

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR
EN LA POBLACION DEL NORESTE DE MEXICO

Por

SERGIO ANTONIO SALAZAR LOZANO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Agosto, 2003

TM

RC858

.C95

S2

2003

c.1

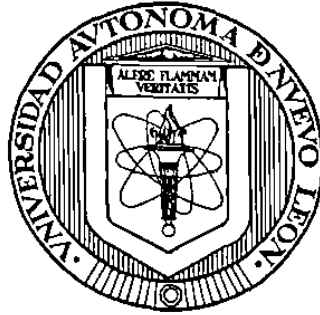
SERGIO AMTOMO SAIAR LOZANO



1080096133

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR EN LA
POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO

Por

SERGIO ANTONIO SALAZAR LOZANO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería
Genética


Agosto, 2003

TM
RC 858
.C95
S2
2003

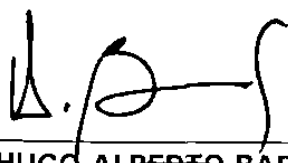


**BUSQUEDA DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA FIBROSIS QUISTICA
EN LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MEXICO**

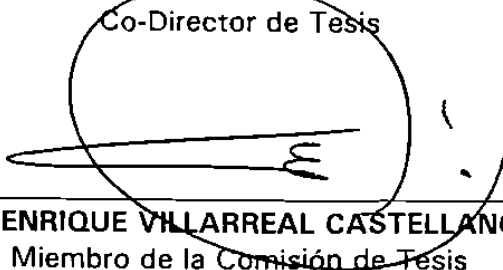
Aprobación de la Tesis:



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. ENRIQUE VILLARREAL CASTELLANOS
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Ortiz López y la coasesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y como asesor externo al Dr. Enrique Villarreal Castellanos.

RESUMEN

Q.F.B. Sergio Antonio Salazar Lozano
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Septiembre

Título del Estudio: DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR EN LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.

Número de páginas: 107 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de Estudio: Diagnóstico Molecular.

Objetivo y Método de Estudio: La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva mortal más común en la población caucásica, afectando a 1 de cada 2000 neonatos. El gen responsable de la FQ codifica para una proteína de conductancia transmembranal (CFTR por sus siglas en inglés). Esta proteína es responsable del flujo de iones cloruro a través de la membrana celular del tejido epitelial. En la actualidad el diagnóstico de mutaciones en el gen de la FQ se realiza mediante el uso de estuches comerciales diseñados para detectar las mutaciones más comunes para la población caucásica. Estos estuches sólo cubren aproximadamente el 50% de las mutaciones en la población mexicana. En el presente estudio se trabajó con 76 pacientes clínicamente diagnosticados con FQ. El ADN de sangre periférica de estos pacientes se sometió a un primer tamizaje utilizando un estuche comercial que rastrea las 27 mutaciones más comunes en el mundo. Posteriormente para todas aquellas muestras que no pudieran ser diagnosticadas por esta metodología, o que alguno de los alelos mutados no pudo ser caracterizado, se diseñaron 30 juegos de iniciadores para amplificar el gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Los productos amplificados se tamizaron en busca de mutaciones utilizando la técnica de Análisis por Heterodímeros (AH). Finalmente, los productos amplificados que resultaron positivos a este análisis, se secuenciaron.

Contribuciones y Conclusiones: El análisis de la frecuencia de la mutación S549N evidencia un claro desequilibrio en su presencia cuando se compara con lo esperado de acuerdo a los resultados mundiales de frecuencia, siendo esta 26 veces más frecuente en esta población. A pesar de no haber sometido a los alelos a un análisis de ligamiento es posible concluir que existe una fuerte asociación entre la mutación $\Delta F508$ y el polimorfismo 9T. El AH y la secuenciación buscando mutaciones en aquellos alelos pendientes de dilucidar nos ha permitido la identificación de una mutación no incluida en el estuche de 27 mutaciones. De este hecho se desprenden dos conclusiones, la primera que es probable que exista un componente francés secundado por referencias históricas y la segunda, que la técnica de heterodímeros tal y como se practicó en este estudio necesita pulirse debido a que se encontraron muchas variantes, pero pocas fueron confirmadas y más pocas aún demostraron ser variantes reales. Existe la posibilidad que en el caso estudiado en el cual se encontró el polimorfismo 1540A/G, este sea en parte responsable del cuadro clínico moderado que se presenta en el paciente, debido a que el genotipo encontrado fue $\Delta F508/X$, en donde se sabe que la gran mayoría de pacientes con la mutación $\Delta F508$ presentan un cuadro severo de la enfermedad.

Firma del Asesor:

Firma del Coasesor:

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis (al igual que todas, creo) planteó para mi persona retos de distinta índole. Mentiría y sería egocéntrico y deshonesto si me vanagloriara de los pocos o muchos logros desprendidos de este esfuerzo. Es un hecho que muchas personas participaron directa e indirectamente en esta tesis y lograron apoyarme y guiarme a lo largo del camino, es certero asegurar que sin la intervención o el apoyo de alguno de ellos el resultado habría sido un trabajo de menor calidad. Será difícil mencionar a todos y cada uno de quienes se involucraron en esta tesis y pido disculpas de antemano si omito a alguien.

