



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

IDENTIFICACIÓN DEL ESPECTRO TOTAL DE MUTACIONES DEL GEN *CFTR* EN
PACIENTES MEXICANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. LARROSA CALDERÓN JULIETA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. ANGÉLICA GRACIELA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR:

DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO

CD. MX., AGOSTO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

OFICIO CPCB/750/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de abril de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LARROSA CALDERÓN JULIETA** con número de cuenta **309733232**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DEL ESPECTRO TOTAL DE MUTACIONES DEL GEN CFTR EN PACIENTES MEXICANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANGÉLICA GRACIELA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN
Vocal: DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA
Secretario: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
Suplente: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
Suplente: DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 18 de junio de 2019



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada que me permitió llevar a cabo mis estudios de maestría.

Agradezco a la Dra. Angélica Martínez por dirigir mi tesis, por sus consejos, paciencia y apoyo en todo momento.

Agradezco al Comité Tutorial (Dra. Lorena Orozco Orozco y Dra. Marisol López López) por sus valiosas aportaciones al proyecto de investigación.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE GRÁFICAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Fibrosis quística	3
Manifestaciones clínicas	3
Gen <i>CFTR</i>	5
Proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística .	6
Variantes en <i>CFTR</i>	7
Tratamiento de la FQ	10
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
METODOLOGÍA.....	15
Población de estudio.....	15
Procesamiento de las muestras	15
Identificación de variantes.....	16
Validación de variantes	16
Búsqueda en bases de datos y análisis “ <i>in silico</i> ”	17
Correlación genotipo-fenotipo	17
Análisis de supervivencia	17
RESULTADOS.....	18
Población de estudio.....	18
Detección de variantes.....	19
Correlación genotipo-fenotipo	24
Análisis de supervivencia.....	27

DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES.....	41
LITERATURA CITADA.....	42
ANEXO 1. CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura del gen *CFTR*.

Figura 2. Estructura de la proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR).

Figura 3. Árbol genealógico del paciente con la variante *de novo*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación funcional de las variantes en *CFTR*.

Tabla 2. Criterios considerados para la selección de la población de estudio.

Tabla 3. Tasas de detección por metodología de las variantes causales de FQ en 280 pacientes.

Tabla 4. Variantes identificadas en el gen *CFTR* en pacientes con FQ.

Tabla 5. Correlación fenotipo-genotipo.

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes del grupo 3 con al menos una variante leve.

Tabla 7. Panel de 25 variantes para la población mexicana.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución de edad de la población.

Gráfica 2. Distribución de edad de fallecimiento.

Gráfica 3. Análisis supervivencia.

Gráfica 4. Supervivencia por genotipo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMFQ: Asociación Mexicana de Fibrosis Quística

ASL: líquido aéreo superficial (del inglés, airway surface liquid)

ATP: adenosil trifosfato

CFTR: regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (del inglés, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

FQ: fibrosis quística

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

INMEGEN: Instituto Nacional de Medicina Genómica

IP: insuficiencia pancreática

MLPA: amplificación y ligación dependiente de sondas (del inglés, multiplex ligation-dependent probe amplification)

NV: nacidos vivos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)

SP: suficiencia pancreática

TDet: tasa de detección

TIR: tripsinógeno inmunorreactivo

VP: variantes patogénicas

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica con una incidencia de 1 en cada 3000 nacidos vivos (NV). En México, la incidencia estimada es de 1 en 8500 NV con una esperanza de vida de aproximadamente 18 años. Las principales manifestaciones clínicas de la FQ son: niveles elevados de cloruros en sudor, falla pancreática y enfermedad pulmonar progresiva con infecciones recurrentes en las vías respiratorias. Este padecimiento se presenta por variantes patogénicas en el gen *CFTR* que producen la pérdida o disminución de función de la proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística. A nivel mundial se han identificado más de 2,000 variantes en el gen *CFTR*. En México, los estudios realizados han identificado 48 variantes causales de FQ, con una tasa de detección del 77 % de los alelos. Sin embargo, aún existe una fracción de alelos desconocidos. En este trabajo se buscó identificar a las variantes causales de FQ en 280 pacientes mexicanos mediante mutagénesis dirigida (para la búsqueda de las variantes más frecuentes en la población: p.Ile507del, p.Phe508del, p.Gly542*, p.Ser549Asn y p.Asn1303Lys), secuenciación de segunda generación (NGS) y MLPA.

La tasa de detección obtenida fue del 85.4 % (mutagénesis dirigida 58.0 %, NGS 25.9 % y MLPA 1.4 %). De las 72 variantes identificadas, 24 no se habían reportado en la población mexicana y 13 son nuevas a nivel mundial (una *de novo*). La variante más frecuente fue p.Phe508del (46.0 %), otras 9 variantes se identificaron con una frecuencia >1.0 % y el resto son variantes raras (35 se identificaron en un solo individuo). Se realizó un análisis de correlación genotipo-fenotipo mediante la clasificación de las variantes en seis clases dependiendo de su efecto en la proteína con el que se observó una correlación entre los niveles de cloruros en sudor, insuficiencia pancreática y presencia de íleo meconial y las variantes que producen fenotipos graves (clases I-III). Finalmente, se hizo un análisis de supervivencia estratificando a los pacientes por cohortes de nacimiento y por genotipo. La mediana de supervivencia fue de 21 años para pacientes nacidos entre 1977 y 1992 y para las otras dos cohortes (1993 – 2002 y 2003-2012) se estimó en >30 años. Respecto al genotipo, los pacientes homocigotos p.Phe508del presentaron una menor probabilidad de supervivencia que aquellos con al menos una variante leve (clases IV-VI). La estrategia utilizada permitió una tasa de detección del 85.4 % aumentando el espectro de variantes patogénicas en México a 85, lo cual coloca a la población mexicana como una de las que presentan mayor heterogeneidad alélica a nivel mundial. Esto resalta la necesidad de una estrategia específica para el diagnóstico molecular de la FQ en nuestro país. Con base en las frecuencias obtenidas proponemos un panel de 25 variantes (tasa de detección del 75 %) que puede contribuir a mejorar el diagnóstico molecular de la enfermedad en nuestro país.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in Caucasian population affecting 1 in 3000 live newborns (LN). In Mexico, the incidence is 1 in 8500 LN, according to the estimates of the Mexican Cystic Fibrosis Association (AMFQ). CF is caused by pathogenic variants in the *CFTR* gene that produce the loss or diminish function of the cystic fibrosis transmembrane regulator protein. The lack of CFTR protein or its impaired function causes elevated sweat chloride levels, pancreatic failure, progressive respiratory disease and chronic pulmonary infections. To date, more than 2,000 variants have been reported for the *CFTR* gene. In México, 48 causal variants have been identified using different strategies for the screening of the *CFTR* gene, however only 77% of the CF alleles were detected. The goal of this study was to identify the whole spectrum of *CFTR* variants in mexican patients with CF. The analyzed cohort consisted of 280 patients with clinically confirmed CF diagnosis. The strategy for the identification of variants included site-directed mutagenesis (to detect the five more common variants in the population), whole sequencing of the *CFTR* gene by NGS and MLPA techniques.

The detection rate was of 85.4%; the screening for the 5 more frequent variants (p.Ile507del, p.Phe508del, p.Gly542*, p.Ser549Asn y p.Asn1303Lys) identified 58.0% of the CF alleles while 25.9% were detected by NGS and 1.4% by MLPA. Out of the 72 pathogenic variants identified, 24 had not been reported in Mexican population and 13 were worldwide new (one *de novo*). The most frequent variant was p.Phe508del (46.0%) and only 9 more variants had a frequency >1.0% while the rest were rare (35 were found in only one patient).

The patients were classified according to the functional consequence of the variants in classes I-VI and a genotype-phenotype correlation was made. This analysis revealed that chloride level, pancreatic failure and meconium ileus correlated with severe variants. Finally, the patients were stratified in birth cohorts and genotype for a survival analysis. The birth cohort 1977-1992 exhibited less survival probability than the older cohorts (1993-2002 and 2003-2012). When genotype was considered, the lowest survival probability was observed in patients homozygous for p.Phe508del, while the patients with at least one mild variant showed better survival estimates.

The strategy used accomplished a detection rate of 85.4%, expanding the pathogenic variant spectrum up to 85 variants with 13 novel variants identified for the first time. This report shows that Mexico is one of the countries with the highest allelic heterogeneity, which constitutes a challenge for the molecular diagnosis of CF in Mexican patients. We propose a panel of 25 variants that allows a detection rate of 75% which can help to improve the molecular diagnosis in our country.

INTRODUCCIÓN

Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ; OMIM #219700) es la enfermedad autosómica recesiva más común entre la población caucásica: afecta a 1 de cada 2,500 nacidos vivos en Europa y 1 de cada 3,500 en Estados Unidos. Es una enfermedad multisistémica cuyo defecto básico es la afección generalizada de las células epiteliales por impermeabilidad de la membrana apical al ión cloro, lo cual conduce a la presencia de secreciones exocrinas viscosas que alteran principalmente la función de los sistemas respiratorio, gastrointestinal, genitourinario y de las glándulas sudoríparas. El signo clínico más consistente es una concentración elevada de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) en sudor, por lo que la prueba clínica utilizada para el diagnóstico es la determinación de cloruros en sudor mayores que 60 mmol/l [1,2]

Históricamente, el primero en utilizar el término “fibrosis quística” fue el pediatra Guido Fanconi von Grebel para describir la asociación de insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar crónica en niños. Posteriormente se utiliza el término “mucoviscidosis”, por considerarlo un padecimiento no exclusivo del páncreas, sino una alteración generalizada en la producción de moco [3], y se describe el exceso de sal en el sudor de los pacientes [4]. En 1983 se demuestra una reducción en el transporte de cloro a través de la membrana apical de las células epiteliales [5]. Más adelante, entre 1985-1989 se identifica y se clona al gen *CFTR* como responsable de la enfermedad [6,7]. Finalmente, en 1990 se muestra la correlación entre los canales de cloro defectuosos y las variantes patogénicas (VP) en *CFTR* [8].

Manifestaciones clínicas

La FQ es una enfermedad compleja y extremadamente heterogénea cuyo fenotipo clásico se caracteriza por enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia pancreática (IP) exocrina y elevación de los niveles de cloro y sodio en sudor, que se presentan en el 90 % de los pacientes [9].

La enfermedad pulmonar crónica es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes. La patología pulmonar se caracteriza por inflamación, infecciones crónicas y bronquiectasias (i.e. dilataciones permanentes de la pared de los bronquios), cuyas complicaciones conducen al fallo respiratorio [9]. En la FQ existe una regulación anormal del líquido que recubre la vía aérea (ASL, por sus siglas en inglés), cuya composición y grosor es controlada a través de la absorción de sodio y secreción de iones cloruro. En las vías aéreas de pacientes con FQ, el ASL se encuentra deshidratado lo cual impide la limpieza mucociliar y la eliminación de infecciones bacterianas que se presentan de forma intermitente o crónica en la mayoría de los pacientes. Otro factor importante es, que la disminución en la secreción de bicarbonato (HCO_3^-) lleva a una reducción del pH (factor determinante de las propiedades viscoelásticas de la mucosa) lo que contribuye a la patofisiología pulmonar y a la incapacidad para eliminar infecciones [10]. Los microorganismos

típicamente involucrados en las infecciones crónicas de los pacientes son *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* [9].

A nivel gastrointestinal las manifestaciones más comunes son íleo meconial (i.e. obstrucción intestinal por meconio al nacer), síndrome de obstrucción intestinal distal e insuficiencia pancreática. Uno de los primeros síntomas asociados a la FQ es el íleo meconial que se observa en el 17% de los pacientes. En todo neonato con íleo meconial debe considerarse el diagnóstico de FQ dado que el 98% de los bebés que lo presentan tienen FQ [1,10]. En el páncreas la falta de secreción glandular resulta en destrucción de las glándulas al nacimiento [11]. El defecto en la secreción de HCO_3^- produce acidificación ($\text{pH} < 6.5$) del jugo pancreático lo que incrementa la viscosidad de la mucosa y disminuye la solubilidad de las enzimas digestivas. El 85 % de los pacientes presenta IP exocrina de manera temprana. Los pacientes que en cambio, presentan suficiencia pancreática (SP), tienen mayor sobrevida (20 años en promedio) que aquellos con IP [1].

La destrucción pancreática gradual causa deficiencia progresiva de insulina y culmina en diabetes relacionada con FQ, cuya prevalencia aumenta en proporción directa al aumento de la sobrevida y que puede presentarse de manera pasajera o crónica. Del 2.5 % al 12.0 % de los pacientes llegan a desarrollar diabetes (en promedio a los 24 años), sin embargo existe mayor prevalencia en los pacientes con VP clasificadas como graves (I-III) [1].

Algunos pacientes desarrollan enfermedad hepática, pero la mayoría no muestran signos o síntomas clínicos hasta etapas muy avanzadas. Esta variabilidad sugiere que existen otros fenómenos, tanto genéticos como ambientales que modifican y determinan las lesiones hepatobiliares [9].

El diagnóstico de FQ a través del tamiz neonatal depende de la identificación de niveles altos de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) en la sangre del neonato, seguida de análisis de ADN y medición de cloro en sudor [1]. Esta última se considera el estándar de oro para el diagnóstico de la FQ y se realiza por el método de iontoforesis cuantitativa con pilocarpina descrito por Gibson y Cooke [2]. Los resultados se interpretan de acuerdo con lo establecido por la Cystic Fibrosis Foundation (www.cff.org):

Positivo: ≥ 60 mmol/l positivo.

Dudoso: 40-59 mmol/l (o de 30-59 mmol/l en infantes de menos de 6 meses).

Negativo: < 40 mmol/l (o < 30 mmol/l en infantes de menos de 6 meses).

Para un diagnóstico definitivo se consideran dos pruebas positivas de cloruros y otros criterios clínicos como la presencia de enfermedad pulmonar y/o pancreática, historia familiar de la enfermedad y la detección de VP mediante análisis molecular en los dos alelos del paciente.

Gen *CFTR*

El gen *regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística* (*CFTR*, por sus siglas en inglés) se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31.2) y abarca una región de aproximadamente 216.7 kb considerando las regiones regulatorias río arriba y río abajo del gen necesarias para llevar a cabo su expresión [7,12]. La región codificante está conformada por 27 exones (Figura 1) y el transcrito maduro consta de 6,132 nucleótidos (NM_000492.3) con un marco abierto de lectura de 4,440 nucleótidos codificantes (NP_0.000483.3).

CFTR se expresa principalmente en células epiteliales de pulmones, tráquea, páncreas, hígado, intestinos y glándulas sudoríparas [12]. En menor medida se expresa en riñón, útero, ovarios, tiroides y glándulas salivales. También se han identificado distintas isoformas tejido-específicas generadas mediante procesos de splicing alternativo que, al excluir exones, resultan en proteínas trucas parcialmente funcionales [13].

Diversos estudios han mostrado que la región genómica de 3.8 kb río arriba del exón 1 presenta un alto contenido de GC (65 %), ausencia de caja TATA, múltiples sitios de inicio de la transcripción y varios sitios de unión de proteínas Sp1 y AP-1. También se han identificado elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), un sitio de unión a la proteína de unión al *enhancer* CCAAT (C/EBP) y varios elementos de respuesta a glucocorticoides [13], que se localizan en una región conservada en humano, ratón, rata, oveja, cerdo y vaca [14,15] y que son necesarios para que se lleve a cabo la transcripción del gen [16,17].

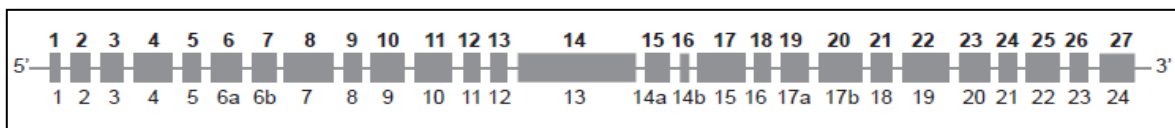


Figura 1. Esquema de la estructura del gen *CFTR*. Se presentan dos numeraciones de exones: la actual (superior, negritas) y la nomenclatura antigua (inferior) [18].

Proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística

La proteína codificada por *CFTR* se denomina proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR, por las siglas en inglés; Uniprot P13569) y forma parte de la superfamilia de transportadores de unión a ATP (superfamilia ABC); dado que dentro de la familia C es el miembro 7, también es conocida como ABCC7. Estas proteínas transportan una amplia variedad de sustratos dentro y fuera de las células a expensas de la hidrólisis de ATP. CFTR está compuesta por 1480 aminoácidos [7] organizados en cinco dominios: dos dominios transmembranales (MSD1 y MSD2, por sus siglas en inglés) cada uno compuesto por 6 hélices alfa que atraviesan la membrana; dos dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2, por sus siglas en inglés) y un dominio citosólico regulatorio (RD, por sus siglas en inglés). Estructuralmente, la proteína forma dos complejos MSD-NBD conectados mediante el dominio RD [19] (Figura 2). Dentro de la superfamilia ABC, CFTR es la única proteína que forma un canal iónico transmembranal; los demás miembros funcionan como transportadores activos [20].

