.000			1.000	
CEPH		184				0.920	0.080
HapMap-CEU	European	120	0.900	0.100		0.950	0.050
HapMap-HCB	Asian	90	1.000			1.000	
HapMap-JPT	Asian	90	1.000			1.000	
HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	1.000			1.000	

Alfa 1 antitripsina alelo Glu342Lys "Z" (E366K) rs28929474

Población	Alelos A	Alelos T	Genotipos A T	Genotipos T T
Controles del Noreste de México		1.000		1.000
CSHL-HAPMAP:HapMap-CEU	0.050	0.950	0.100	0.900
CSHL-HAPMAP:HapMap-HCB		1.000		1.000
CSHL-HAPMAP:HapMap-JPT		1.000		1.000
CSHL-HAPMAP:HapMap-YRI		1.000		1.000

Anexo 9. Carta de consentimiento informado para pacientes



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

ESTUDIO: Análisis de moduladores de la respuesta pulmonar inflamatoria en Fibrosis Quística

INSTITUCIONES PARTICIPANTES:

- Centro de Biotecnología Genómica (CBG). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Reynosa, Tamps.
- Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM). Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas (CEPREP). Hospital Universitario “José Eleuterio González”. Monterey, N.L.

INVESTIGADORES PARTICIPANTES:

- Dra. Adriana Bustamante Sáenz. Neumóloga pediatra. Responsable de la Unidad de Fibrosis Quística del CEPREP.
- M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez. Estudiante de del programa de Doctorado en Ciencias, con especialidad en Biomedicina y Biotecnología Molecular.
- Dra Rocío Ortiz López. Responsable del área de Diagnóstico Molecular de la UDM y asesor externo de tesis.
- Dr. Miguel Angel Reyes López. Coordinador del área de Posgrado del CBG y asesor interno de tesis.

Introducción

Usted (en referencia a su hijo (a)) está siendo invitado a participar en un estudio de investigación. Este formulario de consentimiento le proporciona información acerca del estudio de investigación que le será explicado. Usted debe conocer la finalidad, el tipo de muestras biológicas que se requerirán así como su proceso de obtención. De la misma manera, se le debe explicar, de la manera más sencilla posible, el tipo de análisis genéticos y otros estudios que se realizarán, así como sus posibles riesgos y beneficios. Le pedirán que lea este formulario de consentimiento y que le consulte al médico o al personal del estudio que le expliquen las palabras o la información que no entienda. Una vez que comprenda el estudio y si decide que desea participar, le pedirán que firme este formulario de consentimiento. Le entregarán una copia para que la guarde en su poder.

Elegibilidad

Planeamos estudiar pacientes con diagnóstico positivo de Fibrosis Quística (confirmado mediante pruebas genéticas o con cuadros clínicos fuertemente sugestivos). Se le está solicitando a usted o a su hijo(a) a participar en este estudio porque se le ha diagnosticado Fibrosis Quística.

Antecedentes

La Fibrosis Quística es una enfermedad de origen genético que se manifiesta por producir un cuadro pulmonar inflamatorio crónico, con un grado variable de severidad, en la que además pueden estar involucrados otros órganos como el páncreas.

La enfermedad se produce debido a la presencia de un cambio genético denominado mutación, en la secuencia de DNA (molécula que se encuentra en el núcleo de las células y que contiene la información responsable de nuestras características físicas), específicamente en el gen de la Fibrosis Quística. Actualmente, existen más de 1400 mutaciones reportadas en el mundo.

En el CEPREP, se canaliza a los pacientes a la Unidad de Diagnóstico Molecular para encontrar la mutación presente en el paciente (tomando en cuenta que se analizan las 36 mutaciones más frecuentes de las más de 1400 reportadas), que se detecta en un 50% de los casos.

Sin embargo, nos llama la atención que aún en pacientes que con el mismo tipo de mutación se presenten cuadros clínicos muy variables, que van desde pacientes estables hasta cuadros pulmonares graves. Esto podría deberse a que todos, en nuestro DNA, tenemos pequeñas variaciones normales, que sin embargo, nos hacen responder de manera distinta a una enfermedad, o a un fármaco. Investigadores en Fibrosis Quística piensan que para comprender la enfermedad, debemos estudiar no sólo las mutaciones en el gen de la Fibrosis Quística, sino a otros genes que puedan influir en la gravedad de la enfermedad. A estos genes se le denomina Genes modificadores o moduladores.

Objetivo del proyecto

El objetivo de este trabajo de investigación es analizar en los pacientes con Fibrosis Quística, las variaciones genéticas en estos genes modificadores, así como medir ciertas sustancias relacionadas a estos genes en las esputo (flema o secreciones pulmonares) y en sangre. Además, se realizará una detallada descripción de los aspectos clínicos de cada paciente. Estos análisis también se llevarán a cabo en personas sanas como referencia, de manera que al final del trabajo de investigación, comprenderemos mejor la enfermedad, y la información obtenida, servirá para en un futuro diseñar tratamientos especiales para cada paciente.

Procedimientos

Si toma la decisión de participar en este proyecto, el paciente podrá seguir con su rutina normal de tratamiento y seguimiento clínico, y deberá acudir cuando el médico se lo solicite, para el seguimiento del estudio.

Si está de acuerdo, nosotros obtendremos de usted la siguiente:

1. Historial clínico. edad, sexo, presencia o ausencia de insuficiencia pancreática o diabetes mellitus, capacidad pulmonar, uso de: antibióticos y otros fármacos inhalados u orales, y alguna otra información relevante de su expediente clínico.
2. Se requerirá muestra de sangre de una vena del brazo y se recolectará en 2 tubos (uno con anticoagulante, y uno sin anticoagulante).
3. Para obtener la muestra de esputo se pedirá al paciente a que arroje la expectoración en un vaso de polipropileno estéril.

Riesgo/beneficio

1. El paciente puede presentar alguna molestia durante la toma de muestras:
 - a) La introducción de la aguja para la toma de sangre puede provocar una molestia, puede ocasionar una lesión pequeña o moretón, o una remota posibilidad de infección en el sitio de la punción. El paciente puede sentir mareo o desvanecimiento durante el proceso de toma de muestra.
 - b) Para el proceso de toma de esputo, puede presentarse alguna dificultad para respirar o cualquier otra molestia. Si lo considera necesario el proceso podrá ser interrumpido.
3. El paciente podrá, si lo desea, tener acceso a los resultados, los cuales sólo indicarán, si posee algunas variantes en su información genética que se asocian (mas no en el 100% de los casos, y en estudios hechos en poblaciones distintas a la nuestra) a signos y síntomas más severos.
4. La información obtenida no tendrá algún beneficio inmediato para el paciente, pero los resultados permitirán comprender el desarrollo de la enfermedad, y en un futuro, ayudar a diseñar tratamientos específicos para cada paciente.