Primero que nada estoy en deuda de por vida con mis padres (y mi familia) que me apoyaron en todo momento (como siempre) y a quienes debo un extraordinario apoyo moral y espiritual. Debo agradecerles esto y de manera muy especial todos los sacrificios por los que pasaron incluyendo el tiempo que nos dejamos de ver y lo que dejamos de convivir; gracias.

A Silja por todo su apoyo, por los fines de semana de sacrificio (muy numerosos) en los cuales invertimos la mayor parte de los mismos en la ULIEG o en alguna actividad relacionada (incluyendo la visita a librerías en búsqueda de bibliografía), por su comprensión y esfuerzo y por soportar y enfrentar conmigo muchas de las dificultades más duras de esta época.

A la Doctora Rocío Ortiz López, quien pacientemente me asesoró y guió en mi tesis y con quien me siento profundamente agradecido. Debo decir que la admiro y considero no solo una persona capaz y profesional, sino un ser humano de gran calidad; gracias por su amistad.

Al Doctor Hugo A. Barrera Saldaña, quien hizo posible mi estancia en la ULIEG y quien me impulsó y exigió cuanto consideró necesario, le agradezco esto así como sus comentarios (siempre atinados) que me abrieron el

panorama y permitieron que estudiara posibilidades anteriormente no concebidas por mí.

Al Doctor Enrique Villarreal Castellanos, de quien recibí un trato excelente y quien también pacientemente me instruyó, apoyó y asesoró en esta tesis y con quien me siento en deuda de manera especial. Gracias por su tiempo, que valoro mucho, por recibirme siempre de buena gana y por enseñarme tanto sobre la fibrosis quística; pero sobre todo gracias por su gran calidad como médico y persona y por su genuina preocupación y dedicación a sus pacientes.

Al Doctor Augusto Rojas Martínez, quien siempre con buen humor y de buena gana estuvo dispuesto a ayudarme y a escucharme, gracias por sus consejos, su atención y su tiempo.

A la Doctora Agnès Revol de Mendoza, quien por un breve periodo participó en el proyecto, a pesar de que su intervención duró poco tiempo, no puedo omitirla pues considero que hizo aportaciones muy valiosas y debo también agradecerle y reconocerle su gran capacidad y calidez que la distinguen.

A la Doctora Herminia Martínez quien a pesar de no haber participado activamente en este proyecto en particular, me siento en deuda por su apoyo dentro de la ULIEG y en posgrado y quiero agradecerérselo aquí también.

A la M. en C. Dolores del Carmen Esquivel Escobedo y a Iram quienes invirtieron una considerable cantidad de tiempo y esfuerzo en la etapa de secuenciación de este estudio. Gracias por realizarlo siempre con entusiasmo y sin mengua en su dedicación.

A todos mis compañeros, sin quienes el paso por la ULIEG hubiera sido muy distinto, gracias por su amistad, por hacer los tiempos malos soportables y los buenos realmente agradables. Quisiera agradecer de manera especial al Doctor Pablo quien en varias ocasiones me aconsejó acertadamente y se mostró empático involucrándose un par de veces de manera voluntaria, quiero agradecerle su amistad que valoro mucho. A Luis Miguel y a Itzel, con quienes en algún momento compartí labores en el laboratorio, así como a mis compañeros de Medicina Molecular (anteriormente Genética Molecular).

Finalmente quiero agradecer muy especialmente a la Asociación de Fibrosis Quística de Nuevo León. De ellos recibí el mayor apoyo de todos, me siento en deuda y totalmente empático. Recibí más del trato personal en las breves entrevistas que sostuvimos tanto en grupo como de manera privada, de lo que obtuve en mi búsqueda de mutaciones. Me llevo mucho más de lo que entrego y eso es quizá lo que más me inquieta de esta experiencia. Desde el momento en que me presenté hasta ahora que termino, siempre pensé en servirles y en aportar información valiosa, hoy que hago un recuento de los logros y un balance de lo recibido y entregado soy consciente de que aún les debo mucho.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FIBROSIS QUÍSTICA: su impacto	1
1.2 ANTECEDENTES	2
1.3 UBICACIÓN DEL GEN DE LA FQ	3
1.4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN PROTEICA	6
1.5 MUTACIONES EN EL POLIPÉPTIDO CFTR	9
1.6 PROCESAMIENTO CELULAR	12
1.7 PATOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA	14
1.8 FENOTIPO	15
1.9 CORRELACIONES ENTRE GENOTIPO Y FENOTIPO	18
1.10 CITOGENÉTICA EN LA FQ.	21
1.11 EL GEN CFTR EN LAS POBLACIONES	21
1.12 JUSTIFICACIÓN	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GENERAL.	25
2.1.2 Objetivos Específicos	25
2.2 HIPÓTESIS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 MATERIAL	27
3.1.1 Área de Trabajo	27
3.1.2 Material Biológico	27
3.1.3 Reactivos Químicos	27
3.1.4 Material	28
3.1.5 Equipo	28
3.1.6 Apoyo Computacional, de Informática y Sistemas	29
3.2 ESTRATEGIA GENERAL	30
3.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA	31