La biosíntesis de la proteína CFTR requiere de transcripción en núcleo, traducción ribosomal y un proceso de maduración. Para que la proteína se pliegue correctamente se lleva a cabo una primera glicosilación en retículo endoplásmico, tras lo cual, la proteína es transportada por chaperonas al aparato de Golgi para una segunda glucosilación que completa la maduración. Del aparato de Golgi, CFTR es transportada en vesículas a la membrana apical de las células epiteliales donde ejerce su función [21].

La apertura y cierre del poro del canal se regula mediante dos procesos; el primero consiste en la fosforilación del dominio RD, que contiene múltiples sitios consenso de fosforilación (residuos de serina y treonina), por una proteína cinasa A dependiente de AMP-cíclico (PKA) lo cual produce la activación del canal; el segundo, implica la unión de ATP a los dominios citosólicos NBD1 y NBD2. En el estado no fosforilado, el dominio RD se localiza entre los dos dominios NBD impidiendo su interacción pero, tras la fosforilación, se produce un cambio conformacional que permite que los dominios NBD formen un dímero que lleva a cabo la hidrólisis de ATP y la subsiguiente apertura del canal para el transporte de los iones [22]. La selectividad del canal está dada mayormente por interacciones entre los aniones (cloruro principalmente, pero también se transportan otros iones como bicarbonato) y las cadenas laterales de los residuos localizados en la entrada del poro. Los grupos hidrofóbicos en este sitio tienen un papel determinante en las interacciones poro-anión y poro-agua, que son necesarias para la discriminación entre distintos aniones con base en su energía de hidratación [23].

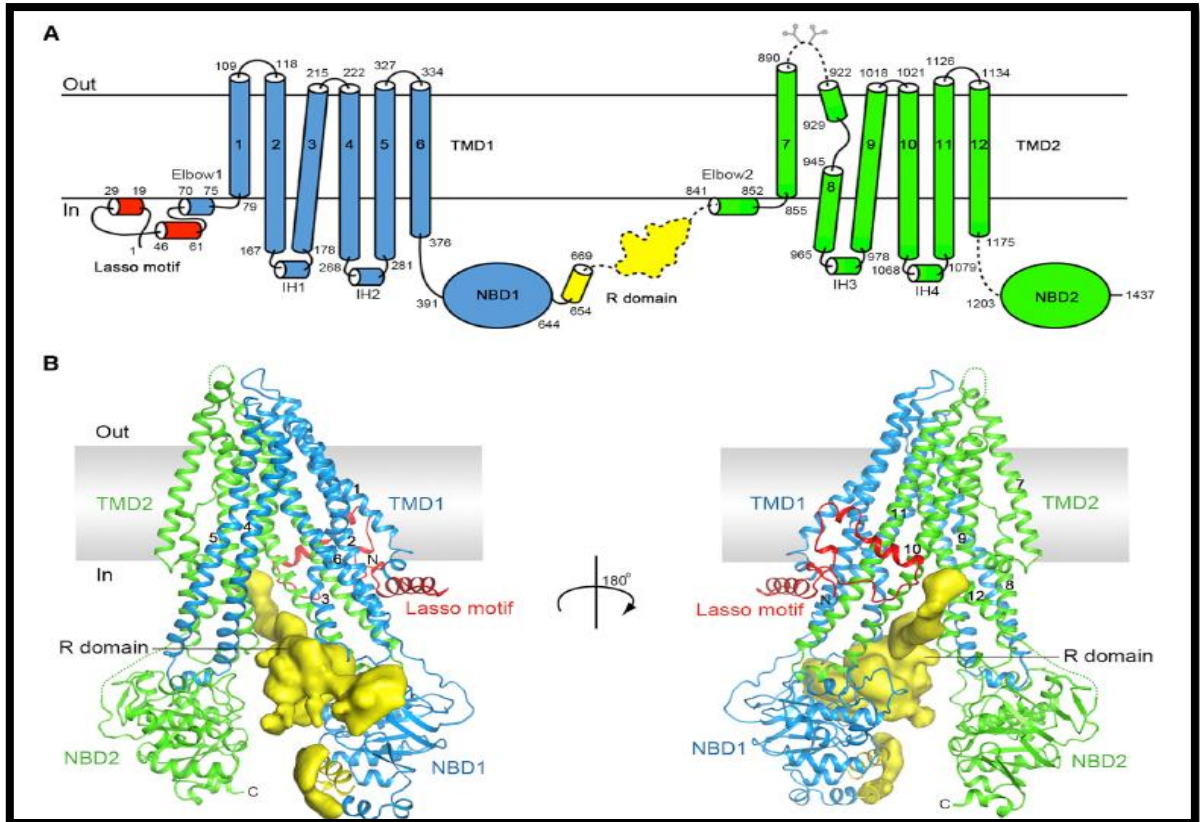


Figura 2. Estructura de la proteína reguladora de la conductancia transmembranal (CFTR). A) Dominios estructurales de la proteína CFTR. B) Diagrama de listones de la conformación estructural de la proteína en membrana (se muestra la densidad electrónica del dominio regulatorio) [24].

Variantes en *CFTR*

A la fecha, se han identificado más de 2,000 variantes en el gen *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca>).

La primera variante identificada fue una delección de 3 nucleótidos que resulta en la pérdida de una fenilalanina en la posición 508 de la proteína (p.Phe508del), siendo esta la VP más común a nivel mundial, con una frecuencia de 60 % de todos los alelos de individuos con FQ. Sin embargo, su frecuencia varía enormemente entre las poblaciones, observándose desde un 100 % en las Islas Feroe en Dinamarca hasta un 24.7 % en Turquía o 22.9% en Costa Rica. Existen otras VP comunes a nivel mundial como la p.Gly542*, asociada a los antiguos fenicios y la p.Asn1303Lys, asociada a poblaciones mediterráneas antiguas [25,26]. Las demás se consideran VP raras; ocurren con una frecuencia <1 %, aunque esto depende de la ancestría por lo que hay algunas poblaciones en las que se reportan con frecuencias de entre 1 y 5 % [27].

En las poblaciones del norte de Europa la diversidad de VP presentes en *CFTR* es limitada con respecto a otras poblaciones; en promedio se han reportado 10 variantes por país que constituyen el 78.9% del número total de alelos de FQ. En tanto que los países al sur de Europa, como España y Grecia, presentan 25 VP que corresponden al 84.0% de los alelos de FQ. Esta mayor diversidad se relaciona con su situación geográfica ya que sus fronteras han sido históricamente la puerta de entrada al continente europeo dando lugar a un mayor intercambio genético entre distintas poblaciones [27]. Por otro lado, en Latinoamérica se ha observado que existe un mayor número de VP en *CFTR*, lo que se relaciona con la heterogeneidad poblacional de sus países, muchos de los cuales presentan una combinación de ancestría amerindia, europea (predominantemente española o portuguesa, pero en la que también pueden incluirse italianos, alemanes, franceses e ingleses) y africana [28].

En un meta-análisis con datos de 10 países latinoamericanos y 4,354 alelos de FQ se identificaron 89 VP distintas obteniendo una tasa de detección (TDet) de 62.8%. Del total, cinco (p.Phe508del, p.Gly542*, p.Asn1303Lys, p.Trp1282* y p.Trp1162*) fueron las de mayor frecuencia, con algunas excepciones como en Colombia donde la segunda más frecuente es c.1680-886A>G (5.5%), en Uruguay la p.Gly85Glu presenta una frecuencia de 3.9% y en Brasil donde c.3120+1G>A (asociada a poblaciones africanas) se encuentra con una frecuencia del 4.0%. La frecuencia de las demás VP varía de un país a otro y muchas están restringidas a uno o dos países [28]. México y Brasil son de los países en los que se ha observado el espectro más amplio de VP, en el primero se han identificado 48 variantes distintas con una TDet del 77.7% [29,30] y en el segundo 45 variantes con una TDet del 97.2% [31].

Las diferentes VP se dividen en seis clases con base en su efecto funcional (Tabla 1). Las variantes de clase I resultan en pérdida total o parcial de la proteína e incluyen a: a) cambios de un nucleótido que resultan en codones de paro, b) *indels* que alteran el marco de lectura, c) variantes que alteran el splicing y generan exclusión de exones, d) delección completa o parcial del gen y e) rearrreglos que alteran la secuencia de exones. A diferencia de las variantes de clase II que alteran el proceso de maduración celular de la proteína por defectos de plegamiento. La alteración de la estructura puede presentarse en cualquiera de los dominios funcionales, provocando que la proteína inmadura sea retenida en retículo endoplásmico y retro-translocada al citoplasma donde es degradada por la vía ubiquitinación-proteosoma. Dependiendo el tipo de alteración se puede producir una reducción parcial o total de proteína madura. Las variantes que afectan la regulación del canal pertenecen a la clase III; usualmente se localizan en los dominios de unión a ATP (NBD1 y NBD2), implican cambios de aminoácido y generan una proteína madura que se inserta en la membrana celular, pero resistente a la activación del canal por la proteína cinasa A generando que la apertura del poro se vea reducida. Las variantes de clase IV reducen la conductancia del canal y la mayoría son cambios de un aminoácido dentro de los dominios transmembranales que

conforman la estructura del poro. La clase V corresponde a variantes que disminuyen la cantidad de CFTR funcional mediante una alteración en el splicing que induce exclusión parcial o completa de uno de los exones y generan una reducción en la cantidad de RNA mensajero. Finalmente, las variantes de clase VI generan una proteína madura y funcional pero con estabilidad reducida en membrana [18]. De manera general, las variantes de las clases I-III, se asocian con un fenotipo “clásico” (grave) dado por la poca o nula actividad de la proteína CFTR; mientras que las clases IV-VI resultan en una proteína con función parcial o residual y por consiguiente, en manifestaciones clínicas leves [32,33]. Es importante mencionar que variantes específicas pueden tener características de una o más clases funcionales, como la p.Phe508del que se puede clasificar en clase II y III y, que variantes adicionales en *cis* (denominados alelos complejos) pueden modificar la función de CFTR y por tanto, modular el fenotipo y la gravedad de las manifestaciones clínicas [34]. Sin embargo, esta clasificación es de gran utilidad para establecer relaciones genotipo-fenotipo y para el desarrollo de nuevos medicamentos dirigidos a defectos específicos a nivel molecular.

Uno de los retos actuales es, que a pesar de que los avances tecnológicos en secuenciación han permitido el análisis de la secuencia completa del gen en un mayor número de pacientes, existen una gran cantidad de variantes cuyo efecto funcional se desconoce; la base de datos CFTR2 [35], que incluye los datos de 88,000 pacientes con FQ y provee información clínica de variantes específicas y genotipos en *CFTR*, en su lista más reciente (diciembre 2017) cuenta con un total de 374 variantes de las cuales: 312 son variantes patogénicas, 36 son variantes con consecuencia clínica variable, 13 son no patogénicas y 13 son de significancia desconocida. La base de datos francesa (CFTR-France [34]) que incluye información de 5,053 individuos (3,093 con FQ) cuenta con un total de 819 variantes de las cuales 420 están clasificadas como patogénicas, 341 como variantes de significancia desconocida y 59 como variantes no patogénicas. Por tanto, es necesario que en aquellas variantes clasificadas como no patogénicas o de significancia desconocida, sugestivas clínicamente de FQ se realice un análisis del posible efecto en la función de la proteína.

Tabla 1. Clasificación funcional de las variantes en *CFTR* [36]

Clase	Mecanismo	Fenotipo	Variantes representativas
I	Síntesis defectuosa	Grave	p.Gly542*, p.Arg553*, p.Trp1282*, c.489+1G>T
II	Defectos de procesamiento y maduración		p.Phe508del, p.Asn1303Lys
III	Defectos regulatorios		p.Gly551Asp, p.Ser549Asn
IV	Defectos en conductancia	Leve	p.Arg117His, p.Arg334Trp
V	Disminución en expresión		c.3717+1219C>T, c.3140-26A>G
VI	Inestabilidad en membrana		p.Ile1383AsnfsX3, p.Gln1412*

Tratamiento de la FQ

El manejo de los pacientes con FQ debe evaluarse de manera individual, pero las medidas básicas consisten en el cuidado del estado nutricional, a través de dietas hipercalóricas, suplementos vitamínicos y administración de enzimas pancreáticas que faciliten la absorción de nutrientes. A nivel pulmonar, el principal objetivo es prevenir, erradicar o controlar las infecciones respiratorias para minimizar el deterioro de la función pulmonar por lo que, la terapia se basa en la administración de antibióticos cuya elección dependerá del microorganismo causal de la infección. Los más utilizados son los antibióticos inhalados o nebulizados como la tobramicina y la colistina acompañados por fisioterapia 2-3 veces al día. En pacientes con colonización crónica se recomienda evaluar el uso de azitromicina. En caso de presentarse exacerbaciones y/o fallo del tratamiento inhalado se debe considerar la administración intravenosa que requiere la hospitalización del paciente. Dado que las anomalías en las secreciones de los pacientes con FQ se deben, en parte, a la presencia de ADN libre procedente de la destrucción del núcleo de polimorfonucleares que se acumulan en presencia de infección bacteriana, se recomienda el uso de dornasa alfa recombinante humana (rhDNasa). La rhDNasa hidroliza el ADN extracelular en las secreciones pulmonares reduciendo la viscosidad y disminuyendo la obstrucción de las vías respiratorias [1,37].

En los últimos años, los avances en el entendimiento de la estructura y función de *CFTR* han posibilitado el diseño de medicamentos dirigidos al tratamiento de ciertos tipos de variantes. La investigación ha resultado en el desarrollo de cuatro grupos de medicamentos: potenciadores, correctores, amplificadores y dirigidos a codones de terminación [38]. Actualmente, existen 3 medicamentos en el mercado; Ivacaftor (Kalydeco®) y dos combinaciones de agentes duales, Lumacaftor-Ivacaftor (Orkambi®) y Tezacaftor-Ivacaftor (Symdeko™).

Ivacaftor (VX-770) es un potenciador dirigido a variantes de clase III que actúa en CFTR a nivel de membrana celular aumentando la probabilidad de apertura (a la fecha está aprobado por la FDA para más de 40 variantes).

Lumacaftor es una molécula correctora dirigida a variantes de clase II; corrige defectos en el plegamiento de la proteína. Se combina con Ivacaftor debido a su ineficiencia como monoterapia. La variante más común a nivel mundial, p.Phe508del forma parte de este grupo de variantes por lo que la mayoría de los pacientes son candidatos al tratamiento con este medicamento. Sin embargo, se ha observado que los pacientes con este tratamiento muestran un incremento de exacerbaciones respiratorias y un decremento de FEV₁ tras el inicio de la administración [39].

Tezacaftor (VX-661) también es una molécula correctora con un mecanismo similar al Ivacaftor, aprobada en 2018, con la ventaja de que presenta menores efectos secundarios en vías respiratorias y una eficacia similar a la terapia Lumacaftor-Ivacaftor [40].

ANTECEDENTES

Los datos epidemiológicos disponibles sobre la FQ en México corresponden, principalmente, a la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística A.C. (AMFQ) fundada en 1982.

La AMFQ estima que, en México se presenta un caso por cada 8,500 nacidos vivos y que 1 de cada 60 a 80 personas son portadores sanos de la enfermedad. La edad promedio de diagnóstico es de 2.6 años (momento en el que ya existe afectación pulmonar), pero se estima que el 85 % de los individuos con FQ no han sido diagnosticados. Actualmente, la esperanza promedio de vida en México para los pacientes es de 18 años (<http://fibrosisquistica.org.mx/~h4u3f3d9/>).

A nivel molecular, el primer espectro de variantes en mexicanos (antes sólo se había publicado la frecuencia de las variantes más comunes a nivel mundial; p.Phe508del y p.Gly542*) se reportó en el año 2000 [41]. En este estudio se incluyeron 97 familias con al menos un individuo con FQ y se identificaron 34 VP distintas (correspondientes a 74.6 % de los cromosomas) para lo cual, fue necesaria la combinación de distintas metodologías como mutagénesis dirigida mediada por PCR, polimorfismo conformacional de cadena sencilla, restricción de fragmentos, análisis de heteroduplex y secuenciación Sanger. De las variantes identificadas, las más frecuentes fueron p.Phe508del (40.7 %), p.Gly542* (6.1 %), p.Ile507del (2.5 %), p.Ser549Asn (2.5 %) y p.Asn1303Lys (2.1 %); del resto de las variantes, solo 13 presentaron una frecuencia mayor que el 1.0% y 21 se identificaron en un solo alelo en la población.