Confidencialidad

- 1) Entendemos su inquietud de que la información generada pudiera afectar aplicaciones para seguro de vida y para trabajo, es decir, sufrir algún tipo de discriminación. Por estas razones, le aseguramos que cualquier información personal que nos proporcione y la información generada en el presente proyecto será mantenida con la máxima privacidad.
- 2) La información aquí recolectada será CONFIDENCIAL. La identidad de los participantes permanecerá en el anonimato, siendo cada paciente identificado mediante una clave.
- 3) La información recabada en este proyecto será incluida en la tesis Doctoral de la Estudiante M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez.
- 4) La información generada será presentada a otros colegas, mediante congresos, publicaciones científicas, etc., con el fin de divulgar los resultados y obtener un mayor beneficio para la comunidad médica e investigadores involucrados en el área, tomando siempre las medidas necesarias para mantener su identidad confidencial.

Almacenamiento de muestras biológicas.

Los participantes en este proyecto estamos solicitándole permiso para almacenar sus muestras biológicas las cuales serán utilizadas en futuros estudios de investigación científica. Sus muestras estarán marcadas con un código de identificación. Este código permitirá reconocer que usted fue el donador de la muestra.

Los bancos serán mantenidos en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de medicina de la U.A.N.L.

Cuestiones éticas.

Usted está firmando este consentimiento para comprobar ante los comités de ética que está completamente informado y de acuerdo en participar en este proyecto de investigación. Es probable que en algún momento los miembros del comité de ética busquen aprobación de los investigadores para ponerse en contacto con usted.

Costos y compensaciones.

1. Esta investigación estará soportada por las instituciones participantes. El paciente no requerirá hacer ninguna aportación económica.
2. Este proyecto de investigación tiene fines puramente científicos y nadie (incluyendo pacientes e investigadores participantes) recibirá compensación económica por participar.

Derechos del participante

La decisión de formar parte en este proyecto es voluntaria. Usted es libre de decidir si participa o no en este proyecto, o de retirarse en cualquier momento. Si usted decide retirarse, esta decisión no afectará su futura atención médica en esta institución.

Autorización y firma

Antes de firmar este formulario, por favor haga cualquier pregunta sobre cualquier aspecto de este estudio, o las partes del mismo que no le hayan quedado claras. Responderemos en forma completa todas las preguntas que usted tenga antes, durante o después del proyecto.

Yo _____ leí (o alguien me leyó) la información contenida en esta forma de consentimiento. Una de las personas a cargo del estudio me explicó lo que sucederá si yo participo (o si mi hijo(a) participa) en este estudio. Me hablaron en palabras y en un idioma que puedo comprender. Tuve la oportunidad de hacer todas mis preguntas a las personas encargadas de este proyecto y me dieron todas las respuestas que necesito.

Me dijeron que me están invitando (o están invitando a mi hijo(a)) a participar en este proyecto de investigación. Me informaron la finalidad, los procedimientos y los posibles riesgos y beneficios.

Acepto de voluntad propia participar (o permitir que mi hijo(a) participe) en este estudio de investigación. Esto significa que leí este documento y que comprendo lo descrito en él, y me comprometo a regresar al consultorio para cumplir con las visitas y tomas de muestras necesarias.

Me explicaron que no estoy obligado (o que mi hijo(a) no está obligado(a)) a participar en este proyecto, y aunque decida participar yo puedo retirarme del estudio, sin afectar mi atención médica.

Estoy dispuesto a cumplir con las instrucciones de los investigadores. Así mismo, autorizo a las personas que realizan este proyecto a que utilicen tanto los datos proporcionados por mí, como las muestras que fueron donadas, para realizar las investigaciones que se consideren necesarias, dentro de este proyecto, como de proyectos futuros, en el entendido de que mi identidad (o la identidad de mi hijo(a)) será mantenida en absoluta confidencialidad en todo momento.

Mi firma en este documento no significa que estoy renunciando a ninguno de mis derechos legales (o a los derechos legales de mi hijo(a)) e indica que he decidido formar parte de este proyecto y he entendido la información proporcionada y explicada personalmente. Además, me entregarán una copia firmada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma de quien obtuvo el consentimiento informado

Fecha

Anexo 10. Cuestionario clínico para pacientes



CUESTIONARIO CLÍNICO FIBROSIS QUÍSTICA

Fecha: _____ Nombre del paciente: _____

DATOS PERSONALES

Sexo: M F. Edad _____ Fecha de nacimiento _____
dd/mm/aaaa

Lugar de nacimiento: _____
Estado País

Dirección

Calle No. Colonia C.P.

Municipio Estado. País Teléfono

DATOS CLÍNICOS

Edad de diagnóstico clínico _____

Primer signo sugestivo de Fibrosis Quística _____

Prueba de electrolitos en sudor (iontoforesis)

_____ Positiva _____ Negativa _____ No se realizó

Diagnóstico genético: _____ Sí resultado: _____
_____ No

Enfermedad respiratoria

Tos productiva frecuente _____ Sí _____ No

Edad de comienzo _____

Infecciones respiratorias diagnosticadas:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	_____	Sí _____	No _____
<i>Staphylococcus aureus</i>	_____	Sí _____	No _____
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	_____	Sí _____	No _____
<i>Burkholderia cepacia</i>	_____	Sí _____	No _____
Viral	_____		
Otros	_____		

Capacidad pulmonar

FEV1 _____ Fecha _____

FVC _____ Fecha _____

Insuficiencia Pancreática _____ Sí _____ No _____

Ileo Meconial _____ Sí _____ No _____

Enfermedad hepática _____ Sí _____ No _____

Insuficiencia cardiaca (cor pulmonale)

_____ Sí _____ No _____

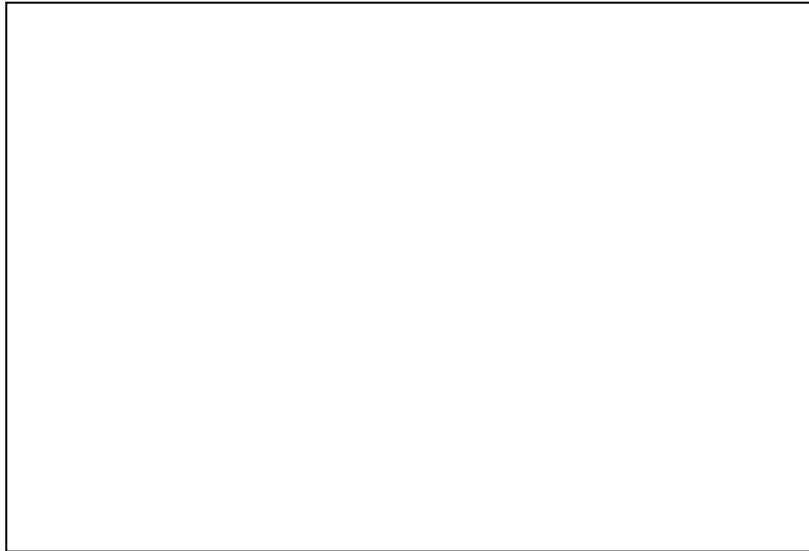
Otras pruebas clínicas realizadas:

Observaciones 1:

Status socioeconómico: _____

Observaciones 2:

Arbol genealógico. Indique con un asterisco(*) y numere los individuos que van a ser estudiados. En la parte inferior escriba los nombres completos y fechas de nacimiento (incluya embarazos en curso, abortos, matrimonios consanguíneos, y fecha de la última menstruación.).



Elaboró _____

Nombre y firma

Lugar _____ Fecha _____

Anexo 11. Carta de consentimiento informado para testigos

Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM). Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L.

El objetivo de recolectar muestras de sangre de personas sanas es establecer un banco de muestras de DNA que nos permitirán efectuar análisis genéticos de prevalencia en población sana.

- Se requerirá muestra de sangre de una vena del brazo y se recolectará en un tubo con anticoagulante. El voluntario puede presentar alguna molestia durante la toma de muestras: La introducción de la aguja para la toma de sangre puede provocar una molestia, puede ocasionar una lesión pequeña o moretón, o una remota posibilidad de infección en el sitio de la punción. El voluntario puede sentir mareo o desvanecimiento durante el proceso de toma de muestra.
- El voluntario deberá llenar un cuestionario. Si así lo desea, podrá tener acceso a los resultados generados de su muestra, para lo cual deberá proporcionar los datos correctos donde se le pueda localizar.
- La información derivada de las muestras será CONFIDENCIAL. La identidad de los participantes permanecerá en el anonimato, siendo cada voluntario identificado mediante una clave. La información generada será presentada mediante congresos, publicaciones científicas, etc., con el fin de divulgar los resultados y obtener un mayor beneficio para la comunidad médica e investigadores involucrados en el área.
- Estamos solicitándole permiso para almacenar sus muestras biológicas las cuales serán utilizadas en futuros estudios de investigación científica. Los bancos serán mantenidos en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de medicina de la U.A.N.L.
- Usted está firmando este consentimiento para comprobar ante los comités de ética que está completamente informado y de acuerdo en participar. Es probable que en algún momento los miembros del comité de ética busquen aprobación de los investigadores para ponerse en contacto con usted.
- Este proyecto de investigación tiene fines puramente científicos y nadie (incluyendo voluntarios e investigadores participantes) recibirá compensación económica por participar.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma de quien obtuvo el consentimiento informado

Fecha

Anexo 12. Cuestionario clínico para testigos

CUESTIONARIO CLÍNICO

Fecha: _____ Nombre: _____

DATOS PERSONALES

Sexo: M F. Edad _____ Fecha de nacimiento _____
dd/mm/aaaa

Lugar de nacimiento: _____
Estado País

Lugar de nacimiento del padre: _____

Lugar de nacimiento de la madre: _____

Dirección

Calle No. Colonia C.P.

Municipio Estado País Teléfono

Celular _____ correo electrónico _____

Antecedentes personales marque con una X

	Si	No	Antecedentes fam
Tabaquismo			
Alcoholismo			
Hepatitis			
Alergia			
Especifique			
Asma			
Infecciones respiratorias frecuentes			
Infecciones intestinales frecuentes			
Diabetes			
Hipertensión			
Cáncer			
Especifique			
Cardiopatías			
Otro padecimiento crónico especifique			
Padecimiento genético familiar especifique			
Drogas			
Tratamiento crónico, especifique			

Deseo que cualquier información obtenida de mi muestra que se considere pertinente, me sea comunicada Si _____ No _____

Firma

Anexo 13. Productividad Científica durante el período del doctorado y actividades científicas relacionadas

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

CONACYT Convocatoria de investigación científica básica 2006

Comité: Medicina y Ciencias de la Salud

Mod: P1

Proyecto: 000000000062291

Título del proyecto: ANÁLISIS DE GENES MODULADORES EN FIBROSIS QUÍSTICA Y SU CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Responsable técnico: Miguel Angel Reyes Lopez

Institución: INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

PAICYT 2007.

No. De programa: 68.

Título del proyecto: Análisis de mediadores inflamatorios en pacientes con Fibrosis Quística.

Nombre del investigador: Dra. Rocío Ortiz López

TRABAJOS PUBLICADOS

1. **Celia Nohemí Sánchez-Domínguez**, Rocío Ortiz-López, Adriana Bustamante-Sáenz, Miguel Ángel Reyes-López (2006). Tras las pistas de la Fibrosis Quística. *Conversus*. Instituto Politécnico Nacional. 51:32-28.
2. **Sanchez-Dominguez, C.N.**, Buenfil-Lozano, J.A., Molina-Guajardo, C.A., Borjas-Almaguer, O.D., Castillo-Lartigue, A., Bustamante-Saenz, A., Martinez-Rodriguez, H.G., Alarcon, M.A., Reyes-Lopez, M.A. and Ortiz-Lopez, R., 2008. Frequency of S and Z alleles for alpha-1-antitrypsin and tumor necrosis factor alpha -308 promoter polymorphism in northeastern Mexico. *Allergy Asthma Proc* 29, 406-10.

FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

1. Elsa Nancy Garza Treviño. Febrero del 2007. Asesora. Polimorfismos del gen MBL2 en controles sanos y pacientes con lupus eritematoso generalizado. Grado de Licenciatura de Químico Clínico Biólogo. Facultad de Medicina, U.A.N.L.