Diez años más tarde, se publicó un segundo artículo [29] del mismo grupo de trabajo en el cual se incluyeron 97 pacientes del trabajo anterior, que tenían al menos un alelo sin caracterizar y 133 casos nuevos. La identificación de las variantes se realizó a través de un panel comercial para 36 VP y la técnica previamente utilizada de polimorfismo conformacional de cadena sencilla, seguidos de secuenciación. Con esta estrategia se logró caracterizar el 77.7% de los alelos de FQ y el número de variantes aumentó de 34 a 46. Con estos antecedentes se evidencia que México presenta uno de los espectros más amplios de variantes en *CFTR* a nivel mundial.

JUSTIFICACIÓN

En México, el diagnóstico de los pacientes se basa principalmente en el cuadro clínico y en la prueba de cloruros en sudor; sin embargo, los pacientes pueden ser diagnosticados de forma tardía debido a que las manifestaciones clínicas en algunas ocasiones se enmascaran con enfermedades comunes de la población mexicana como la desnutrición, diarreas e infecciones en vías respiratorias recurrentes. Esto, aunado al alto costo del tratamiento, incrementa la morbi-mortalidad de los pacientes con FQ lo cual se refleja en una sobrevida de apenas 18 años en nuestra población.

En países desarrollados la integración del conocimiento clínico y genético ha permitido incrementar considerablemente la calidad y la sobrevida de los pacientes a más de 40 años, demostrando que la caracterización molecular de los alelos responsables de la FQ tiene una repercusión directa en el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de la enfermedad, además de permitir el diagnóstico prenatal, la detección de portadores y un asesoramiento genético adecuado.

En México, la TDet de las variantes es baja comparada con la de otros países, la metodología hasta ahora empleada es costosa y no se han logrado identificar todas las VP presentes en la población por lo que las tecnologías de secuenciación de nueva generación son una excelente herramienta para identificar variantes en *CFTR* y contribuir al diagnóstico de la FQ y a la detección de portadores.

HIPÓTESIS

- 1.- La secuenciación completa del gen *CFTR* permitirá identificar variantes patogénicas nuevas en la población mexicana.
- 2.- Debido a la heterogeneidad genética de la población mexicana, la frecuencia de las variantes patogénicas en el gen *CFTR* será distinta a lo previamente reportado para la población mexicana y para otras poblaciones del mundo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el espectro total de variantes patogénicas en el gen *CFTR* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de fibrosis quística.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Identificar variantes patogénicas en el gen *CFTR* en población mexicana con FQ.
- 2) Conocer la frecuencia de estas variantes en la población mexicana con FQ.
- 3) Correlacionar el tipo de variante con el cuadro clínico de los pacientes.
- 4) Identificar a los portadores de las variantes en los familiares en primer grado.
- 5) Predecir el efecto de las variantes sobre la proteína CFTR mediante el análisis *in silico*.

METODOLOGÍA

Población de estudio

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de medicina Genómica (INMEGEN) y llevado a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Los pacientes fueron diagnosticados clínicamente y referidos al INMEGEN para el estudio molecular por diferentes instituciones como: la AMFQ, hospitales del IMSS, y el Hospital Federico Gómez. Todos los participantes (o los padres en el caso de los menores de edad) firmaron una carta de consentimiento y asentimiento informado y completaron un cuestionario clínico (anexo 1).

Se incluyeron un total de 280 pacientes (146 mujeres y 134 hombres) con diagnóstico clínico de FQ captados durante los 2 años del estudio, así como aquellos captados anteriormente que forman parte del banco de DNA del laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN. Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación se muestran en la Tabla 2. Respecto a los familiares en primer grado, se incluyeron ambos padres de 151 pacientes, solo uno de ellos en 29 pacientes y ninguno en 100 pacientes. En 35 casos se captó un hermano y en 7 casos se captaron 2 hermanos.

Tabla 2. Criterios considerados para la selección de la población de estudio.

Inclusión	Exclusión	Eliminación
<ul style="list-style-type: none">• Diagnóstico clínico de FQ (una o más características clínicas y cloruros en sudor > 60 mmol/l por iontoforesis con pilocarpina).• Neonatos con íleo meconial.	<ul style="list-style-type: none">• Enfermedades genéticas distintas a la FQ	<ul style="list-style-type: none">• Decisión del paciente o sus padres de retirarse del estudio.• Muestra insuficiente de ADN u otros problemas técnicos.

Procesamiento de las muestras

Se obtuvo por participante una muestra de 5 ml de sangre periférica en tubo Vacutainer™ con EDTA. La extracción del ADN se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica con el *kit* QIAamp® DNA Blood Maxi kit (QIAGEN™) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración y pureza del ADN se utilizó un NanoDrop® (Thermo Scientific™), en tanto que la integridad se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Identificación de variantes

Para la búsqueda de variantes se siguió un proceso en tres etapas:

Etapa 1: primero, se identificaron las cinco variantes más comunes en la población mexicana que son: p.Ile507del, p.Phe508del, p.gly542*, p.Ser549Asn y p.Asn1303Lys, mediante mutagénesis dirigida siguiendo la técnica descrita por Friedman et al. 1991 [42].

Etapa 2: posteriormente, en aquellos pacientes en los que no se encontraron las cinco variantes de la etapa 1 en uno o en los dos alelos, se realizó la secuenciación completa del gen *CFTR* (incluyendo 14 kb de la secuencia río arriba del exón 1) utilizando secuenciación de segunda generación. Para esta etapa, se prepararon bibliotecas de ADN como se describe a continuación: el ADN se fragmentó con enzimas de restricción para generar fragmentos de 200-300 pares de bases, los cuales posteriormente se ligaron por los extremos a adaptadores específicos para la plataforma Illumina® y se amplificaron utilizando el *kit* de preparación de bibliotecas HaloPlex Target Enrichment para Illumina® de Agilent Technologies (este *kit* se diseñó para el enriquecimiento del gen *CFTR* por captura de la región de interés con sondas complementarias). Las bibliotecas enriquecidas generadas fueron verificadas y cuantificadas por electroforesis capilar automatizada utilizando el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). El siguiente paso, fue mezclar equimolarmente las muestras para una concentración final de 20 pM y cargarlas en un cartucho de secuenciación del *kit* HiSeq Reagent Kit V2 (Illumina®) para su secuenciación en el equipo HiSeq 2500 (Illumina®). Las secuencias obtenidas en formato fastq se analizaron con el programa IGV 2.3 [43,44] utilizando el genoma humano Hg19 como referencia.

Etapa 3: la última etapa consistió en analizar por medio de la técnica de amplificación de sondas dependiente de ligandos (MLPA por sus siglas en inglés) a 26 pacientes en los que no se lograron identificar los dos alelos en las etapas previas. El MLPA es un método semicuantitativo para el análisis selectivo de cambios en el número de copias del DNA. La técnica se basa en una primera reacción de unión-ligación de sondas complementarias a la región genómica de interés (el *kit* para *CFTR* incluye varias sondas para la región del promotor y una sonda por exón), únicamente las sondas que hibridaron son ligadas y amplificadas posteriormente mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR). El resultado se obtiene mediante un análisis de fragmentos y fluorescencia con el que se determina el número de copias genómicas permitiendo la detección de rearrreglos cromosómicos complejos.

Validación de variantes

Todas las VP identificadas en los pacientes fueron validadas por secuenciación Sanger. Para la identificación de los portadores, también se analizaron de forma dirigida en sus familiares en primer grado con la misma metodología. El análisis de las secuencias Sanger se realizó con el programa DNA Baser (DNA Sequence

Assembler v4, 2013, Heracle BioSoft). Toda la nomenclatura utilizada corresponde a la recomendada por la *Human Genome Variation Society* (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

Búsqueda en bases de datos y análisis “*in silico*”

Todas las variantes identificadas se buscaron en las bases de datos especializadas (CFTR1, CFTR2, CFTR-France, CLINVAR) para determinar si eran variantes ya descritas en la literatura o nuevas. En caso de que una variante fuera nueva, se realizó un análisis “*in silico*” mediante los programas Variant Effect Predictor [45] (para variantes en región codificante) y Human Splicing Finder 3.1 [46] (para variantes en regiones intrónicas) para conocer el posible efecto funcional y asignarlas como las variantes causales.

Las variantes nuevas se buscaron adicionalmente en la base de datos del Exome Aggregation Consortium (ExAC). En esta base se encuentran los exomas de 60,706 individuos no relacionados de distintas poblaciones incluidos en estudios de genética de poblaciones y enfermedades distintas a la FQ [47].

Correlación genotipo-fenotipo

Para el análisis de correlación entre el genotipo y las manifestaciones clínicas se estratificó a la población en 3 grupos de acuerdo con la siguiente clasificación: grupo 1, homocigotos p.Phe508del; grupo 2, dos variantes graves (clases I-III) y grupo 3, al menos una variante leve (clases IV-VI).

La correlación con las variables cuantitativas como peso y talla al nacer, edad de diagnóstico y cloruros en sudor se realizó con la prueba estadística de Kruskal Wallis o la U de Mann-Whitney. Para las variables categóricas como función pancreática y presencia de íleo meconial, se aplicó la X^2 o la prueba exacta de Fisher. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

Análisis de supervivencia

El análisis de supervivencia fue realizado estratificando a los pacientes en 3 cohortes de acuerdo con el año de nacimiento: 1977-1992, 1993-2002 y 2003-2012. Para cada cohorte se calculó la tasa de fallecimiento por intervalos de edad de 5 años. Con los datos de fallecimiento se construyeron curvas de supervivencia en las que se graficó el porcentaje de supervivencia por grupo de edad y a partir de las gráficas, se obtuvo la mediana de fallecimiento (edad a la que el 50% de la población ha fallecido) o se estimó dicho valor a partir de las líneas de tendencia.

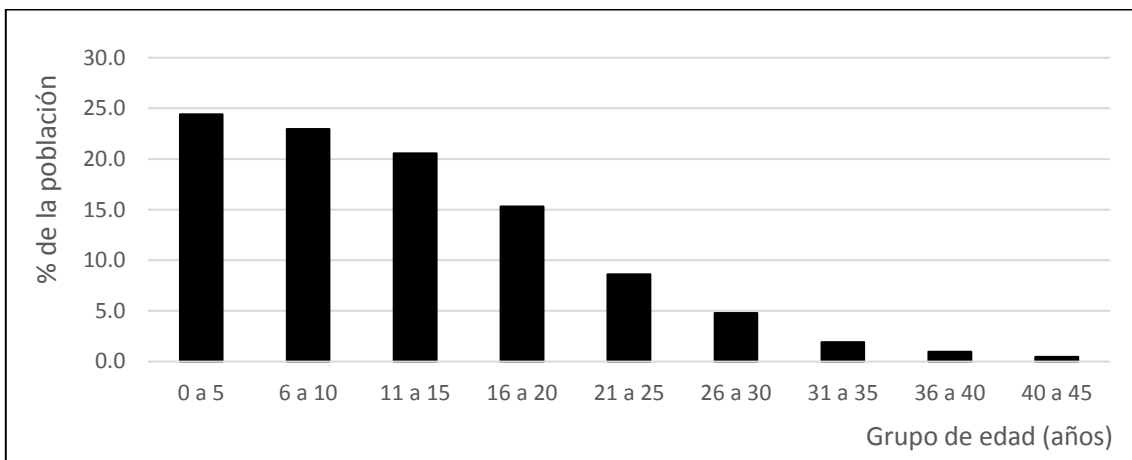
Posteriormente, se realizaron las curvas de supervivencia considerando la estratificación de la correlación genotipo-fenotipo (es decir, los 3 grupos de genotipos). Este tipo de análisis nos permitió conocer o inferir si el genotipo influye en la supervivencia de los pacientes.

RESULTADOS

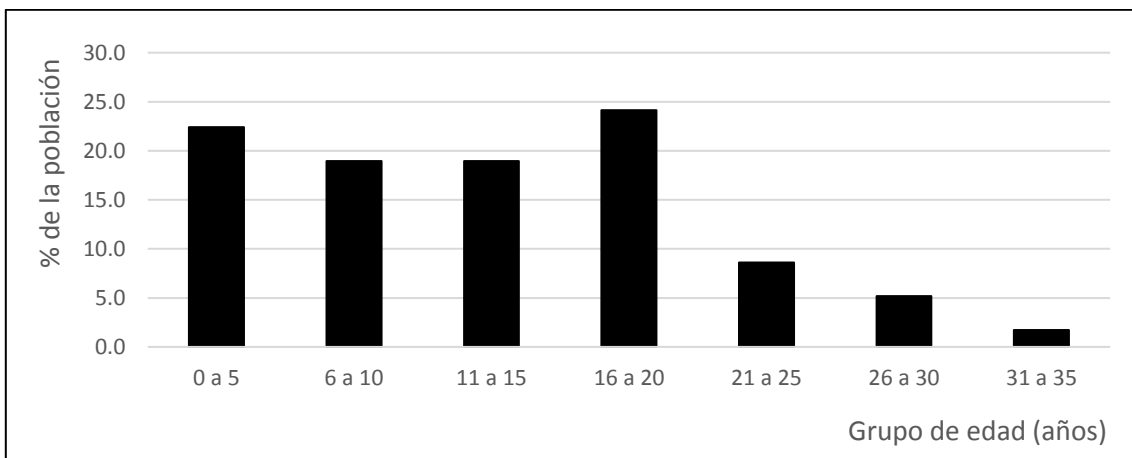
Población de estudio

Se incluyeron un total de 280 pacientes, el 51.7 % fueron hombres y el 48.3 % mujeres; 217 pacientes aún viven y tienen un intervalo de edad de 0.1-45 años, siendo el grupo etario más común el de 0.1-15 años (Gráfica 1). Durante el estudio fallecieron 63 individuos siendo la edad más frecuente de muerte entre los 16 y 20 años (Gráfica 2).

Gráfica 1. Distribución de edad de la población viva con FQ (n=217)



Gráfica 2. Distribución de edad de fallecimiento (n=63)



Detección de variantes

Las 5 VP más comunes fueron identificadas en 325 alelos (TDet: 58.0 %), correspondientes a 224 pacientes; en 101 pacientes se detectaron las dos variantes causales de FQ y en 123 se identificó uno de los alelos.

La secuenciación completa del gen permitió la identificación de 145 alelos adicionales incrementando la TDet en un 25.9% (total: 83.9%). Se determinaron las dos VP en 26 pacientes y se completó el resultado en otros 79 pacientes. Finalmente, con el MLPA, se detectaron 8 alelos con rearrreglos complejos. Con la combinación de estas tres metodologías se logró obtener una TDet del 85.4% (Tabla 3). En 54 pacientes solo se identificó un alelo y en 14 no se detectó ninguna VP, estos casos siguen en estudio ya que el contacto con el médico no ha sido posible para confirmar o descartar el diagnóstico de FQ.

Se eliminaron nueve casos ya que, al no identificar ninguna VP, se recontactó al médico y se confirmó que la prueba había sido requerida por sospecha pero que los pacientes ya contaban con un diagnóstico distinto a FQ. Dentro de los diagnósticos se encontraron: múltiples infecciones respiratorias de otro origen, síndrome de Schwachman Diamond y deficiencia selectiva de inmunoglobulinas 2 y 4.

La estrategia empleada en este trabajo permitió identificar 72 VP, 59 de las cuales se habían reportado previamente, 35 en población mexicana y 24 en otras poblaciones; mientras que 13 son variantes nuevas, es decir, hasta la fecha no se han reportado para ninguna población (Tabla 4).

La variante más común fue p.Phe508del (46.07 %) y solo 9 variantes más presentaron una frecuencia mayor al 1.0%: p.Gly542* (6.25 %), p.Asn1303Lys (2.14 %), p.Ile507del (1.96 %), p.Asn386Ilefs*3 (1.79 %), p.Ser549Asn (1.61 %), p.Ser945Leu y p.Trp1204* (1.43 %), p.Arg75* y p.Gly1323_Val1415del (1.07 %). 62 variantes mostraron una frecuencia menor que 1.0 % y 33 se identificaron en un solo paciente.

En la base de datos del consorcio internacional de FQ (CFTR1) se encuentran reportadas 20 de las 24 variantes no reportadas en población mexicana. De las no reportadas en esta base, las variantes p.Trp79Leufs*32 y c.1680-886A>G están enlistadas en la base de datos francesa (CFTR-France), la variante c.1680-877G>T fue reportada recientemente en población italiana de ancestría hispana [48] y la variante p.Leu941Glnfs*27 se identificó en un estudio de California [49].

En relación a las variantes nuevas, el análisis bioinformático de predicción funcional reveló que: tres podrían afectar el splicing (c.580-2A>G, c.1116+5T>A y c.3469-1G>A), cuatro involucran un cambio de aminoácido (p.Ser431Ile, p.Cys832Phe, p.Leu967Trp y p.Leu1346Gln), la p.Glu588* produce un codón de paro prematuro, tres alteran el marco de lectura y producen un codón de paro prematuro (p.Gly1047Alafs*13, p.Phe1078Profs*77 y p.Thr1263Metfs*15) y una

(c.[1066_1071delTGGGCT; 1072G>A]) produce la delección de dos aminoácidos y un cambio de aminoácido.