2. Entrenamiento de personal, estudiantes de licenciatura (verano de la investigación científica) y posgrado

Est. mcp Omar David Borjas Almaguer

Est. mcp Abraham Castillo Lartigue

Est. mcp José Antonio Buenfil Lozano

Est. mcp Carlos Alejandro Molina Guajardo

DISTINCIONES

1. Primer Lugar en el concurso de trabajos libres en el 7° Congreso internacional de estudiantes de medicina con el trabajo: “Frecuencia de los alelos S y Z en el gen de la Alfa 1 Antitripsina (AAT) en población sana del Noreste de México”. Fac. de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. 17-19 de Mayo del 2007.
2. Secretaria de la primera Mesa Directiva de Egresados del Área Básica del Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL, período 2007-2008.

SEMINARIOS, CURSOS Y CONFERENCIAS IMPARTIDOS

1. Seminario: “Análisis de Moduladores de la Respuesta Pulmonar en Fibrosis Quística”. Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Cd. Reynosa, Tamps., México. 19 de Octubre del 2005.
2. Participación como profesor con el tema “Genes moduladores de la respuesta pulmonar inflamatoria en Fibrosis Quística”. En el curso Teórico Pre-congreso “Genética Huana y Bioética”. Auditorio No. 6 de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México. 14 al 16 de Noviembre del 2005.
3. Fibrosis Quística (Avances). Centro de Biotecnología Genómica (IPN). Reynosa Tamaulipas. 31 de Mayo del 2006.
4. Coordinadora del XVIII Curso Internacional Teórico-Práctico “Herramientas proteómicas Parte I: principios básicos y aplicaciones”. Depto. De Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L. México. 9-13 de Octubre del 2006.
5. Seminario: “Avances en los estudios de Fibrosis Quística”. Ciclo de seminarios del centro de Biotecnología Genómica. Reynosa Tamps. 18 de Mayo del 2007.
6. Expositora en el IV Simposium “La tecnología y su aplicación en la investigación y el estudio de la medicina”. Universidad México Americana del Norte, con el trabajo “Diagnóstico molecular de pacientes con Fibrosis Quística”. Reynosa , Tamps. 24 de mayo de 2007.
7. Profesor invitado al Seminario de Investigación de Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL con la presentación “Fisiopatología y Genes Modificadores de la Fibrosis

Quística”. Auditorio del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la UANL, Monterrey, N.L. 29 de Abril del 2008.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS NACIONALES

1. **M.C. C.N. Sánchez Domínguez**, Dra. R. Ortiz López, Dra. A. Bustamante Sáenz, Dr. M. Reyes López. “Análisis de Moduladores de la respuesta pulmonar en Fibrosis Quística”. IV congreso Internacional y XV congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Morelia, Michoacán. 4-7 de abril del 2006
2. Est. Q.C.B. Elsa Nancy Garza Treviño, **M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**, Dra. Rocío Ortiz López. Dr. Miguel Villarreal, Ing. Alcorta Gaeza. Frecuencia de Polimorfismos en el exón 1 de la Lectina de Unión a Manosa en población Mexicana. 6to. Congreso de Estudiantes de Medicina, U.A.N.L. 12 AL 17 de Junio Del 2006.
3. **M.C. Celia Nohemí. Sánchez Domínguez**, Dra. Rocío Ortiz López, Dra. Adriana Bustamante Sáenz, Dr. Miguel Angel Reyes López. “Fibrosis Quística: Respuesta pulmonar mediante análisis de moduladores”. Biomonterrey 06, Congreso Internacional y exhibición de Biotecnología. Monterrey, N.L. CINTERMEX. 20-24 de septiembre del 2006.
4. **M.C. Celia Nohemí. Sánchez Domínguez**, Dra. Rocío Ortiz López, Dra. Adriana Bustamante Sáenz, Dr. Miguel Angel Reyes López. “Genes modificadores de la enfermedad pulmonar en Fibrosis Quística”. V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. México, D.F. 28 de Noviembre- 1 de Diciembre del 2006.
5. Est. mcp José Antonio Buenfil Lozano, Est. mcp Carlos Alejandro Molina Guajardo, **M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**, Dra. Rocío Ortiz López, Dra. Adriana Bustamante Sáenz, Dr. Miguel Ángel Reyes López. Frecuencia de los alelos S y Z en el gen de la Alfa 1 Antitripsina (AAT) en población sana del Noreste de México. 7° Congreso internacional de estudiantes de medicina. Fac. de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. 17-19 de Mayo del 2007.
6. Est. mcp Omar David Borjas Almaguer, Est. mcp Abraham Castillo Lartigue, **M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**, Dra. Rocío Ortiz López, Dra. Adriana Bustamante Sáenz, Dr. Miguel Ángel Reyes López Frecuencia de los alelos TNF1 y TNF2 del gen del Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF α) en población sana del Noreste de México. 7° Congreso internacional de estudiantes de medicina. Fac. de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. 17-19 de Mayo del 2007.
7. **C. N. Sanchez-Dominguez**, José Antonio Buenfil Lozano, Carlos Alejandro Molina Guajardo, Omar David Borjas Almaguer, Abraham Castillo Lartigue, M. A. Reyes-Lopez, A. Bustamante Saenz, Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, R. Ortiz-Lopez, Ma. del Carmen Villalobos Torres, Carlos Octavio Cancela Murrieta. Análisis de mutaciones en RCTFQ y genes modifiadores en pacientes con Fibrosis Quística. XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica y Horizontes de la Medicina. CINTERMEX, Monterrey, N.L. 29 Agosto al 1 de Septiembre del 2007.
8. **C. N. Sanchez-Dominguez**, E. N. Garza Treviño, A. Bustamante Saenz, R. Ortiz-Lopez, M. A. Reyes-Lopez,. Análisis de genes modifiadores en controles y pacientes con Fibrosis Quística. V Congreso Internacional, XVI Congreso Nacional de Ingeniería

Bioquímica, y VI Jornadas Científicas de Biotecnología Molecular y Biomedicina. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 10-14 de Marzo del 2008.