Interesantemente, la variante nueva c.1762G>T que produce un codón de paro prematuro (p.Glu588*) se identificó en el paciente junto con la p.Trp1089* en *trans*. La madre fue portadora de p.Trp1089* pero la otra variante no fue identificada en ninguno de los padres o hermanos, por lo que se realizó una prueba de parentesco confirmando la paternidad (probabilidad paternidad > 99.9 %). Debido a los resultados anteriores, esta variante (p.Glu588*) fue considerada *de novo*. La variante p.Trp1089* fue confirmada en tres de los hermanos del paciente y en dos tíos y en la abuela materna (Figura 3).

Tabla 3. Tasas de detección por metodología de las variantes causales de FQ en 280 pacientes.

Metodología	Alelos identificados (n)	Tasa de detección (%)
Mutagénesis dirigida	325	58.0
Secuenciación completa del gen	145	25.9
MLPA	8	1.4
Total	478	85.4

Tabla 4. Variantes identificadas en el gen *CFTR* en pacientes con FQ

Localización	cDNA	Proteína	Número de alelos	Frecuencia (%)
Promotor	c.-869T[8_9] ●	NA	2	0.36
Intrón 2	c.165-1G>A	NA	4	0.71
Exón 3	c.223C>T	p.Arg75*	6	1.07
	c.233dupT ●	p.Trp79Leufs*32	1	0.18
	c.254G>A	p.Gly85Glu	4	0.71
Intrón 3	c.273+1G>A●	NA	1	0.18
	c.274-1G>A	NA	5	0.89
	c.274-1G>C ●	NA	1	0.18
Exón 4	c.293A>G ●	p.Gln98Arg	3	0.54
	c.350G>A	p.Arg117His	1	0.18
Intrón 4	c.489+1G>T ●	NA	3	0.54
	c.490-1G>A	NA	1	0.18
Intrón 5	c.579+1G>T	NA	4	0.71
	c.580-2A>G ◊	NA	2	0.36
	c.580-1G>T ●	NA	1	0.18
Exón 6	c.580G>T ●	p.Gly194*	1	0.18
	c.595C>T	p.His199Tyr	1	0.18
	c.613C>T ●	p.Pro205Ser	1	0.18
Exón 7	c.803delA	p.Asn286Ilefs*17	1	0.18
Exón 8	c.948delT	p.Phe316Leufs*12	2	0.36
	c.1000C>T	p.Arg334Trp	5	0.89
	c.1040C>G	p.Arg347Pro	1	0.18
	c.[1066_1071delTGGGCT;1072G>A] ◊		2	0.36
Intrón 8	c.1116+1G>A ●	NA	3	0.54
	c.1116+5T>A ◊	NA	1	0.18
Exón 9	c.1153_1154insAT ●	p.Asn386Ilefs*3	10	1.79
Exón 10	c.1292G>T ◊	p.Ser431Phe	1	0.18
	c.1364C>A	p.Ala455Glu	2	0.36
Exón 11	c.1438G>A ●	p.Gly480Ser	1	0.18
	c.1517T>C	p.Ile506Thr	1	0.18
	c.1519_1521delATC □	p.Ile507del	11	1.96
	c.1521_1523delCTT □	p.Phe508del	257	46.07
Exón 12	c.1624G>T □	p.Gly542*	35	6.25
	c.1646G>A □	p.Ser549Asn	9	1.61
	c.1647T>G ●	p.Ser549Arg	1	0.18
	c.1673T>C	p.Leu558Ser	1	0.18
	c.1675G>C	p.Ala559Pro	1	0.18

Tabla 4. Variantes identificadas en el gen *CFTR* en pacientes con FQ (continuación)

Localización	cDNA	Proteína	Número de alelos	Frecuencia (%)
Intrón 12	c.1680-886A>G ●	NA	2	0.36
	c.1680-877G>T ●	p.Ala561Serfs*15	3	0.54
	c.1680-1G>A ●	NA	1	0.18
Exón 13	c.1762G>T ◇	p.Glu588*	1	0.18
Exón 14	c.1792_1798delAAAACTA	p.Lys598Glyfs*11	1	0.18
	c.1923_1931delCTCAAAACTinsA	p.Ser641Argfs*5	4	0.71
	c.2052_2053insA	p.Gln684Thrfs*38	2	0.36
	c.2249C>T	p.Pro750Leu	1	0.18
	c.2260G>A	p.Val754Met	1	0.18
Exón 15	c.2495G>T ◇	p.Cys832Phe	1	0.18
	c.2551C>T ●	p.Arg851*	1	0.18
Exón 17	c.2822delT ●	p.Leu941Glnfs*27	1	0.18
	c.2834C>T ●	p.Ser945Leu	8	1.43
	c.2900T>G ◇	p.Leu967Trp	1	0.18
Intrón 18	c.2988+1G>A	NA	4	0.71
Exón 19	c.3067_3072delATAGTG	p.Ile1023_Val1024del	2	0.36
	c.3107C>A	p.Thr1036Asn	2	0.36
	c.3139delG ◇	p.Gly1047Alafs*13	3	0.54
Intrón 19	c.3140-26A>G	NA	3	0.54
Exón 20	c.3197G>A ●	p.Arg1066His	1	0.18
	c.3230_3231delTG ◇	p.Phe1078Profs*77	2	0.36
	c.3266G>A	p.Trp1089*	4	0.71
Intrón 21	c.3469-1G>A ◇	NA	1	0.18
Exón 22	c.3484C>T	p.Arg1162*	1	0.18
	c.3612G>A	p.Trp1204*	8	1.43
Intrón 22	c.3717+1219C>T	NA	3	0.54
Exón 23	c.3793G>A ●	p.Gly1265Arg	1	0.18
	c.3788delC ◇	p.Thr1263Metfs*15	2	0.36
	c.3846G>A	p.Trp1282*	2	0.36
Exón 24	c.3907A>C ●	p.Asn1303His	1	0.18
	c.3909C>G □	p.Asn1303Lys	12	2.14
	c.3937C>T ●	p.Gln1313*	1	0.18
Exón 25	c.4037T>A ◇	p.Leu1346Gln	1	0.18
Rearreglos complejos (MLPA)	◇	CFTRdup18_21	2	0.36
	c.3964-78_4242+577del ●	p.Gly1323_Val1415del	6	1.07
Total	72 variantes		478	85.36

◇ variantes nuevas, ● variantes no reportadas en población mexicana (las variantes sin señal son las ya reportadas en población mexicana). □ 5 variantes más comunes. 64 variantes restantes por NGS.

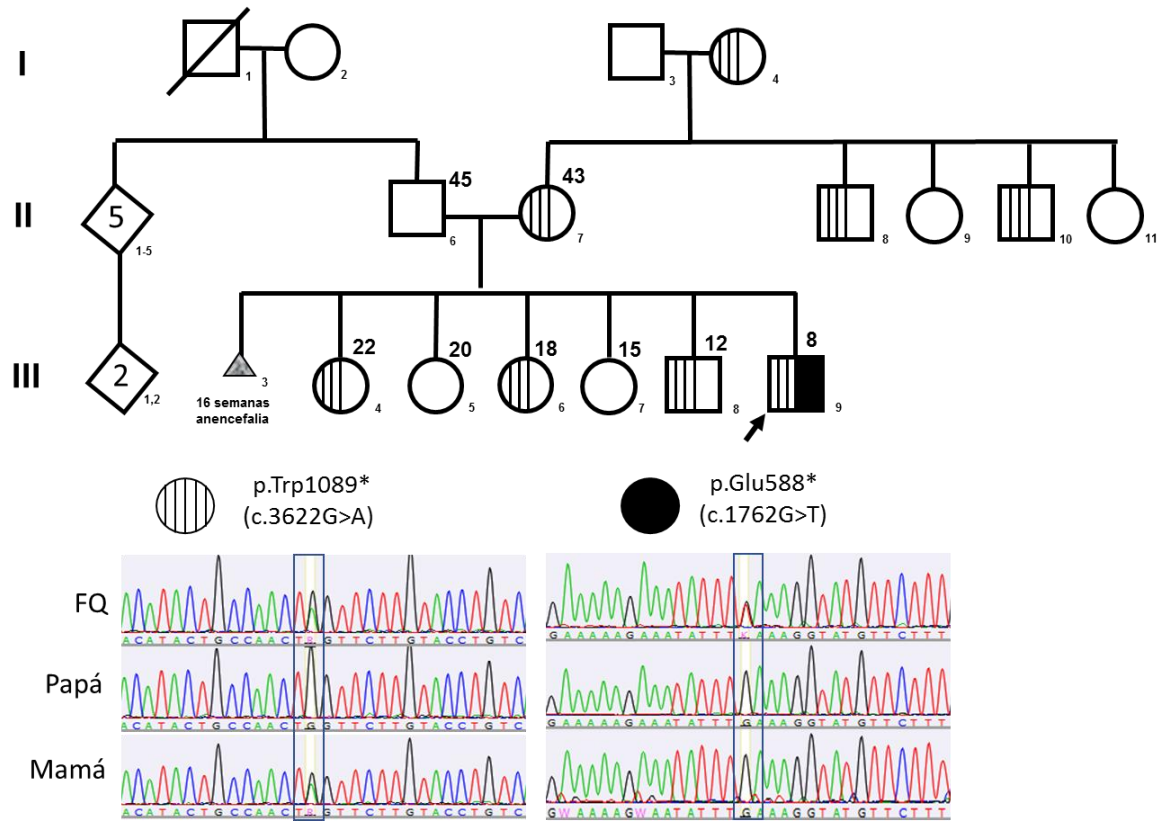


Figura 3. Árbol genealógico del paciente con la variante *de novo* [50].

Correlación genotipo-fenotipo

La correlación clínica se realizó únicamente con 145 pacientes que contaban con la información clínica completa. Como se mencionó anteriormente, para este análisis los pacientes fueron divididos en tres grupos de acuerdo con el genotipo: homocigotos p.Phe508del (grupo 1), dos variantes graves (grupo 2) y al menos una variante leve (grupo 3). Este análisis mostró que en los 3 grupos existe una correlación significativa ($p < 0.05$) con los niveles de cloruros. El grupo 1 presenta los valores más elevados (97.3 ± 9.2 mmol/l) en comparación a los pacientes de los grupos 2 y 3 (93.5 ± 8.3 mmol/l y 85.7 ± 10.8 mmol/l, respectivamente, Tabla 5).

Respecto a la función pancreática, en los tres grupos se presentaron individuos con IP. Las diferencias significativas fueron observadas únicamente cuando se compararon los grupos 1 y 2 vs. el grupo 3 ($p < 0.0001$). La SP únicamente se observó en 14 individuos (9.7%), principalmente en los pacientes del grupo 3 (13/23) y en un individuo del grupo 2 quien murió a los 18 años y tenía el genotipo p.[Trp79Leufs*32]+[Ser549Asn]. Por otro lado, la presencia de íleo meconial se identificó en el 23.4 % de los pacientes, todos pertenecientes a los grupos 1 y 2, entre los que no existen diferencias significativas, mientras que ambos grupos presentaron diferencias significativas con el grupo 3 ($p < 0.001$) (Tabla 5).

En las demás características clínicas analizadas no se identificaron diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, se observó una tendencia en el peso al nacer donde el grupo 1 (3012.0 ± 415.4 g) mostró los pesos más bajos al nacer, seguido del grupo 2 (3086.4 ± 392.5 g) mientras que los pesos más altos se observaron en el grupo 3 (3253.0 ± 343.0 g). De igual manera en la edad de inicio de síntomas y la edad de diagnóstico, el grupo 3 presenta edades más avanzadas que los otros grupos y de acuerdo con los parámetros de función pulmonar presenta un menor deterioro respiratorio (Tabla 5).

El fenotipo de los pacientes con variantes leves se muestra en la Tabla 6. Es interesante, que de los 10 que presentan IP, 9 (90.0%) son mujeres mientras que en los SP hay un 61.5% de mujeres y un 38.5% de hombres. Respecto a los signos clínicos, los niveles de cloruros son más altos en los pacientes con IP, la edad del primer cultivo positivo de *P. aeruginosa* es menor en los pacientes IP y la función pulmonar está más deteriorada.

Solo 15 individuos (10.3%) cursaron con diabetes, la mayoría (14) forma parte de los grupos 1 y 2. El paciente del grupo 3 con diabetes que presentó las VP p.Phe508del y c.3717+1219C>T cursa con IP y el diagnóstico de diabetes fue realizado a los 24 años (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Correlación genotipo-fenotipo

Variable	Todos (n=145)	Grupo 1 (n=54) Homocigotos p.Phe508del	Grupo 2 (n=68) Dos variantes graves	Grupo 3 (n=23) Al menos una variante leve	Valor P		
					1 vs 2	2 vs 3	1 vs 3
Sexo (m/h)	52.4% (76) 47.6% (69)	51.8% (28) 48.2% (26)	45.6% (31) 54.4% (37)	73.9% (17) 26.1% (6)	-		
Peso al nacer (g)	3086.0 ± 400.9	3012.0 ± 415.4	3086.4 ± 392.5	3253.0 ± 343.0	NS		
Talla al nacer (cm)	49.8 ± 1.7	49.4 ± 1.7	49.9 ± 1.8	50.4 ± 1.3	NS		
Edad inicio síntomas (años)	0.9 ± 1.9	0.6 ± 1.5	0.7 ± 1.3	2.6 ± 3.4	NS		
Edad de diagnóstico (años)	2.9 ± 3.5	2.4 ± 3.1	2.9 ± 3.2	4.1 ± 4.9	NS		
Cloruros en sudor (mmol/l)	93.6 ± 9.9	97.3 ± 9.2	93.3 ± 8.4	83.9 ± 12.9	<0.02	<0.001	<0.0001
Colonización <i>P. aeruginosa</i> (no/intermitente/crónica)	15.9% (23) 21.4% (31) 62.1% (90)	20.4% (11) 16.7% (9) 63.0% (34)	11.8% (8) 20.6% (14) 66.2% (45)	17.4% (4) 34.8% (8) 47.8% (11)	NS		
VEF1 (%)	58.0% ± 25.8	56.1% ± 23.5	57.3% ± 26.2	63.2% ± 28.2	NS		
CVF (%)	68.7% ± 25.0	65.4% ± 21.6	68.6% ± 26.2	74.4% ± 27.5	NS		
Función pancreática (IP/SP)	90.3% (131) 9.7% (14)	100% (54) 0	98.5% (67) 1.5% (1)	43.5% (10) 56.5% (13)	NS	<0.0001	<0.0001
Íleo meconial (si/no)	23.4% (34) 76.6% (111)	35.2% (19) 64.8% (35)	22.1% (15) 77.9% (53)	0 100% (23)	NS	<0.01	<0.001
Diabetes (si/no)	10.3% (15) 89.7% (130)	16.7% (9) 83.3% (45)	7.4% (5) 92.6% (63)	4.3% (1) 95.7% (22)	NS		

NS= no significativo, SP= suficiencia pancreática, IP= insuficiencia pancreática, VEF1= volumen espiratorio forzado en el primer segundo, CVF= capacidad vital forzada

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes del grupo 3 con al menos una variante leve.

Genotipo	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad dx (años)	Cloruros (mmol/l)	Colonización por <i>P. aeruginosa</i>	Edad primer cultivo positivo (años)	VEF1 (%)	CVF (%)	Edad de fallecimiento (años)
*p.Phe508del/c.3717+1219C>T	M	16/11/1981	8.8	75	crónica	9	34	64	NA
p.Phe508del/p.Ala455Glu	F	12/04/1985	1.6	96	crónica	4	36	51	14.1
p.Phe508del/p.Arg117His	F	23/12/1990	0.4	80	crónica	4	32	43	11.5
p.Thr1096Asn/ p.Arg334Trp	F	12/07/1991	0.7	92	crónica	1	28	41	10.1
p.Gly542*/p.Arg347Pro	F	19/12/1991	1.3	96	crónica	6	21	34	10.5
IP p.Phe508del/p.Arg334Trp	F	25/08/1993	5.5	75	crónica	6	21	36	10.1
c.511+1G>T/c.3717+1219C>T	F	11/02/1996	5.7	96	crónica	5	38	47	16.2
p.Phe508del/p.Ala455Glu	F	21/04/1999	4	81	crónica	8	92	96	NA
p.Phe508del/p.Gly85Glu	F	21/05/2000	4.5	103	intermitente	11	88	101	NA
p.Leu967Trp/p.Gly85Glu	F	16/08/2012	0.4	94	no	NA	105	112	NA
p.Phe508del/ c.3140-26A>G	M	06/01/1977	6.2	69	crónica	10	61	69	NA
p.Phe508del/p.Leu1346Gln	F	21/04/1987	17	76	intermitente	18	79	88	NA
p.Phe508del/p.Ile506Thr	F	16/12/1990	0.2	100	intermitente	11	86	95	NA
c.3139delG/p.Ser945Leu	M	12/04/1993	16.5	76	intermitente	16	87	96	NA
p.Phe508del/p.Pro750Leu	M	18/05/1993	1.5	83	intermitente	10	89	101	NA
c.2988+1G>A/p.Pro205Ser	F	02/04/1994	1.1	81	intermitente	18	86	101	NA
SP p.Trp1089*/c.3717+1219C>T	M	20/07/1998	8	52	crónica	8	41	49	16.5
p.Phe508del/p.Arg334Trp	M	14/06/2001	0.8	98	intermitente	10	94	104	NA
p.Phe508del/p.Ser945Leu	F	06/02/2006	8.6	69	no	NA	93	97	NA
p.Phe508del/c.1116+5T>A	F	10/07/2008	0.9	82	crónica	4	56	64	NA
p.Phe508del/p.Gly85Glu	F	17/09/2009	0.1	93	no	NA	102	110	NA
p.Phe508del/p.Ala455Glu	F	10/10/2011	0.1	95	no	NA	101	107	NA
p.Phe508del/p.Ser945Leu	F	21/05/2014	0.5	69	intermitente	2	NA	NA	NA

***PACIENTE CON DIABETES**

Análisis de supervivencia

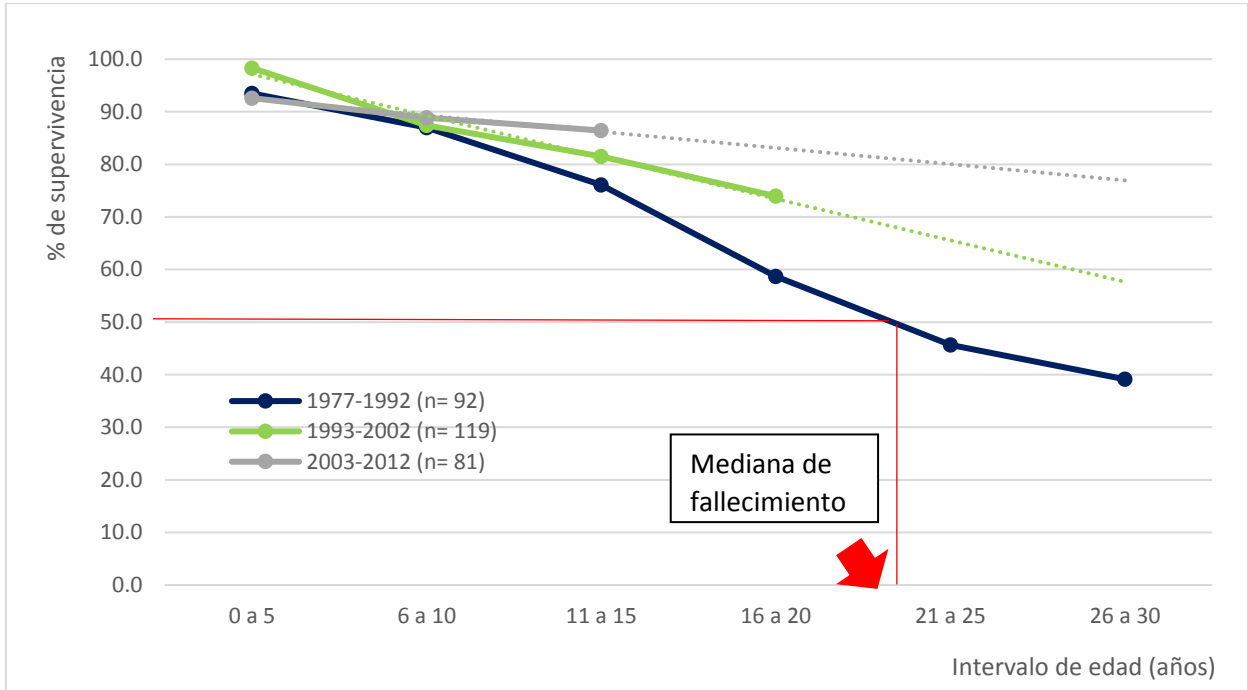
Las curvas de supervivencia se realizaron estratificando a la población por año de nacimiento en 3 diferentes cohortes: 1977-1992 (cohorte 1), 1993-2002 (cohorte 2) y 2003-2012 (cohorte 3). Los individuos nacidos después del 2012 no fueron incluidos por no contar con la edad requerida para el análisis.

La cohorte 1977-1992 es la única en la que han fallecido el 50 % de los pacientes, por lo que es la única en la que se logró obtener la mediana de edad de supervivencia que fue de 21 años. En las otras dos cohortes, la mediana de edad de supervivencia es estimada y en ambos casos fue mayor a los 30 años. Al comparar las 3 cohortes se observó que la pendiente disminuye conforme aumenta la fecha de nacimiento, lo que sugiere que la probabilidad de supervivencia es mayor en los pacientes con FQ nacidos en años recientes (Gráfica 3).

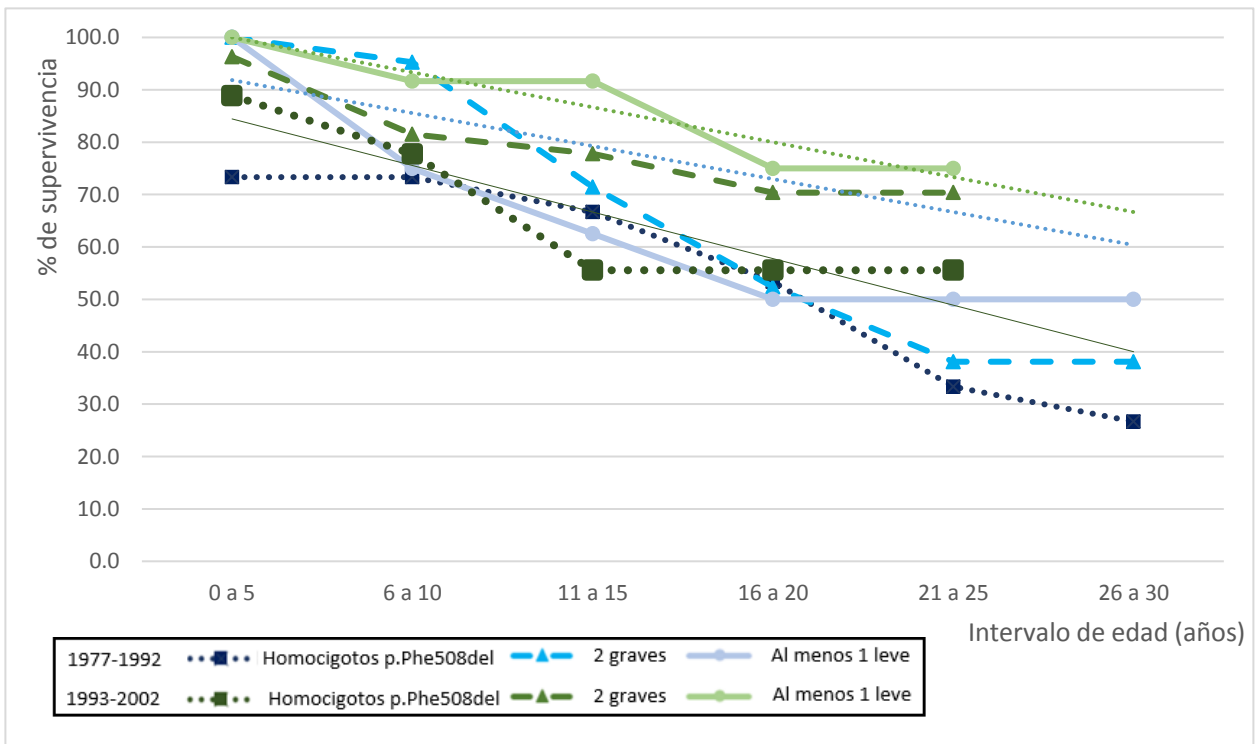
Las curvas de supervivencia por genotipo mostraron que en la primera cohorte (1977-1992) la mediana de supervivencia fue de entre 16-20 años para los 3 grupos (homocigotos p.Phe508del, 2 variantes graves y al menos una leve). Interesantemente, se observó que en edades más avanzadas los pacientes homocigotos p.Phe508del presentaron una probabilidad de supervivencia <30 %, mientras que en los pacientes con al menos una variante leve esta fue de 50 %. En cambio, en la cohorte 2 (1993-2002) desde los primeros años de vida los pacientes homocigotos p.Phe508del presentan una menor probabilidad de supervivencia que los otros dos genotipos; tendencia que se mantiene en los siguientes años de vida (Gráfica 4).

Al comparar los genotipos entre cohortes se observó que los homocigotos p.Phe508del presentaron la misma mediana de supervivencia (16-20 años), se observó que estos pacientes al nacer entre 1993-2002 tienen una mejor probabilidad de supervivencia que los nacidos entre 1977-1992. Estas diferencias entre cohortes se mantienen para los otros genotipos (Gráfica 4).

Gráfica 3. Curva de supervivencia por cohorte



Gráfica 4. Curva de supervivencia por genotipo



DISCUSIÓN

En México se estima que cada año nacen aproximadamente 400 niños con FQ, de los cuales solo el 15% es diagnosticado con vida, mientras que el resto fallece antes de cumplir los 4 años por complicaciones respiratorias y desnutrición. Aunado a esto, no todos los pacientes con diagnóstico clínico cuentan con un estudio molecular, por lo que no conocen su genotipo y no son candidatos a los nuevos tratamientos dirigidos a variantes específicas en *CFTR*. El diagnóstico molecular puede complicarse debido a que la metodología más empleada por los laboratorios son los paneles comerciales como el INNO-LiPA®, que fue diseñado para población caucásica. Este panel identifica un total de 36 VP de las cuales solo 20 se han reportado en mexicanos y no incluye algunas de las más comunes en nuestra población como la p.Ser549Asn y la p.Asn386Ilefs*3. En México, la TDet es de alrededor del 77% [29] empleando distintos métodos para la búsqueda de variantes, por lo que es necesario identificar el espectro total de variantes en la población mexicana con FQ para contribuir a un mejor tratamiento y manejo clínico de los pacientes.

Para la identificación de variantes en este estudio se utilizó una estrategia en 3 etapas consecutivas siguiendo las recomendaciones de la guía europea de diagnóstico molecular de FQ [51]. En la primera etapa, se empleó mutagénesis dirigida para la búsqueda de las 5 VP más comunes en la población mexicana, técnica que presenta la ventaja de ser simple y rápida. La siguiente etapa, consistió en la secuenciación completa del gen *CFTR*, la cual permitió la identificación tanto de variantes nuevas como conocidas con una alta especificidad, pero el costo aun es elevado e inaccesible para algunos pacientes, además de tener la desventaja de no detectar rearrreglos cromosómicos complejos. La última etapa (MLPA) se empleó para la detección de variantes en el número de copias, cuya frecuencia es de 1-2% en los alelos de FQ [52].

Mediante la búsqueda de las 5 VP más comunes reportadas previamente en población mexicana se obtuvo una TDet del 58.0%. Realizando la secuenciación completa del gen la TDet aumentó a un 83.9% y finalmente, utilizando el MLPA para rearrreglos complejos se incrementó esta tasa hasta el 85.4%. La estrategia utilizada en este estudio permitió la mayor TDet hasta ahora reportada para la población mexicana con un total de 85 VP (tomando en cuenta todos los estudios) identificadas en *CFTR*.

Las TDet en FQ varían dependiendo de las metodologías empleadas y de la población de estudio. El American College of Medical Genetics recomienda un panel de 23 VP, el cual es de gran utilidad en judíos Ashkenazi, ya que permite una TDet del 94%, pero no es útil para otras poblaciones ya que en hispanos y afroamericanos solo identifica los dos alelos causales en un intervalo de 43% a 53% de los pacientes con FQ [52]. En mexicanos, este panel no es recomendado, ya que solo incluye 19 de las variantes reportadas para nuestra población y no detecta algunas de las más frecuentes.

Hasta ahora, las mejores TDet se han obtenido mediante el uso combinado de varias metodologías; secuenciación Sanger de los 27 exones, las regiones intrónicas alrededor de los exones y las variantes intrónicas profundas conocidas, y la búsqueda de rearrreglos cromosómicos complejos mediante MLPA [53]. Recientemente, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se han vuelto más accesibles abriendo la oportunidad de utilizarlas en el diagnóstico molecular de FQ en diferentes poblaciones. Por mencionar algunos ejemplos, en las poblaciones europeas la secuenciación completa del gen *CFTR* ha permitido TDet de entre 97-99.5 % [54–56], identificando variantes nuevas incluso, a nivel mundial. No obstante, las técnicas de secuenciación tienen la desventaja de no identificar rearrreglos genómicos grandes como deleciones o inserciones de exones completos, los cuales se han reportado con una frecuencia de entre 1.0 y 2.0% en los alelos causales en FQ [52].

En este estudio se obtuvo una TDet del 85.4 % con 72 VP, algo similar a lo observado en la población polaca; 82.5 % con 75 VP [57]. En poblaciones latinas, las TDet más altas se han reportado en Brasil con un 97.2% y un espectro de 45 VP [31] y en Argentina con un 91.0 % y 34 VP [58], mientras que las más bajas se reportan en Chile (TDet del 42.0 % con 14 VP) [59] y en Perú (TDet del 30.6 % con 3 VP) [60].

Los estudios anteriores sugieren que entre mayor es el número de VP presentes en la población menor es la tasa de detección, por lo que es importante un enfoque especializado y dirigido, además de la utilización de diferentes metodologías ya que con una sola no es posible detectar todo el espectro de variantes. En poblaciones con una gran heterogeneidad alélica, como lo ha mostrado ser México, es necesaria una estrategia que considere además de lo antes mencionado, aspectos prácticos y económicos para un diagnóstico molecular rápido y accesible. En este estudio se sugiere una lista de 25 VP (Tabla 7) que podrían incluirse en un panel dirigido a la población mexicana o bien, buscarse dirigidamente mediante técnicas como secuenciación Sanger o mutagénesis dirigida, con el cual se obtendría una tasa de detección del 74.6 % y posteriormente, solo en algunos casos realizar la secuenciación completa del gen y el MLPA, considerando los resultados de este trabajo en el que se identificaron VP de muy baja frecuencia, así como nuevas y exclusivas de una familia.

Tabla 7. Panel de 25 variantes recomendado para la población mexicana

Variante	Frecuencia (%)
p.Phe508del	46.07
p.Gly542*	6.25
p.Asn1303Lys	2.14
p.Ile507del	1.96
p.Asn386Ilefs*3	1.79
p.Ser549Asn	1.61
p.Ser945Leu, p.Trp1204*	1.43
p.Arg75*, p.Gly1323_Val1415del	1.07
c.274-1G>A, p.Arg334Trp	0.89
c.165-1G>A, p.Gly85Glu, c.579+1G>T, p.Ser641Argfs*5, c.2988+1G>A, p.Trp1089*	0.71
p.Gln98Arg, c.489+1G>T, c.1116+1G>A, p.Ala561Serfs*15, p.Gly1047Alafs*13, c.3140-26A>G, c.3717+1219C>T	0.54

De las 72 VP identificadas en este estudio, el 70.8 % (51) se encuentra en región codificante. El resto de las variantes se identificaron en los límites intrón-exón (14), en regiones intrónicas profundas (4) y solo una, en la región del promotor. Del total de variantes, el 36.1 % son variantes de cambio de sentido, el 24.9 % afectan el splicing, el 29.2 % producen codones de paro prematuros, el 5.6% son deleciones o inserciones pequeñas que no alteran el marco de lectura, el 2.8 % son rearrreglos grandes y el 1.4% son variantes que afectan el nivel de expresión.

Las frecuencias alélicas obtenidas son similares a lo reportado anteriormente en población mexicana. La variante más frecuente fue la p.Phe508del, siendo esta la más común a nivel mundial con un 60 % de los alelos de FQ [27]. En diversos estudios se ha reportado que esta variante tiene un origen único europeo de, al menos 3,000 años de antigüedad [61] y que se distribuyó mediante las migraciones mostrando actualmente un gradiente descendiente de frecuencia de norte a sur en Europa. En México, esta variante se encuentra en mayor frecuencia en el norte del país comparado con el sur lo cual correlaciona con que la proporción de ancestría europea también es mayor en el norte del país [62].

Las siguientes variantes más frecuentes en nuestra población fueron la p.Gly542* (6.25 %) y la p.Asn1303Lys (2.14 %), similar a lo reportado en españoles [63]. Ambas variantes tienen un origen único en la población fenicia [27] encontrando las frecuencias más altas reportadas en Líbano (p.Gly542*: 1.3% y p.Asn1303Lys: 9.4 -27.0 %) y en poblaciones de la costa del mediterráneo como Túnez, Argelia y las regiones del sur de España e Italia que fueron importantes centros comerciales de los fenicios [25]. Estas variantes también se han identificado dentro de las más frecuentes en otros países del sur de América como Argentina, Brasil y Chile, lo que

sugiere que probablemente fueron introducidas en estas poblaciones a través del mestizaje con los europeos en los siglos XVI-XVII [28] .