9. **Sánchez Domínguez Celia**, Rocío Ortiz López, Miguel Angel Reyes López, Adriana Esther Bustamante Sáenz. Análisis de mutaciones en el gen RCTFQ y polimorfismos de los genes MBL, IL 8, TNF Y AAT en pacientes con Fibrosis Quística. VI encuentro Nacional de Bioecnología del IPN. 21 al 24 de Octubre del 2008, Cd. Reynosa Tamps, México.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. **C. N. Sanchez-Dominguez**, M. A. Reyes-Lopez, R. Ortiz-Lopez, A. Bustamante Saenz. "Cystic fibrosis and modifier genes in mexican population". European Congress of Human Genetics 2007. 16-19 de Junio, 2007. Niza, Francia.
2. **C. N. Sanchez-Dominguez**, M. A. Reyes-Lopez, R. Ortiz-Lopez, A. Bustamante Saenz. CFTR mutation análisis and modifier genes in Mexican Population. 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference. Anaheim Convention Center, Anaheim California, USA. 3 al 6 de Octubre del 2007.
3. Bustamante A.E., Posadas Valay R., Torres Rodríguez J., **Sánchez Domínguez C.**, Mercado Longoria R. Effects of a pulmonary rehabilitation program in patient with cystic fibrosis. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida. 23 al 25 de Octubre del 2008.
4. **C.N. Sanchez Dominguez**, M.A. Reyes Lopez, A.E. Bustamante Saenz, M.C. Villalobos Torres, R. Ortiz Lopez. Modifier genes analysis in mexican cystic fibrosis patients. 58th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 11 al 15 de Noviembre del 2008.

ESTANCIAS

Estancia del 1 al 5 de abril del 2007 en el Children's Hospital de denver Colorado, con el Dr. Scott Sagel, encargadod e la clínica de Fibrosis Quística, conlka finalodad de entrenars en el manejo y porcesamiento de muestras de pacientes.

ASISTENCIA A CURSOS, CONGRESOS, TALLERES Y SEMINARIOS

1. Aplicaciones Clínicas de la Medicina Genómica. Octubre 24 y 25 del 2005. Auditorio No. 2 Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, UA.N.L. Monterrey, N.L. México.
2. Curso-Taller: Aprendizaje basado en el trabajo en equipo. Dentro del XXIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Cintermex, Monterrey, N. L. (México). 27 al 29 de Octubre del 2005.
3. Curso Teórico Pre-congreso "Genética Humana y Bioética". Auditorio No. 6 de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México. 14 al 16 de Noviembre del 2005.

4. XXX Congreso Nacional de Genética Humana, Hotel Holiday Inn. Monterrey, N.L. 16 al 19 de Noviembre del 2005 (32 hrs).
5. Cátedra Nacional de Medicina “Dr. Ignacio Chávez 2006”. Avances en la Medicina Genómica. Auditorio No. 4, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. 20-24 de Febrero del 2006. Duración: 20 horas.
6. IV Congreso Internacional y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Morelia, Michoacán. 4-7 de abril del 2006.
7. “Bioinformática y Medicina”. Auditorio del Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. 12 y 13 de Mayo del 2006.
8. 1er Foro institucional de formación de investigadores. Centro de Innovación educativa del IPN. Duración: 6 horas.
9. Curso-Taller PCR en Tiempo real: principios y Aplicaciones. Auditorio del Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Auditorio del Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. 25 y 26 de Mayo del 2006. Duración: 20 horas.
10. Biomonterrey 06, Congreso Internacional y exhibición de Biotecnología. Monterrey, N.L. CINTERMEX. 20-24 de septiembre del 2006.
11. European Congress of Human Genetics 2007. 16-19 de Junio, 2007. Niza, Francia.
12. V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. México, D.F. 28 de Noviembre- 1 de Diciembre del 2006.
13. XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica y Horizontes de la Medicina. CINTERMEX, Monterrey, N.L. 29 Agosto al 1 de Septiembre del 2007
14. “Innovative and Aggressive Control Strategies in Diabetes Management”. University of Texas Southwestern Medical Center. Monterrey, N.L. Dentro del marco de XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica y Horizontes de la Medicina. CINTERMEX, Monterrey, N.L. 31 de Agosto del 2007 (3.75 AMA PARA Category 1 Credits).
15. . 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference. Anaheim Convention Center, Anaheim California, USA. 3 al 6 de Octubre del 2007.
16. Taller Internacional “La aventura del descubrimiento al Mercado en las Ciencias de la Vida”. Monterrey, N.L. dentro de la Semana Global del desarrollo Basado en Conocimiento del Fórum Universal de las Culturas Monterrey 2007. 17 al 19 de Octubre del 2007.
17. 1er Curso Teórico Práctico PCR Cuantitativa en Biotecnología. Instituto de Biotecnología Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 26 al 19 de Febrero del 2008 (40 h).
18. V Congreso Internacional, XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, y VI Jornadas Científicas de Biotecnología Molecular y Biomedicina. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 10-14 de Marzo del 2008.
19. VI encuentro Nacional de Bioecnología del IPN. 21 al 24 de Octubre del 2008, Cd. Reynosa Tamps, México

20. XI Simposio Escenarios Futuros del ejercicio de la medicina en México. “Las epidemias emergentes de nuestro tiempo”. 25 de Octubre del 2008 (5 hrs).
21. Curso/ Taller Técnicas de comunicación Científica en Ciencias de la salud: Formación de Médicos, Residentes y Estudiantes de Medicina como estudiantes. Hotel Hacienda Cola de caballo, Santiago, N.L. 5 y 6 de Noviembre del 2008.
22. 58th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 11 al 15 de Noviembre del 2007.

CURSOS DE FORMACIÓN DOCENTE

1. Curso para la elaboración de exámenes de acuerdo a los lineamientos del Nacional Board of Examiners. Modalidad a distancia. Coordinación de Desarrollo Académico e Investigación Educativa. Facultad de Medicina de la U.A.N.L. 13-Marzo-23 de Junio del 2006. Actividad final: 7 de julio. 60 horas.

Frequency of S and Z alleles for alpha-1-antitrypsin and tumor necrosis factor alpha –308 promoter polymorphism in northeastern Mexico

Celia Nohemí Sánchez-Domínguez, M.Sc.,*# José Antonio Buenfil-Lozano,*
Carlos Alejandro Molina-Guajardo,* Omar David Borjas-Almaguer,* Abraham Castillo-Lartigue,
Adriana Bustamante-Sáenz, M.D.,§ Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez, Ph.D.,*
Miguel Ángel Villarreal Alarcón, Ph.D.,¶ Miguel Ángel Reyes-López, Ph.D.,# and
Rocío Ortiz-López, Ph.D.*

ABSTRACT

Diseases characterized by airway inflammation, excessive secretion, and obstruction affect a substantial proportion of the population. Studies for understanding the mechanisms underlying these processes are focused on the initiation and maintenance of inflammation. Polymorphisms on DNA sequence of response mediators such as alpha-1-antitrypsin (AAT) and tumor necrosis factor (TNF) alpha have the capacity to influence presentation of diseases, affecting protein amount and/or functionality, and can be analyzed as disease modulators. The purpose of this study was to analyze AAT S and Z alleles and –308G/A TNF-alpha polymorphism on the northeast Mexico mestizo population to compare the influence of these genes in several diseases. DNA samples from 103 volunteers (healthy group) were tested for modifier gene variants by polymerase chain reaction-RFLP as follows: AAT gene for S and Z alleles and TNF-alpha promoter –308G/A (TNF1/TNF2) alleles. Allele frequency for S and TNF2 alleles were 1.5 and 2.4%, respectively, whereas the Z allele was not detected. This study shows low frequencies of the AAT S and TNF2 alleles, and the Z allele was not found. Correlation studies in the future will allow to determine if these alleles have some influence in the clinical presentation of diverse diseases in this group of people.