Además de las ya mencionadas, se identificaron otras siete variantes con una frecuencia mayor que 1.0%, de las cuales la p.Asn386Ilefs*3 y la p.Ser945Leu son nuevas para la población mexicana. En un estudio realizado en Estados Unidos en el que dividen a los pacientes por ancestría en hispanos, negros, asiáticos y nativos americanos, reportaron las 50 variantes causales más comunes para cada grupo. Algunas de estas variantes fueron compartidas, mientras que otras se encontraron restringidas a uno de los grupos étnicos [64]. Interesantemente, la población hispana presentó veinte variantes exclusivas, de las cuales: c.274-1G>A, c.1116+1G>A, p.Asn386Ilefs*3, p.Ser641Argfs*5, p.Trp1089* y p.Trp1204* fueron identificadas en nuestro análisis con una frecuencia >0.5%. El estudio mencionado es un ejemplo de la amplia variabilidad que existe en los espectros de variantes aun dentro de un mismo país. Por otro lado, y con base en la información recabada existen variantes que están restringidas a ciertas poblaciones; la variante p.Asn386Ilefs*3 puede ser exclusiva de hispanos ya que además de en nuestra población, únicamente se encuentra reportada en la base CFTR1 en dos pacientes de origen hispano (uno en forma homocigota y otro heterocigoto) y en la base del ExAC en 3 portadores latinos de 59,277 individuos analizados.

Por otro lado, las variantes p.Arg334Trp, c.579+1G>T y p.Ile507del, identificadas con una frecuencia mayor que 0.5% también se han observado en los españoles con frecuencias similares [63]. En tanto que la p.Ser945Leu solo se ha reportado en las poblaciones finlandesa y francesa con frecuencias similares [27,55]. En el espectro latinoamericano, además de las más comunes a nivel mundial (p.Phe508del, p.Gly542* y p.Asn1303Lys), existen otras variantes frecuentes como p.Trp1282* y p.Arg1162*. En tanto que otras, tienen bajas frecuencias (<1.0%) pero también se comparten entre los diferentes países como p.Arg75*, c.274-1G>C, c.489+1G>T, c.579+1G>T, p.Arg334Trp, p.Ile507del, p.Ser549Arg, p.Ser549Asn, p.Ser641Argfs*5, c.2988+1G>A, p.Trp1089* y c.3717+1219C>T [28]. Particularmente la c.2988+1G>A, se ha reportado en poblaciones con un alto componente africano como Brasil [31].

Hoy en día, los estudios funcionales toman cada vez mayor relevancia para determinar la patogenicidad de las variantes intrónicas y exónicas. Nuestro estudio identificó dos variantes intrónicas profundas cuya patogenicidad se había determinado gracias a los estudios funcionales realizados en población española (c.1680-886A>G) [65] e italiana (c.1680-877G>T) [48]. La variante c.1680-886A>G, con una frecuencia del 2.0% en población española, crea un nuevo sitio donador de splicing que resulta en la inclusión de un pseudoexón de 49 pares de bases produciendo una proteína con un codón de paro prematuro. De manera similar, la c.1680-877G>T activa un sitio donador de splicing crítico generando la inclusión de un pseudoexón de 53 pares de bases y una proteína trunca (p.Ala561Serfs*15). Esta última fue identificada en dos pacientes de ancestría hispana con un fenotipo

grave. Adicionalmente, encontramos otras dos variantes intrónicas (c.3140-26A>G y c.3717+1219C>T) reportadas previamente en población mexicana que activan sitios aceptores de splicing crípticos. La identificación de estas cuatro variantes contribuye a resaltar la importancia de analizar las regiones intrónicas profundas ya que, en nuestra población, estas variantes constituyen el 2.4 % de los alelos. Es importante señalar que, dentro de los pacientes en los que no se han identificado los alelos causales, existen portadores de variantes intrónicas profundas cuya significancia funcional se desconoce pero que podrían alterar el splicing canónico. Aunado a lo anterior, es importante resaltar que en todas las variantes (nuevas o conocidas) de las que se desconozca su función es importante realizar este tipo de estudio, ya que día a día se identifica su patogenicidad. Como ejemplo se encuentran las variantes que alteran el splicing canónico recientemente reportadas en la población italiana (c.1584+18672A>G), en la francesa (c.1680-883A>G, c.2989-313A>T, c.3469-1304C<G y c.3874-4522A>G) y en la hispana (c.1679+1643G>T) [53,66,67]. Los análisis funcionales están fuera de los objetivos de este estudio, sin embargo, es indiscutible la importancia de combinar estrategias para elucidar los efectos de las variantes y caracterizar su relación con la patogénesis de las enfermedades genéticas.

La variante c.2822delT (p.Leu941Glnfs*27) no se encontró reportada en las bases de datos de FQ, sin embargo realizando una búsqueda específica en PubMed se encontró en un estudio en población de California [49]. En este trabajo se reportan dos pacientes homocigotos de ancestría hispana referidos por presentar valores elevados de TIR e íleo meconial. Uno de ellos, fue diagnosticado durante el primer año de vida y el otro a los 4 años, los valores de cloruros eran de 82 y 94 mmol/l y ambos presentaron cultivos positivos para *P. aeruginosa* y *S. aureus*. El paciente de este estudio, heterocigoto compuesto p.[Leu941Qfs*27]+[Arg75*], presentó IP y un nivel de cloruros en sudor de 120 mmol/l, desconocemos si presenta cultivos positivos para *P. aeruginosa* y *S. aureus* por lo que no podemos profundizar en la correlación genotipo-fenotipo.

La metodología de MLPA, nos permitió identificar dos rearrreglos complejos, una delección de los exones 25 y 26 (p.Gly1323_Val1415del) reportada previamente en población francesa [68] y una duplicación nueva de cuatro exones (CFTRdup18_21). Esta duplicación nueva se encontró en dos pacientes heterocigotos compuestos; una paciente de 4 años, con un nivel de cloruros de 121 mmol/l y en una paciente de 2 meses referida por TIR elevado e íleo meconial que presenta IP. Los puntos de ruptura se están analizando por lo que no se ha realizado el análisis *in silico*.

De las variantes nuevas a nivel mundial, ocho se identificaron en un solo paciente; seis en forma heterocigota (c.1116+5T>A, p.Ser431Phe, p.Cys832Phe, p.Leu967Trp, c.3469-1G>A y p.Leu1346Gln), una en forma homocigota (p.Thr1263Metfs*15) y una, p.Glu588* fue *de novo*. Los pacientes portadores de p.Ser431Phe, p.Cys832Phe, p.Leu967Trp y c.3469-1G>A presentaron una variante

grave en el otro alelo e IP, lo que sugiere que estas variantes producen un fenotipo grave, aunque es necesario realizar un análisis funcional para determinar el efecto en la proteína. En relación a las variantes c.1116+5T>A y p.Leu1346Gln, ambas se identificaron en pacientes portadores de p.Phe508del y que clínicamente presentaron SP; dado que p.Phe508del es grave y nuestros pacientes son SP nosotros sugerimos que muy probablemente sean variantes patogénicas leves.

El paciente homocigoto para la variante c.3788delC (p.Thr1263Metfs*15) presentó síntomas a partir del primer año de vida, cloruros en sudor de 80 mmol/l, IP y colonización crónica por *P. aeruginosa*. La delección de citosina en la posición 3788 del cDNA altera el marco de lectura y produce un codón de paro prematuro. Este tipo de variantes, son detectadas en el RNA mensajero mediante el mecanismo denominado degradación de RNA mensajero mediado por codones de paro que evita que se generen proteínas truncas, por lo que no se lleva a cabo el proceso de traducción [69]. Dado el defecto molecular y la sintomatología del paciente, esta variante produce un fenotipo grave.

En relación a la variante *de novo*, p.Glu588*, fue identificada en un paciente heterocigoto compuesto con la variante p.Trp1089*. El paciente presenta un fenotipo grave con IP, lo cual es de esperarse dado que ambas variantes son de clase I. A la fecha se han reportado 9 casos de variantes *de novo* en el gen *CFTR* con una incidencia de 1/1100 alelos de FQ [56,70–74]. Interesantemente, todas las variantes *de novo* se han identificado en el alelo paterno, al igual que en este caso. Dado que en la literatura se ha reportado que existe una mayor tasa de mutación en las células germinales paternas conforme aumenta la edad [75,76] esto se ha relacionado con la edad del padre en el momento de la concepción. El padre de este paciente tenía 37 años al momento de la concepción y solo en otros dos casos se reportan las edades de los padres (25 y 32 años). En FQ, aun no existe suficiente información para elucidar si existe una relación entre las mutaciones *de novo* y la tasa de mutación en células germinales. Para confirmar el origen de la mutación sería de gran utilidad la secuenciación de las células germinales, sin embargo, esto no ha sido posible por la dificultad para obtener la muestra por decisiones personales de los padres o por que estos se han realizado la vasectomía.

Respecto a las variantes nuevas que se identificaron en más de un individuo: c.580-2A>G se identificó en dos pacientes. La primera, una paciente femenina cuya edad de inicio de síntomas fue de 3 años con IP y con p.Gly542* en el otro alelo y en un paciente masculino en combinación con p.Trp1204* en el otro alelo, del que no se cuenta con información de sus manifestaciones clínicas. Esta variante se localiza en el sitio aceptor de *splicing* del exón 6 y altera el dinucleótido canónico AG. El análisis *in silico* predice que altera el proceso de *splicing* y es probable que la consecuencia funcional sea la exclusión del exón 6, ya que las variantes que afectan los sitios aceptores o donadores de *splicing* pueden producir que los exones canónicos sean saltados produciendo un RNA mensajero defectuoso que genere una proteína no funcional [77]. Este tipo de variantes, enlistadas en la clase I

(síntesis defectuosa) y se consideran graves, lo cual coincide con el fenotipo observado en la paciente.

La variante c.[1066_1071delCTTTGG;1072G>A] se identificó en dos pacientes: uno femenino que presentó síntomas a partir de los 8 años y fue diagnosticada a los 15 años con un nivel de cloruros de 82 mmol/l, IP, colonización crónica por *P. aeruginosa* con p.Phe508del identificada en el otro alelo y un paciente cuyos síntomas comenzaron a los 2 años, con dos pruebas de cloruros en sudor (99 y 113 mmol/l) y con IP (no se ha identificado el otro alelo causal). Esta variante produce la eliminación de los aminoácidos triptófano y alanina en las posiciones 356 y 357 de la proteína y un cambio en la posición 358 de valina por isoleucina. La eliminación de estos aminoácidos del dominio MSD1 de la proteína probablemente alteren las interacciones necesarias para el plegamiento y la estabilidad.

La variante c.3139delG (p.Gly1047Alafs*13) se identificó en 3 pacientes heterocigotos compuestos. El primero, presenta IP y p.Ser945Leu en el otro alelo. El segundo paciente presenta p.Phe508del en el otro alelo, pero no cuenta con información clínica. Y el tercero, referido por íleo meconial, presenta IP y dos pruebas de cloruros en sudor de 116 y 118 mmol/l con una variante en el promotor en el otro alelo (c.-869T[8_9]). Esta variante es de clase I y los pacientes presentan características clínicas graves de acuerdo con dos variantes graves.

La c.3230_3231delTG (p.Phe1078Profs*77) se encontró en dos pacientes. La primera es una paciente diagnosticada a los 3 meses que presenta IP y una variante de splicing en el otro alelo (c.165-1G>A) y el segundo paciente fue un niño cuyos síntomas comenzaron durante el primer año de vida, con 101 mmol/l de cloruros en sudor, infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, IP y otra variante que produce un codón de paro prematuro en el otro alelo (p.Asn386Ilefs*3). Dado que la variante produce un codón de paro prematuro y ambos pacientes presentan IP sería grave de clase I.

Solo 3 de las variantes nuevas se encontraron en la base de datos de ExAC (en esta base se encuentran los exomas de individuos incluidos en estudios de genética de poblaciones y enfermedades que no incluyen a la FQ). La variante c.580-2A>G en forma heterocigota en 2 individuos europeos y un latino. En tanto que p.Gly1047Alafs*13 y p.Phe1078Profs*77 se identificaron solo en un individuo latino cada una de 11394 y 11360 alelos analizados, respectivamente, por lo que estas pudieran ser específicas de población latina.

Hasta ahora, se han identificado un total 85 variantes distintas en *CFTR* en población mexicana, lo cual la coloca entre las poblaciones con mayor heterogeneidad alélica a nivel mundial, después de países como Estados Unidos y Francia, lo cual implica un reto para la identificación y la caracterización funcional de las variantes presentes en la población.

A pesar de que la FQ es una enfermedad mendeliana, la correlación genotipo-fenotipo es complicada debido a su gran heterogeneidad en la expresión fenotípica.

Aunado a esto, es importante considerar las distintas de variantes, los alelos complejos así como la contribución de los genes modificadores y factores ambientales (humo de cigarro y microorganismos patógenos, contaminación, clima, estatus socioeconómico y nutrición) [78]. El enfoque más utilizado para este tipo de correlación es por la clasificación de las variantes en *CFTR* en seis clases dependiendo del efecto que presentan en la proteína, lo que conduce a determinar variantes que resultan en fenotipos graves y leves. Por otro lado, existen manifestaciones clínicas prevalentes, como la infertilidad masculina y los niveles de cloro en sudor, que al encontrarse alterados en la mayoría de los pacientes son un parámetro decisivo para el diagnóstico de la enfermedad [79].

La correlación del genotipo-fenotipo en nuestro estudio mostró que los valores más elevados de cloruros en sudor estuvieron presentes en los pacientes homocigotos p.Phe508del y los menores en los pacientes con al menos una variante leve, similar a lo que reportan otros estudios en los que hacen la misma estratificación [80]. Interesantemente, uno de los pacientes cuyo genotipo fue c.[3266G>A]+[3717+1219C>T] presentaba niveles de cloruros limítrofes (51.8 mmol/l). La variante c.3717+1219C>T es de clase V y, de acuerdo con la literatura, se ha identificado en pacientes que no presentan niveles elevados de cloruros en sudor [27], lo que resalta la importancia de estudiar a los pacientes con resultados limítrofes en la prueba. Así mismo, cabe considerar que pueden existir diferencias en los niveles de cloruros no solo por el genotipo sino también por la edad, el sexo y la cantidad de sudor recolectada [81].

Mientras que el desarrollo de la enfermedad pulmonar es el rasgo clínico más prevalente en la FQ, la tasa de decaimiento de la función pulmonar, la severidad y la edad en que se presentan colonizaciones crónicas bacterianas es altamente variable [79]. No obstante, los pacientes con variantes de clase I-III generalmente presentan mayor deterioro de la función pulmonar y una disminución más rápida de FEV₁ que aquellos con variantes de clases IV y V [79]. Así, la severidad de la enfermedad pulmonar es influenciada tanto por el genotipo en *CFTR* como por factores ambientales y variantes en genes modificadores; la heredabilidad no asociada a *CFTR* para la gravedad de la enfermedad pulmonar se estima entre el 0.54 y 0.80 [82,83]. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la función pulmonar entre los 3 grupos estratificados por genotipo, sin embargo, se observó que los pacientes con dos variantes graves presentaban menores valores de FEV₁ y CVF comparados con los pacientes con una variante leve lo que concuerda con lo reportado en la literatura. En relación a la colonización por *P. aeruginosa* no encontramos correlación con el genotipo, probablemente se deba a otros factores externos, como la exposición a agentes infecciosos, contaminación ambiental, exposición al humo de tabaco y variantes en genes modificadores ya que, recientemente se reportó en población mexicana la asociación de la severidad de la enfermedad pulmonar con variantes en los genes *MLB2* (rs11003125 y rs5030737) y *ADRB2* (rs1042713), ambos relacionados con la

respuesta inmune [84]. Dado que el fallo pulmonar es la principal causa de muerte en pacientes con FQ es necesario profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad respiratoria, así como los factores que contribuyen a su manifestación en población mexicana para desarrollar tratamientos que mejoren tanto la calidad como la sobrevivencia de los pacientes.

Se estima que el 20% de los pacientes con FQ presentan íleo meconial, en nuestra población se presentó en el 23.4% (34 pacientes), todos con dos variantes graves, lo que concuerda con la literatura ya que solo se ha observado la presencia de esta complicación en pacientes con dos variantes graves [85]. No obstante, también entre pacientes con dos variantes graves se ha reportado heterogeneidad en la expresión del íleo meconial, siendo más predominante en los portadores de las variantes p.Gly542* y p.Phe508del que en aquellos con p.Gly551Asp[85]. En nuestro estudio, 19 pacientes con íleo meconial fueron homocigotos p.Phe508del y 9 fueron portadores de p.Gly542*: dos en forma homocigota, cinco en combinación con p.Phe508del y dos en combinación con p.Asn1303Lys. Sin embargo, se ha demostrado que algunas variantes en genes modificadores pueden influir en la presencia de íleo meconial con una heredabilidad no relacionada con *CFTR* de >0.80 [79]. Dentro de los genes que han resultado asociados con un mayor riesgo a desarrollar íleo meconial se encuentran principalmente *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC9A3* y *MSRA* [85]. *SLC9A3* y *SLC6A14* (que codifican proteínas transportadoras de solutos) también se han asociado con la severidad de la enfermedad pulmonar y con la edad de la primera infección con *P.aeruginosa* [86].

La falta de funcionalidad de *CFTR* en páncreas produce pérdida de la función exocrina que se refleja en una mala absorción de nutrientes y grasa, así como en un aumento en el riesgo de desarrollar diabetes asociada a FQ [87]. Cuando la función exocrina es menor que el 5% se observa que los pacientes cursan con IP y que la mayoría son portadores de variantes de clases I-III. Por el contrario, cuando los pacientes son SP (es decir, función exocrina $>5\%$) principalmente presentan variantes de las de clases IV-VI [88]. En nuestra población, del 90.3% que cursó con IP, todos fueron portadores de 2 variantes graves excepto uno, mientras que en los pacientes con al menos una variante leve se presentó la IP en el 45.8%. Estudios previos en población mexicana han reportado que el 83.5% de los pacientes presentan IP, y aunque la mayoría tiene dos variantes graves, se identificaron 9 pacientes con al menos 1 variante leve, observándose IP en el 34.6% de los pacientes con al menos 1 variante leve [89]. Las discrepancias entre pacientes con variantes leves y la presentación de IP se han reportado también en otras poblaciones, como la francesa y la rusa en donde el 24% y el 7.9% (respectivamente) de los pacientes con al menos una variante leve presentaron IP [90,91]. Inclusive, se han observado diferencias en el estatus pancreático entre hermanos con el mismo genotipo en variantes como p.Arg334Trp[83], que también se asoció con IP en 4 de 12 pacientes españoles heterocigotos compuestos para esta variante [92]. Así, existen variantes leves que se asocian con un fenotipo

pancreático variable como la ya mencionada o p.Gly85Glu [33], que en nuestra población se identificó en 2 pacientes con IP y uno con SP. Dentro de las posibles explicaciones para estas diferencias se han propuesto diferencias en la expresión o la funcionalidad de la proteína tejido-específicas, como procesos de splicing alternativo o la edad de los pacientes [90]. Por otro lado, se ha reportado que los pacientes SP pueden eventualmente presentar IP; en un estudio en población de Israel reportan 4 casos con los genotipos p.[Phe508del]+[Gly85Glu], p.[Trp1282*]+[Ile1234Val], p.[Trp1282*]+[Gly85glu] y p.[Asp1152His]+[5T] en los que hubo un cambio de estatus pancreático a los 12, 14, 22 y 34 años, respectivamente [88].

A pesar de que la función pancreática endógena usualmente se conserva durante la infancia, en años posteriores la destrucción progresiva del parénquima secretor puede resultar en el desarrollo de diabetes asociada a FQ [9]. De ahí que el desarrollo de diabetes sea dependiente de la edad; raramente se presenta durante la niñez mientras que al menos el 25% de los adultos si la presenta. Además del riesgo asociado con la edad se han identificado otros factores de riesgo para su manifestación como: la IP, dos variantes graves, una función pulmonar e índice de masa corporal reducidos y el uso de esteroides [93]. Todos los pacientes que cursaron con diabetes en este estudio (15) presentan IP y colonización crónica por *P. aeruginosa* y solo uno presenta en su genotipo una variante leve. La mayoría (10) fueron diagnosticados con diabetes después de los 18 años, en tanto que los cinco en los que se presentó durante la niñez tienen dos variantes graves y las edades de diagnóstico fueron 7, 10, 13, 13 y 14 años. No parece haber relación entre la presencia de íleo meconial y el desarrollo de diabetes ya que solo 3 pacientes lo presentaron al nacer. El tratamiento adecuado de la diabetes asociada a FQ mejora el estado nutricional de los pacientes y la función pulmonar, por lo que el entendimiento de esta complicación es esencial para mejorar la supervivencia en años posteriores [93] considerando además que esta complicación se asocia con mayor mortalidad [9].

A pesar de la complejidad de establecer correlaciones entre el genotipo en *CFTR* y las manifestaciones clínicas, en resumen, se puede decir que los pacientes con dos variantes graves presentan IP, valores más elevados de cloruros en sudor, mayor deterioro pulmonar y son los únicos entre los que se presenta el íleo meconial. Mientras que aquellos con al menos una variante leve son en su mayoría SP y presentan un fenotipo menos grave. El rasgo que presentó mayor variabilidad entre genotipos fue el desarrollo de diabetes que está estrechamente relacionado con la edad y factores ambientales. Así, la contribución del genotipo en *CFTR* es más determinante en algunas de las manifestaciones clínicas (nivel de cloruros en sudor y función pancreática), mientras que parece tener menor influencia en otras como íleo meconial al nacer y diabetes. Recientemente se ha observado que también las mejoras en el tratamiento médico (que han aumentado considerablemente en años recientes) influyen en la expresión clínica de la enfermedad [83].

La mayoría de los estudios de correlación genotipo-fenotipo se han realizado a nivel de manifestaciones clínicas, y su importancia es incuestionable en cuanto a significancia práctica, pero también es necesario señalar sus limitaciones respecto al entendimiento de los procesos y mecanismos que subyacen en los fenotipos particulares. Esto se debe a que el fenotipo de FQ es el resultado de múltiples interacciones entre procesos que ocurren a nivel de relaciones entre múltiples genes y otros factores tanto ambientales como estocásticos [94].

A partir de la identificación del gen *CFTR* y de la caracterización de la FQ se comenzaron a llevar registros nacionales de la enfermedad que han permitido análisis epidemiológicos y de supervivencia en los pacientes. Dentro de las ventajas de estos, está el número de pacientes registrados, la cobertura a nivel nacional y el seguimiento de los pacientes. Además, estos estudios son de gran importancia, ya que los estimados de supervivencia son un parámetro importante para la consideración de los pacientes candidatos a trasplante de pulmón ya que las guías internacionales recomiendan que el procedimiento se lleve a cabo solo si la esperanza de vida es menor o igual a 2 años [95]. Dentro de los registros más antiguos de este tipo está el de Estados Unidos, establecido en 1966 y que hoy cuenta con información de más de 48,000 individuos con FQ [96].

Entre los parámetros de supervivencia usualmente reportados por los registros se encuentran el porcentaje de la población que llega a la edad adulta, la edad media de fallecimiento y la mediana de supervivencia. A pesar de que todas son medidas de supervivencia, sus significados son distintos y la información de la que parten también. La proporción de adultos solo considera a la población viva; la edad media de fallecimiento considera únicamente a los pacientes fallecidos y no brinda información sobre si los individuos vivos han aumentado su tiempo de vida. La edad media de fallecimiento fluctúa con la estructura de edad de la población y es menos informativa cuando las tasas de mortalidad son bajas, lo cual complica las comparaciones entre registros de distintos países dado que la distribución de edad de las poblaciones es distinta. En cambio, la mediana de supervivencia se ha considerado un parámetro más confiable para las estimaciones de supervivencia y las comparaciones, ya que a pesar de considerar que la tasa de mortalidad se mantiene constante, se calcula tomando en cuenta tanto a los individuos fallecidos como a los vivos. La edad mediana de supervivencia se obtiene de curvas de supervivencia que se construyen a partir del cálculo de tasas de mortalidad edad-específicas y es la edad más allá de la cual se espera que vivan el 50% de los pacientes con FQ [97]. Existen dos aproximaciones para realizar este tipo de curvas: por periodo o por cohorte de nacimiento. La primera provee información más relevante para estimados de pacientes nacidos en la actualidad, mientras que la segunda es más apropiada para comparar tendencias de supervivencia entre distintas cohortes de nacimiento [98]. Los estadísticos calculados en este estudio corresponden al segundo tipo, por lo que se refieren a las posibilidades de vivir más allá de una edad específica dependiendo del año de nacimiento.

Una de las complicaciones para obtener la edad mediana de supervivencia es que el 50% de la cohorte debe haber fallecido; de las 3 cohortes en este estudio únicamente en la primera (1977-1992) se pudo realizar el cálculo que fue de 21 años, encontrándose un poco más baja comparada con la mediana de supervivencia de los Estados Unidos, donde para los individuos con FQ nacidos entre 1986 y 1992 es de 28-29 años [99]. Para las otras dos cohortes del estudio (1993-2002 y 2003-2012), se estimó mayor que 30 años, algo muy similar a lo que reportan en Estados Unidos para las cohortes de 1993-1997 (30 años) y las de 2010-2014 (40 años).

A partir de las curvas de supervivencia obtenidas se observa que la probabilidad de supervivencia aumenta en los individuos nacidos más recientemente. Este aumento, también observado a nivel mundial, se relaciona con edades de diagnóstico más tempranas, al mayor conocimiento de los factores externos que influyen en la enfermedad, la implementación del tamiz neonatal (en nuestro país), y al desarrollo de nuevos medicamentos. Por ejemplo, dentro de los factores externos que contribuyen a mejorar la calidad de vida de los pacientes, se encuentra la dieta. Un estudio realizado en Toronto y Boston evidenció que aquellos pacientes con una dieta alta en grasas y calorías presentaban mejor estado de salud por lo que en la actualidad, las guías de manejo de la enfermedad recomiendan este tipo de alimentación [96].

La mayor causa de muerte en FQ es el fallo pulmonar, por lo que la supervivencia es afectada principalmente por la naturaleza y progresión de la enfermedad pulmonar y se ha correlacionado con otros factores de riesgo como el genotipo en *CFTR*. Los pacientes con variantes leves (IV y V) presentan una mayor supervivencia que aquellos con variantes graves principalmente por una menor enfermedad pulmonar [94]. Al realizar las curvas de supervivencia estratificando a los pacientes por genotipo (homocigotos p.Phe508del, dos variantes graves y al menos una variante leve) se observó que en la cohorte 1 (1993-2002) los 3 genotipos analizados presentan la misma mediana de supervivencia (16-20 años); sin embargo, en años posteriores (a los 26-30 años), los individuos homocigotos p.Phe508del presentan una probabilidad de supervivencia menor al 30% y los pacientes con dos variantes graves un 40%, mientras que aquellos con al menos una variante leve mantienen el 50%. En la cohorte 2 (1993-2002) solo los homocigotos p.Phe508del han alcanzado la mediana de supervivencia, que es igual a la de la cohorte 1 (16-20 años) mientras que a esa edad los pacientes con al menos 1 variante leve presentaron una probabilidad de supervivencia mayor al 70%.

Cabe mencionar que a pesar de que los estimados de supervivencia brindan información valiosa, son estimados a nivel de población por lo que no pueden aplicarse a nivel individual [97]. Cada caso debe considerarse de manera particular considerando toda la información disponible como historia clínica, genotipo y tratamientos recibidos.

CONCLUSIONES

- La tasa de detección fue de 85.4% utilizando la búsqueda dirigida de las 5 variantes más comunes, la secuenciación por NGS del gen *CFTR* y MLPA.
- Se identificaron 72 variantes causales de FQ: 24 no reportadas previamente en población mexicana y 13 variantes nuevas (una *de novo*), aumentando el espectro de variantes en mexicanos de 48 a 85.
- La variante más común en la población fue la p.Phe 508del, otras nueve variantes tuvieron una frecuencia mayor que 1.0% y el resto son variantes de baja frecuencia (35 se identificaron en un solo paciente).
- Se propone un panel de 25 variantes específico para población mexicana, con el cual se obtendría una tasa de detección de aproximadamente 75%, se abaratarían los costos y disminuirían los tiempos de diagnóstico.
- La correlación clínica permitió establecer diferencias en parámetros clínicos (cloruros en sudor, función pancreática e íleo meconial) entre los pacientes con dos con variantes graves y los pacientes con al menos una variante leve.
- En nuestros pacientes la mediana de supervivencia fue de 21 años para pacientes nacidos entre 1977 y 1992 y para las otras dos cohortes (1993 – 2002 y 2003-2012) se estimó en > 30 años.
- Los pacientes homocigotos p.Phe508del presentan una menor probabilidad de supervivencia que aquellos con una variante leve.

LITERATURA CITADA

- [1] Fern LL, Bustamante A, Guti R. Fibrosis Quística Guía clínica. 2015.
- [2] Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23.
- [3] Navarro S. Recopilación histórica de la fibrosis quística. *Gastroenterol Hepatol* 2016;39:36–42. doi:10.1016/j.gastrohep.2015.04.012.
- [4] Agnese, D I Sant, Darling, Robert C; Perera GA and SE. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953.
- [5] Quinton PM. Chloride impermeability in cusic fibrosis. *Nature* 1983;301:421–2.
- [6] Marker PDNA, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Moem JAN, Kennedy DAR, et al. Cystic Fibrosis Locus Defined by a Genetically Linked Polymorphic DNA Marker. *Science* (80-) 1985;230.
- [7] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon NO a, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification the Cystic Fibrosis Gene : Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* (80-) 1989;245:1066–73.
- [8] Rich, Devra P., Anderson, Mathew P., Gregory, Richard J., Cheng, Seng H. SP. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990;347:358–63.
- [9] Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:129–40. doi:10.1007/s00018-016-2393-9.
- [10] Gray VSMA, Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:93–115. doi:10.1007/s00018-016-2391-y.
- [11] Durie PR. The Pathophysiology of the Pancreatic Defect in Cystic Fibrosis. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;i:41–4.
- [12] Tsui L, Dorfman R. The Cystic Fibrosis Gene : A Molecular Genetic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013. doi:10.1101/cshperspect.a009480.
- [13] McCarthy VA, Harris A. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol* 2005;40:1–8. doi:10.1002/ppul.20199.
- [14] Lallemand D, Vuillaumier S, Dixmeras I, Messai H, Lapoume C, Gekas J, et al. Cross-species characterization of the promoter region of the cystic fibrosis tranmembrane conductance regulator gene reveals multiple levels of regulation. *Biochem J* 1997;327:651–62.
- [15] Williams SH, Mouchel N, Harris A. A comparative genomic analysis of the cow , pig , and human CFTR genes identifies potential intronic regulatory elements. *Genomics* 2003;81:628–39. doi:10.1016/S0888-7543(03)00089-2.
- [16] Mcdonald RA, Matrhewst RP, Idzerda RL, Mcknightt GS. Basal expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is dependent on protein kinase A activity 1995;92:7560–4.

- [17] Matthews RP, Mcknight GS. Characterization of the cAMP Response Element of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Promoter * 1996;271:31869–77.
- [18] Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis : CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;52:94–102.
- [19] Moran O. On the structural organization of the intracellular domains of CFTR. *Int J Biochem Cell Biol* 2014:1–8. doi:10.1016/j.biocel.2014.01.024.
- [20] Csanády L, Vergani XP, Gadsby DC. STRUCTURE, GATING, AND REGULATION OF THE CFTR ANION CHANNEL. *Physiol Rev* 2019:707–38. doi:10.1152/physrev.00007.2018.
- [21] Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell* 1990;63.
- [22] Hwang T-CC, Yeh J-TT, Zhang J, Yu Y-CC, Yeh H-II, Destefano S. Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. *J Gen Physiol* 2018;150:1–32. doi:10.1085/jgp.201711946.
- [23] Negoda A, El Hiani Y, Cowley EA, Linsdell P. Contribution of a leucine residue in the first transmembrane segment to the selectivity filter region in the CFTR chloride channel. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2017;1859:1049–58. doi:10.1016/j.bbamem.2017.02.014.
- [24] Zhang Z, Chen J. Atomic Structure of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Cell* 2016;167:1586-1597.e9. doi:10.1016/j.cell.2016.11.014.
- [25] Farhat R, Pasquet MC, Corbani S, Megarbané A, Kitzis A, Ladeveze V. Is Phoenicia the Origin of the N1303K CFTR Mutation ? *Int J Rare Dis Disord* 2019;2:4–7.
- [26] Casals T, Nunes V, Palacio A, Gim J, Gaona A, Mortal N. Cystic fibrosis in Spain : high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum Genet* 1993;91:66–70.
- [27] Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM, Jr MM, Jason P, et al. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002;19:575–606. doi:10.1002/humu.10041.
- [28] Pérez MM, Luna MC, Pivetta OH, Keyeux G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros* 2007;6:194–208. doi:10.1016/j.jcf.2006.07.004.
- [29] Chávez-Saldaña M, Yokoyama E, Lezana JL, Carnevale A, Macías M, Viguera RM, et al. CFTR allelic heterogeneity in Mexican patients with cystic fibrosis: implications for molecular screening. *Rev Invest Clin* 2010;62:546–52.
- [30] Ibarra-Gonzalez I, Campos-Garcia F-J, Herrera-Perez LDA, Martinez-Cruz P, Moreno-Graciano C-M, Contreras-Capetillo S-N, et al. Newborn cystic fibrosis screening in southeastern Mexico: Birth prevalence and novel CFTR gene variants. *J Med Screen* 2017;0:969141317722808. doi:10.1177/0969141317722808.
- [31] Nunes LM, Ribeiro R, Niewiadonski VDT, Sabino E, Yamamoto GL, Bertola DR, et al. A new insight into CFTR allele frequency in Brazil through next generation sequencing. *Pediatr*