(Allergy Asthma Proc 29:406–410, 2008; doi: 10.2500/aap.2008.29.3125)

Key words: AATS, AATZ, alpha-1-antitrypsin, polymorphisms, cytokines, Mexican population, PCR-RFLP, population genetics, TNF-1, TNF-2, tumor necrosis factor alpha polymorphism

Diseases characterized by inflammation affect a substantial proportion of the population. Studies for understanding mechanisms of disease are focused on the initiation and maintenance of the inflammation. Production of chemokines, cytokines, and growth factors in response to irritants, infectious agents, and inflammatory mediators may play an important role in the modulation of this process.¹ Based

on the current knowledge of the pathogenesis, response mediators can be analyzed as disease modulators.

Genetic polymorphisms have the capacity to influence the presentation of the diseases, affecting amount and/or functionality of their products, as well as the host answer to drugs. The polymorphisms include single base substitutions (single nucleotide polymorphisms [SNPs]), multibase deletions or insertions at a small scale (DIPs), and repeat variations (short tandem repeats). Polymorphism analysis comprises exons, regulatory regions, intron–exon joins, consensus regions, and promoter regions.^{2–4}

Polymorphisms in regulatory and coding regions of cytokine genes have been associated with susceptibility to a number of complex disorders. Two important inflammatory response mediators are α -1-antitrypsin (AAT; SERPINA1, OMIM# 107400) and tumor necrosis factor (TNF) alpha (CACHECTIN, OMIM # 191160). AAT is the most abundant serine protease inhibitor in human plasma. AAT inhibits a broad range of serine proteases, including trypsin, collagenase, and its main target elastase, which is released from neutrophils. The primary physiological role of AAT appears to be pro-

From the *Biochemistry Department, School of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, #Centro de Biotecnología Genómica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México, §Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas (CEPREP), Hospital Universitario Monterrey, Nuevo León, México, and ¶Rheumatology Department, Hospital Universitario, Monterrey, Nuevo León, México

Presented at the scientific meetings of V Scientific Journeys in Biomedicine and Molecular Biotechnology, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, México D.F., April 23–27, 2007; 7th International Congress for Medicine Students, School of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, May 17–19, 2007 (First Place); European Congress of Human Genetics 2007, Nice, France, June 16–19, 2007; 2007 North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, October 3–6, 2007

Address correspondence and reprint requests to Rocío Ortiz-López, Ph.D., Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero and Eduardo Aguirre Pequeño, Miras Centro, Monterrey, Nuevo León, 64460, Mexico
E-mail address: rortiz@fjm.uanl.mx

Copyright © 2008, OceanSide Publications, Inc., U.S.A.

tection of the lower respiratory tract from attack by neutrophil elastase. This gene is known to be highly variable and a number of protein variants have been characterized by isoelectric focusing.⁵ The most common genetic variant of AAT is the M type, characterized by normal serum levels of AAT. S and Z variants (Glu264Val and Glu342Lys) are associated with AAT deficiency. This deficiency leads to accelerated elastin degradation and loss of ventilatory function. Although some individuals with AAT deficiency are asymptomatic, the condition often leads to deterioration of lung function in adults and is associated with emphysema, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchitis, pneumonia, and other respiratory diseases.⁶⁻¹⁰ Proteomic analysis in nasal lavage fluid from patients with seasonal allergic rhinitis showed that the levels of an acidic form of AAT were higher in seasonal allergic rhinitis patients than in controls.¹¹ Cystic fibrosis (CF) patients with AAT deficiency became chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa* at an earlier age, although this did not lead to poorer lung function.¹²

In contrast, TNF- α is a potent modulator of the immune and inflammatory responses with functions related to leukocytes adhesion and migration, hematopoiesis and lymphocytes development, induction of other cytokines, and activation of macrophages and immune response.^{13,14} Levels of TNF- α had been measured to monitor inflammatory response treatment. For example, TNF- α and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) was measured in mild atopic asthmatic children and a control group to investigate the anti-inflammatory response of montelukast. Results showed that montelukast improves clinical parameters and anti-inflammatory response by decreasing serum sIL-2R and TNF- α levels.¹⁵ TNF- α values in exhaled breath condensate could be useful for monitoring the asthmatic airway condition; this was established by means of the correlation with the degree of airway responsiveness and variability of peak expiratory flow.¹⁶

The TNF- α gene is located within the major histocompatibility complex class III region in chromosome 6. The gene contains several polymorphic sites, including microsatellites and some SNPs at the promoter region, of which seven are described at positions -1031T>C, -863C>A, -857C>T, -376G>A, -308G>A, -238G>A, and -163G>A.¹⁷ The -308G/A position is the most studied variant, and the most frequent in white populations. The mutant -308A (TNF2) allele seems to be a stronger transcriptional activator and is associated with a higher level of TNF- α expression.¹⁸ TNF- α may contribute to childhood asthma and those associations may be modified by parental smoking.¹⁹ In children with CF, the forced expiratory volume in 1 second and weight were lower in the group with the TNF2 allele, suggesting that inflammation in CF contributes to

tissue damage.²⁰ It also has been related to other disorders such as rheumatoid arthritis, periodic fevers, or autoinflammatory syndromes.²¹ In this study, S and Z alleles for AAT and -308 TNF- α polymorphism were analyzed in a healthy northeast Mexico population, to compare in future studies, if these alleles have some influence in the clinical presentation of diverse diseases.

MATERIALS AND METHODS

Selection of Participants

One hundred three blood samples were collected from unrelated healthy community mestizo northeast Mexico residents who entered the Hospital Universitario (Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico) for a health checkup, from voluntary students, and from personnel from the School of Medicine (Universidad Autónoma de Nuevo León). All of them (three generations) were born northeast of Mexico (Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila, or San Luis Potosí). They were enrolled by a survey. A questionnaire and informed consent was signed for each participant. DNA was extracted using the phenol chloroform method, reported elsewhere.