- Pulmonol 2017;52:1300–5. doi:10.1002/ppul.23774.
- [32] Raraigh KS, Han ST, Davis E, Evans TA, Pellicore MJ, Mccague AF, et al. Functional Assays Are Essential for Interpretation of Missense Variants Associated with Variable Expressivity. *Am J Hum Genet* 2018;1–16. doi:10.1016/j.ajhg.2018.04.003.
- [33] Expression D, Method T. Physician ' s Guideline : Cystic Fibrosis Mutation Analysis n.d.:7–10.
- [34] Claustres M, Thèze C, des Georges M, Baux D, Girodon E, Bienvenu T, et al. CFTR-France, a national relational patient database for sharing genetic and phenotypic data associated with rare CFTR variants. *Hum Mutat* 2017;38:1297–315. doi:10.1002/humu.23276.
- [35] Sosnay PR, Salinas DB, White TB, Ren CL, Farrell PM, Raraigh KS, et al. Applying Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Genetics and CFTR2 Data to Facilitate Diagnoses. *J Pediatr* 2017;181:27–33. doi:10.1016/j.jpeds.2016.09.063.
- [36] Boeck D, Amaral M. Classification of CFTR mutation classes. *WwwTheLancetCom* 2016;4:37–8. doi:10.1016/S2213-2600(16)30188-6.
- [37] Id KK, Barnaby R, Jackson AA, Gerber SA, Hogan A, Stanton BA. Tobramycin reduces key virulence determinants in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles 2019:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0211290.
- [38] Edmondson RDC, Martin DHI. Potentiators and Correctors in Paediatric Cystic Fibrosis Patients : A Narrative Review. *Pediatr Drugs* 2018. doi:10.1007/s40272-018-0315-z.
- [39] Rey MM, Bonk MP, Hadjiliadis D. Cystic Fibrosis : Emerging Understanding and Therapies 2019:1–14.
- [40] Moeller A, Simard C, Wang LT, Ingenito EP, Ph D, Mckee C, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med* 2017;21:2013–23. doi:10.1056/NEJMoa1709846.
- [41] Orozco L, Velázquez R, Zielenski J, Tsui L-C, Chávez M, Lezana JL, et al. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G→A). *Hum Genet* 2000;106:360–5. doi:10.1007/s004390051051.
- [42] Friedman KJ, Edward Highsmith W, Silverman LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1991;37:753–5.
- [43] James T, Jill P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2012;14:178–92. doi:10.1093/bib/bbs017.
- [44] Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M. Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol* 2011;29:24–6. doi:10.1038/nbt.1754.Integrative.
- [45] McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 2016;17:1–14. doi:10.1186/s13059-016-0974-4.
- [46] Hamroun D, Lalande M. Human Splicing Finder : an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1–14. doi:10.1093/nar/gkp215.

- [47] Lek M, Karczewski KJ, Eric V, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nat Publ Gr* 2016;536:285–91. doi:10.1038/nature19057.
- [48] Lee M, Roos P, Sharma N, Atalar M, Evans TA, Pellicore MJ, et al. Systematic Computational Identification of Variants That Activate Exonic and Intronic Cryptic Splice Sites. *Am J Hum Genet* 2017;100:751–65. doi:10.1016/j.ajhg.2017.04.001.
- [49] Prach L, Koepke R, Kharrazi M, Keiles S, Salinas DB, Reyes MC, et al. Novel CFTR variants identified during the first 3 years of cystic fibrosis newborn screening in California. *J Mol Diagnostics* 2013;15:710–22. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.05.006.
- [50] Martínez-hernández A, Larrosa J, Barajas-olmos F, García-ortíz H, Mendoza-caamal EC, Contreras-cubas C, et al. Next-generation sequencing for identifying a novel / de novo pathogenic variant in a Mexican patient with cystic fibrosis : a case report. *BMC Med Genomics* 2019;1:10–3.
- [51] Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17:51–65. doi:10.1038/ejhg.2008.136.
- [52] Svensson AM, Chou L-S, Miller CE, Robles JA, Swensen JJ, Voelkerding K V., et al. Detection of Large Rearrangements in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay When Sequencing Fails to Detect Two Disease-Causing Mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14:171–4. doi:10.1089/gtmb.2009.0099.
- [53] Bergougnoux A, Délétang K, Pommier A, Varilh J, Houriez F, Altieri JP, et al. Functional characterization and phenotypic spectrum of three recurrent disease-causing deep intronic variants of the CFTR gene. *J Cyst Fibros* 2018. doi:10.1016/j.jcf.2018.10.012.
- [54] Audrézet MP, Munck A, Scotet V, Claustres M, Roussey M, Delmas D, et al. Comprehensive CFTR gene analysis of the French cystic fibrosis screened newborn cohort : implications for diagnosis , genetic counseling , and mutation-specific therapy. *Genet Med* 2014:1–9. doi:10.1038/gim.2014.113.
- [55] Kinnunen S, Bonache S, Casals T, Monto S, Savilahti E. Spectrum of mutations in CFTR in Finland : 18 years follow-up study and identification of two novel mutations 2005;4:233–7. doi:10.1016/j.jcf.2005.06.002.
- [56] Křenková P, Piskáčková T, Holubová A, Balašáková M, Krulišová V, Čamajová J, et al. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros* 2013;12:532–7. doi:10.1016/j.jcf.2012.12.002.
- [57] Zie E, Rutkiewicz E, Pogorzelski A, Klimek B, Voelkel K, Witt M, et al. CFTR mutations spectrum and the efficiency of molecular diagnostics in Polish cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0089094.
- [58] Pepermans X, Mellado S, Chialina S, Wagener M, Gallardo L, Lande H, et al. Identification and frequencies of cystic fibrosis mutations in central Argentina. *Clin Biochem*

2016;49:154–60. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.10.007.

- [59] Lay-Son G, Puga A, Astudillo P, Repetto GM. Cystic fibrosis in Chilean patients: Analysis of 36 common CFTR gene mutations. *J Cyst Fibros* 2011;10:66–70. doi:10.1016/j.jcf.2010.10.002.
- [60] Aquino R, Protzel A, Rivera J, Abarca H, Dueñas M, Nestarez C, et al. Frequency of the most common mutations of the CFTR gene in Peruvian patients with cystic fibrosis using the ARMS-PCR technique. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2017;34:62–9. doi:10.17843/rpmesp.2017.341.2767.
- [61] Farrell P, Férec C, Macek M, Frischer T, Renner S, Riss K, et al. Estimating the age of p.(Phe508del) with family studies of geographically distinct European populations and the early spread of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2018. doi:10.1038/s41431-018-0234-z.
- [62] Salinas-Santander MA, Bazan-Mendoza E, Espinoza-Ruiz M, Ortiz-Lopez R, Bustamante A, Sanchez-Dominguez CN. The +1858 C/T Polymorphism in the PTPN22 Gene Is Associated with Cystic Fibrosis Patients in Northeast Mexico. *Arch Med Res* 2016;47:403–6. doi:10.1016/j.arcmed.2016.08.010.
- [63] Ramos MD, Telleria JJ, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD. Spectrum of Mutations in the CFTR Gene in Cystic Fibrosis Patients of Spanish Ancestry. *Ann Hum Genet* 2006;71:194–201. doi:10.1111/j.1469-1809.2006.00310.x.
- [64] Schrijver I, Pique L, Graham S, Pearl M, Cherry A, Kharrazi M. The Spectrum of CFTR Variants in Nonwhite Cystic Fibrosis Patients: Implications for Molecular Diagnostic Testing. *J Mol Diagnostics* 2016;18:39–50. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.07.005.
- [65] Chillón M, Casals TDT, Gimenez J, Fonknechten N, Will K, Ramos D, et al. A Novel Donor Splice Site in Intron II of the CFTR Gene, Created by Mutation 1811 + I . 6kbA-G, Produces a New Exon : High Frequency in Spanish Cystic Fibrosis Chromosomes and Association with Severe Phenotype 1995:623–9.
- [66] Costantino L, Rusconi D, Soldà G, Seia M, Paracchin V, Porcaro L, et al. Fine characterization of the recurrent c.1584+118672A>G deep-intronic mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;48:619–25. doi:10.1165/rcmb.2012-0371OC.
- [67] Fanous H, Delgado-Villata S, Kovacs R, Shalaby-Rana E, Sami-Zakahri I. Phenotypic Characterization of the c.1679+1643G>T (1811+1643G>T) Mutation in Hispanic Cystic Fibrosis Patients. *Children* 2018;5:91. doi:10.3390/children5070091.
- [68] Audrézet MP, Chen JM, Raguénès, Chuzhanova N, Giteau K, Le Maréchal C, et al. Genomic Rearrangements in the CFTR Gene: Extensive Allelic Heterogeneity and Diverse Mutational Mechanisms. *Hum Mutat* 2004;23:343–57. doi:10.1002/humu.20009.
- [69] Oren YS, Pranke IM, Kerem B, Sermet-Gaudelus I. The suppression of premature termination codons and the repair of splicing mutations in CFTR. *Curr Opin Pharmacol* 2017;34:125–31. doi:10.1016/j.coph.2017.09.017.
- [70] Girodon E, Des georges M, Medina R, Grenet D, Férec C, Claustres M, et al. Occurrence of CFTR de novo mutations is not so rare. *J Cyst Fibros* 2008;7:S6–S6. doi:10.1016/S1569-1993(08)60023-5.

- [71] Cremonesi L, Cainarca S, Rossi A, Padoan R, Ferrari M. Detection of a de novo R1066H mutation in an Italian patient affected by cystic fibrosis. *Hum Genet* 1996;98:119–21. doi:10.1007/s004390050171.
- [72] Norek A, Stremaska M, Sobczyńska-Tomaszewska A, Wertheim-Tysarowska K, Dmeńska H, Jurek M. Novel de novo large deletion in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene results in a severe cystic fibrosis phenotype. *J Pediatr* 2011;159. doi:10.1016/j.jpeds.2011.04.022.
- [73] White MB, Leppert M, Nielsen D, Zielenski J, Gerrard B, Stewart C, et al. A de Novo cystic fibrosis mutation: CGA (Arg) to TGA (stop) at codon 851 of the CFTR gene. *Genomics* 1991;11:778–9. doi:10.1016/0888-7543(91)90092-S.
- [74] Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Nadal M, Nunes V, Estivill X. De Novo CFTR (L1065R) 1998;102:65–8.
- [75] Girard SL, Bourassa C V., Lemieux Perreault L-P, Legault M-A, Barhdadi A, Ambalavanan A, et al. Paternal Age Explains a Major Portion of De Novo Germline Mutation Rate Variability in Healthy Individuals. *PLoS One* 2016;11:e0164212. doi:10.1371/journal.pone.0164212.
- [76] Rahbari R, Wuster A, Lindsay SJ, Hardwick RJ, Alexandrov LB, Al Turki S, et al. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat Genet* 2016;48:126–33. doi:10.1038/ng.3469.
- [77] Pagani F, Baralle FE. Identifying the splicing spoilers. *Nat Publ Gr* 2004;5.
- [78] Schechter MS. Nongenetic influences on cystic fibrosis outcomes. *Curr Opin Pulm Med* 2011;17:448–54. doi:10.1097/MCP.0b013e32834ba899.
- [79] Neal WKO, Knowles MR, O’Neal WK, Knowles MR. Cystic Fibrosis Disease Modifiers : Complex Genetics Defines the Phenotypic Diversity in a Monogenic Disease. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2018;19:annurev-genom-083117-021329. doi:10.1146/annurev-genom-083117-021329.
- [80] Espel JC, Palac HL, Bharat A, Cullina J, Prickett M, Sala M, et al. The relationship between sweat chloride levels and mortality in cystic fibrosis varies by individual genotype. *J Cyst Fibros* 2017;17:34–42. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.002.
- [81] Faria AG, Marson FAL, Gomez CCS, Servidoni M de F, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Thirty Years of Sweat Chloride Testing at One Referral Center. *Front Pediatr* 2017;5. doi:10.3389/fped.2017.00222.
- [82] Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, et al. Heritability of Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1036–43. doi:10.1164/rccm.200608-1164OC.
- [83] Terlizzi V, Lucarelli M, Salvatore D, Angioni A, Bisogno A, Braggion C, et al. Clinical expression of cystic fibrosis in a large cohort of Italian siblings. *BMC Pulm Med* 2018;1–8.
- [84] Yokoyama E, Chávez-Saldaña M, Orozco L, Cuevas F, Lezana JL, Viguera-Villaseñor RM, et al. Influence of SNPs in Genes that Modulate Lung Disease Severity in a Group of Mexican Patients with Cystic Fibrosis. *Arch Med Res* 2018. doi:10.1016/j.arcmed.2018.04.010.
- [85] Dupuis A, Keenan K, Ooi CY, Dorfman R, Sontag MK, Naehrlich L, et al. Original Research

Article Prevalence of meconium ileus marks the severity of mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene. *Genet Med* 2015;1–8. doi:10.1038/gim.2015.79.

- [86] Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F. Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis : pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities 2014;151–61. doi:10.1007/s00439-013-1363-7.
- [87] Wilschanski M, Novak I. The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;1–18.
- [88] Augarten A, Ben A, Madgar I, Barak A, Akons H, Laufer J, et al. The changing face of the exocrine pancreas in cystic fibrosis : the correlation between pancreatic status , pancreatitis and cystic fibrosis genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:164–8.
- [89] Yokoyama E, Lezana JL, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda J, Saldaña-Álvarez Y, Orozco L, et al. [Genotype-phenotype correlation in a sample of Mexican patients with cystic fibrosis]. *Rev Investig Clínica; Organo Del Hosp Enfermedades La Nutr* 2013;65:491–9.
- [90] Hubert D, Bienvenu T, Fajac I, Lacronique J, Matran R, Kaplan JC, et al. Genotype-phenotype relationships in a cohort. *Eur Respir J* 1996;2:2207–14. doi:10.1183/09031936.96.09112207.
- [91] Ivanov MM, Matsvay A, Glazova O, Krasovskiy S, Usacheva M, Amelina E, et al. Targeted sequencing reveals complex, phenotype-correlated genotypes in cystic fibrosis. *BMC Med Genomics* 2018;11. doi:10.1186/s12920-018-0328-z.
- [92] Antiniolo G, Borrego S, Gili M, Dapena J, Alfageme I. Genotype-phenotype relationship in 12 patients carrying cystic fibrosis mutation R334W. *J Med Genet* 1997;34:89–91.
- [93] Blackman SM, Hsu S, Vanscoy LL, Collaco JM, Ritter SE, Naughton K, et al. Genetic Modifiers Play a Substantial Role in Diabetes Complicating Cystic Fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1302–9. doi:10.1210/jc.2008-2186.
- [94] Dorfman R, Zielenski J. Genotype-Phenotype Correlations in Cystic Fibrosis. *Prog Respir Res* 2006;34:61–8.
- [95] Aurora P, Wade A, Whitmore P, Whitehead B. A model for predicting life expectancy of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000;10:56–60.
- [96] Jackson AD, Goss CH. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. *J Cyst Fibros* 2018;17:297–305. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.013.
- [97] Corriveau S, Sykes J, Stephenson AL. Cystic fibrosis survival : the changing epidemiology. *Curr Opin Pulm Med* 2018;24:574–8. doi:10.1097/MCP.0000000000000520.
- [98] Keogh RH, Stanojevic S. A guide to interpreting estimated median age of survival in cystic fibrosis patient registry reports. *J Cyst Fibros* 2018;17:213–7. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.014.
- [99] Foundation CF. 2017 PATIENT REGISTRY ANNUAL DATA REPORT 2017.

ANEXO 1. CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO



Asentamiento para menores de edad

Yo _____, manifiesto por medio de la presente que estoy de acuerdo participar en el proyecto de investigación médica ***“Identificación del espectro total de mutaciones del gen CFTR y asociación de genes modificadores con la gravedad de fibrosis quística en pacientes mexicanos”***.

Y además estoy de acuerdo con ***todos*** los siguientes puntos:

- En donar de forma voluntaria mi sangre, células de mucosa oral, DNA, suero o plasma para ser utilizada en éste y otros estudios de investigación medica y/o genómica.
- En que se recabe información personal general para ser utilizado en éste y otros estudios de investigación genómica.
- En que los resultados de este estudio se depositen en una base de datos segura, disponible a través de internet, en la que no se dará a conocer mi nombre ni algún dato que me identifique.
- Entiendo que mi información médica y genética codificada podrá ser usada para éste y para otros estudios de investigación médica.
- Entiendo que, aunque muy poco probable, existe un pequeño riesgo de que mi información genética pueda ser decodificada por otros.
- Estoy consciente de que se me puede contactar en el futuro, si el estudio requiere coleccionar información o una muestra complementaria.

Este documento se firma por duplicado en la Ciudad de México a los ___ días de _____ del 201__ .

Nombre y firma del participante

Nombre, dirección y firma
Testigo 1

Nombre, dirección y firma
Testigo 2

Nombre y firma del médico y/o investigador