Polymerase Chain Reaction (PCR)-RFLP Analysis

DNA samples were tested for modifier gene variants by PCR-RFLP. For AAT variant analysis has been used a modified method reported by Sandford *et al.*²² PCR was performed in 25 μ L containing 250 ng of genomic DNA. For the AAT S allele PCR reaction was 1 μ M of each primer, 0.2 mM of dNTPs, 2 mM of MgCl₂ and 2.5 U of Taq DNA Polymerase (Promega). PCR reaction for AAT Z was 0.5 μ M of each primer, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, and 2.5 U of Taq DNA Polymerase. Amplification conditions for AAT S and Z alleles were 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. PCR AAT S and Z allele products were digested with *Taq* I (New England Biolabs) overnight at 65°C.

A modified method reported by Chen *et al.*¹⁸ has been used for TNF1/2 alleles. PCR was performed in 25 μ L containing 250 ng of genomic DNA, 0.5 μ M of each primer, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, and 2.5 U of Taq DNA Polymerase (Promega). Amplification conditions were 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 61°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. PCR products were digested with *Nco* I (New England Biolabs) overnight at 37°C. All of the digestions were run on 3% agarose gels, stained with ethidium bromide, and analyzed in a gel documentation system (UVP model M-26; Upland, CA).

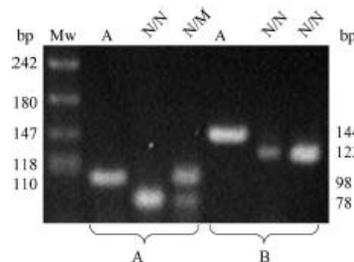


Figure 1. PCR-RFLP analysis of S (A) and Z (B) alleles. Mw, molecular weight marker; A, amplified product; M, mutant allele, N, normal allele.

Statistical Analysis

Hardy-Weinberg equilibrium of AAT S, AAT Z, and TNF1/2 alleles was assessed using the chi-square statistics.

RESULTS

Study Group Characteristics

Mean age of this study group was 25.94 ± 7.65 years, and 80% of this group were women. Most of them were from Nuevo León (81.5%), and the rest of them were from Tamaulipas (8.7%), Coahuila (5.8%), and San Luis Potosí (3.9%).

We calculated the Hardy-Weinberg equilibrium to determine if the frequency of genotypes and the frequency of alleles are said to be at "genetic equilibrium." All of the three polymorphisms were in the Hardy-Weinberg equilibrium in the analyzed sample.

Analysis of AAT S, AAT Z, and TNF α Alleles

For PCR-RFLP analysis, the S allele PCR produces a 98-bp product and introduces a *Taq* I restriction site into the wild-type M allele but not into the mutant S allele. The M allele produces 78 + 20-bp fragments, whereas the mutant S allele remains uncut (98 bp; Fig. 1). The Z allele PCR generates a 144-bp product and introduces a *Taq* I restriction site into the wild-type M allele but not into the mutant Z allele. The M allele produces 123 + 21-bp fragments, whereas the mutant

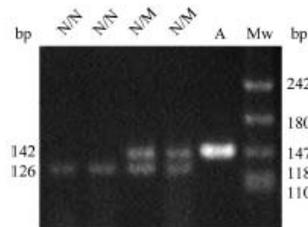


Figure 2. PCR-RFLP analysis of TNF1/2 alleles. Mw, molecular weight marker; A, amplified product; M, mutant allele; N, normal allele.

Z allele remains uncut (Fig. 1). From the 103 analyzed samples, allele S frequency was 1.5%. The genotypes detected were heterozygotes S/M. The Z allele was not detected.

PCR for TNF- α generates a 142-bp product. *Nco* I digestion of the amplicons produce 126 + 16-bp fragments for normal allele TNF1, whereas the mutant allele TNF2 remains uncut (Fig. 2). From the 103 analyzed samples, the TNF2 allele frequency was 2.4%. See Table 1 for a detailed description of genotype and allele frequencies.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this study, we analyzed the AAT S and Z alleles and TNF- α -308G/A polymorphism in a mestizo population from northeast Mexico. Samples were collected in Nuevo León. Populations have migrated to this state from the adjoining states (Tamaulipas, Coahuila, San Luis Potosí, and Zacatecas) for work or educational purposes, and genetic admixture of Nuevo León residents should be considered. A study made in 143 mestizos from northeast Mexico estimated the genetic admixture using 13 short tandem repeat loci. Results were that these population had 54.99, 39.99, and 5.02% of Spanish, Amerindian, and African ancestry,²³ respectively, which is similar to another study at the center of Mexico, which reported a mixture of 2.93, 56.22, and 40.85% for black, Indian, and whites populations, respectively.²⁴

Table 1 Genotype and allele frequencies of the AAT S, AAT Z, and TNF -308 loci in the study group

	AAT S					AAT Z					TNF -308				
	Genotype			Allele		Genotype			Allele		Genotype			Allele	
	MM	MS	SS	*M	*S	MM	MZ	ZZ	*M	*Z	1.1	1.2	2.2	*1	*2
No.	100	3	0	203	3	103	0	0	206	0	98	5	0	5	201
Percent	97.1	2.9	0.0	98.5	1.5	100	0.0	0.0	100	0.0	95.1	4.9	0.0	97.6	2.4

M = wild type; S and Z = mutant alleles for AAT; 1 = normal allele; 2 = mutant allele for TNF -308.

The importance of analyzing the frequency of these polymorphisms in the population is the influence in host defense mechanisms and diseases severity. AAT and TNF- α are two of the most studied genes for this purpose. Prevalence for the MS and MZ genotypes among white populations are 9 and 3%, respectively.²⁵ In our study, the MS frequency was lower (1.5%) than Caucasians, and the Z allele was not detected. There are no other reports for the Mexican population or disease association studies for the S or Z alleles and we can not conclude whether the frequencies in our group are significantly different from other healthy populations or disease groups. For the Hispanic population, AAT phenotypes were analyzed in Puerto Rican asthmatic children by isoelectric focusing, and they showed a significantly higher prevalence of variant phenotypes MS, MZ, and SS, among the asthmatic subjects compared with control children.²⁶ Puerto Ricans had a mixture of 80, 8, 0.4, and 0.2% for white, black, Amerindian, and Asian populations, respectively, and 10% of mixtures (www.lrc.salemstate.edu/hispanics/pbus/mundo/proceso.htm, ultimoreducto.com/etnias/america.htm).

In contrast, the TNF2 allele frequency in this study group was 2.5%. Another study performed using a Mexican population showed a frequency of 1.5% ($n = 198$).²¹ Genotype frequencies in our study group were of 95.1, 4.9, and 0% for GG, GA, and AA, respectively. An additional study in a white population showed that frequencies reached 70, 28, and 2% for GG, GA, and AA, respectively.²⁷ For TNF- α , our results are similar to other reports on the SNP database population diversity ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs = 1800629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800629)). Association studies for TNF- α promoter polymorphisms have been reported in Mexican populations and were found to have an association risk for diseases such as spondyloarthritis, chagas disease, arthritis, and lupus, as well as a relationship with high levels of lipids.²⁸⁻³³

Even when some studies did not find an association between AAT or TNF- α polymorphisms and diseases such as asthma,²⁷ some other studies showed a correlation between levels of TNF- α and treatment effectiveness. We believe that more multivariate analysis studies are needed to help clinicians to find new therapeutic approaches for the treatment of these inflammatory diseases. For example, blocking TNF- α activity has already shown outstanding efficacy in other chronic inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, Crohn's disease, and psoriasis.³⁴ The successful treatment of these other chronic inflammatory diseases provides hope that TNF- α inhibitors may be useful for the treatment of asthma. Recent developments in animal models and clinical trials in patients with severe asthma provide strong support for the concept that blocking TNF- α activity represents a new approach in asthma therapy.³⁵

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Biochemistry Department of the Faculty of Medicine-UANL, CEPREP, Asociación Regiomontana de Fibrosis Quística A.C., Instituto Politécnico Nacional, (IPN), Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI), Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for support given to this project.

REFERENCES

- Shelhamer JH, Levine SJ, Wu T, et al. NIH conference. Airway inflammation. *Ann Intern Med* 123:288-304, 1995.
- Davies JC, Gresenbach U, and Alton E. Modifier genes in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 39:383-391, 2005.
- Brookes AJ, Leivaslaiho H, Siegfried M, et al. HGBASE: A database of SNPs and other variations in and around human genes. *Nucleic Acids Res* 28:356-360, 2000.
- Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: Abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 190:9-25, 2002.
- Chappell S, Guetta-Baranés T, Batowski K, et al. Haplotypes of the alpha-1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. *Hum Mutat* 24:535-536, 2004.
- Sharp RR, de Serres F, Newman L, et al. Environmental, occupational, and genetic risk factors for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Environ Health Perspect* 111:1749-1752, 2003.
- Eden E, Hammel J, Rouhani FN, et al. Asthma features in severe alpha-1-antitrypsin deficiency: Experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest* 123:765-771, 2003.
- Piitulainen E, and Sveger T. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha (1)-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax* 57:705-708, 2002.
- Genuneit J, Weinmayr G, Radon K, et al. Smoking and the incidence of asthma during adolescence: Results of a large cohort study in Germany. *Thorax* 61:572-578, 2006.
- Dimeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha 1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 62:806-813, 2007.
- Ghafouri B, Irander K, Lindbom J, et al. Comparative proteomics of nasal fluid in seasonal allergic rhinitis. *J Proteome Res* 5:330-338, 2006.
- Döring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S, et al. Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for deltaF508. *Pediatr Pulmonol* 18:3-7, 1994.
- Aldallal N, McNaughto EE, Manzel LJ, et al. Inflammatory response in airway epithelial cells isolated from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1248-1256, 2002.
- Courtney JM, Ennis M, and Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3:223-231, 2004.
- Can M, Yüksel B, Demirtaş S, et al. The effect of montelukast on soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor alpha in pediatric asthma. *Allergy Asthma Proc* 27:383-386, 2006.
- Matsunaga K. The utility of exhaled breath condensate analysis for asthma management. *Rinsho Byori* 55:375-380, 2007.
- Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, et al. Association of TNF- α promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 12:2541-2546, 2003.
- Chen YP, Pfab T, Slowinski T, et al. Impact of genetic variation of tumor necrosis factor-alpha on gestational hypertension. *Chin Med J* 119:719-724, 2006.

19. Wu H, Romieu I, Sienna-Monge JJ, et al. Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 115:616–622, 2007.
20. Hull J, and Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 53:1018–1021, 1998.
21. Liz-Grana M, and Gomez-Reino Carnota JJ. Tumour necrosis factor. Genetics, cell action mechanism and involvement in inflammation. *Allergol Immunol Clin* 16:140–149, 2001.
22. Sandford AJ, Chagani T, Spinelli JJ, et al. Alpha1-antitrypsin genotypes and the acute-phase response to open heart surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1624–1628, 1999.
23. Cerda-Flores RM, Budowle B, Jin L, et al. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am J Hum Biol* 14:429–439, 2002.
24. Lisker R, Perez-Briceno R, Granados J, et al. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 71:203–207, 1986.
25. Hutchison DC. Epidemiology of alpha 1-protease inhibitor deficiency. *Eur Respir J Suppl* 9:29–34, 1990.
26. Colp C, Pappas J, Moran D, et al. Children with asthma Variants of alpha 1-antitrypsin in Puerto Rican. *Chest* 103: 812–815, 1993.
27. Louis R, Leyder E, Malaise M, et al. Lack of association between adult asthma and the tumor necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. *Eur Respir J* 16:604–608, 2000.
28. Vargas-Alarcón G, Casasola-Vargas J, Rodriguez-Perez JM, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum Immunol* 67:826–832, 2006.
29. Rodriguez-Perez JM, Cruz-Robles D, Hernandez-Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 98:97–102, 2005.
30. Rodriguez-Carreón AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun* 24:63–68, 2005.
31. Hernandez-Pacheco G, Flores-Domínguez C, Rodriguez-Perez JM, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease. *J Autoimmun* 21:59–63, 2003.
32. Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun* 2:363–366, 2001.
33. Parra-Rojas I, Ruiz-Madriral B, Martínez-López E, et al. Influence of the -308 TNF-alpha and -174 IL-6 polymorphisms on lipid profile in Mexican subjects. *Hereditas* 143:167–172, 2006.
34. Nash PT, and Florin THJ. Tumour necrosis factor inhibitors. *Med J Aust* 183:205–208, 2005.
35. Kim J, and Remick DG. Tumor necrosis factor inhibitors for the treatment of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 7:151–156, 2007. □



OceanSide Publications

IP: 148.204.124.250