TABLA DE CONTENIDO
Detección de Mutaciones en el gen CFTR en la Población del Noreste de México

3.3.1 Datos Familiares	31
3.3.1 Datos Demográficos y Severidad de la Fibrosis Quística	32
3.4 IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES	32
3.4.1 Naturaleza de la muestra	32
3.4.2 Extracción de ADN	32
3.4.3 Estrategia de Detección de la mutación $\Delta F508$	33
3.4.4 Análisis por sondas Oligo Alelo Específicas (ASO)	34
3.4.4.1 Ensayo de PCR	35
3.4.4.2 Ensayo de Hibridación de sondas ASO.	35
3.4.4.3 Reacción de Detección	36
3.4.5 Tamizaje de mutaciones mediante heterodímeros y SSCP's	36
3.4.6 Análisis de SSCP's	37
3.4.7 Análisis de Heterodímeros	38
3.4.8 Secuenciación	39
3.4.8.1 Purificación del Producto Amplificado	39
3.4.8.2 Reacción de PCR para la Secuenciación	39
4. RESULTADOS	41
4.1 FRECUENCIAS Y LOCALIZACIÓN DE LAS MUTACIONES	41
4.2 FRECUENCIAS Y LOCALIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS	45
4.3 ESTUDIOS FAMILIARES	47
5. DISCUSIÓN	48
5.1 FRACCIÓN DE MUTACIONES DETECTADAS	48
5.2 FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$	50
5.3 FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN G542X	52
5.4 FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN S549N	52
5.5 FRECUENCIAS DE LOS POLIMORFISMOS Tm	53

TABLA DE CONTENIDO

Detección de Mutaciones en el gen CFTR en la Población del Noreste de México

5.6	CORRELACIÓN GENOTIPO – FENOTIPO	.	.	54
5.7	LA MUTACIÓN L206W	.	.	55
5.8	EL POLIMORFISMO 1540A/G	.	.	56
6.	CONCLUSIONES	.	.	58
ANEXO 1	.	.	.	60
ANEXO 2	.	.	.	61
ANEXO 3	.	.	.	63
ANEXO 4	.	.	.	65
ANEXO 5	.	.	.	67
ANEXO 6	.	.	.	69
ANEXO 7	.	.	.	71
ANEXO 8	.	.	.	76
ANEXO 9	.	.	.	77
ANEXO 10	.	.	.	79
ANEXO 11	.	.	.	81
ANEXO 12	.	.	.	82
ANEXO 13	.	.	.	84
BIBLIOGRAFÍA	.	.	.	85

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ubicación de los marcadores	4
2. Localización del gen CFTR	6
3. Proteína CFTR	8
4. Representación linear de la estructura secundaria de la proteína y localización de las mutaciones dentro de la misma	10
5. El destino de las moléculas CFTR sintetizadas en los Ribosomas asociados al RE	13
6. Consecuencias moleculares de las mutaciones en CFTR	14
7. Órganos afectados por la fibrosis quística	15
8. Análisis familiares para $\Delta F508$	45
9. Fracción de la mutación $\Delta F508$ detectada en diversos estudios y en distintas poblaciones	50

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tabla comparativa entre los dos estuches comerciales utilizados para hacer el tamizaje de mutaciones inicial con las frecuencias relativas mundiales para cada una de las mutaciones incluidas en los mismos	11
2. Resultados de primer tamizaje.	39
3. Correlaciones Genotipo – Fenotipo	40
4. Número de variantes obtenidas por exón	41
5. Número de variantes obtenidas por heterodímeros.	42
6. Distribución de genotipos Tm	43
7. Genotipos de pacientes Vs. Controles (alelos Tm)	44
8. X ² de polimorfismos Tm	44
9. Distribución de genotipos en muestras colombianas	46
10. Distribución del polimorfismo Tm en muestras colombianas	46
11. Comparativo de fracción de mutaciones detectadas por el estuche utilizado en este estudio en distintas regiones del mundo	47

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 FIBROSIS QUÍSTICA: su impacto.

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva mortal más común en la población blanca, donde afecta a 1 de cada 2000 neonatos. Presenta una frecuencia de portadores heterocigotos de aproximadamente 1 de cada 25 personas de extracción noreuropea. Esta enfermedad se caracteriza por un desequilibrio en el transporte de agua y electrolitos en los epitelios secretores, lo que produce una acumulación de moco viscoso que obstruye el intestino y las vías biliares y pancreáticas *in útero* y se acumula en las vías aéreas distales después del nacimiento (1).

El curso del cuadro es progresivo y la afección respiratoria generalmente determina la muerte entre la primera y cuarta décadas de vida. A pesar de la inexistencia de un tratamiento curativo, la terapia de sostén ha mejorado el nivel y las expectativas de vida en este grupo de pacientes en forma notable. El defecto básico en este cuadro fue revelado por clonación posicional del gen responsable. El gen de la FQ fue el primero en clonarse mediante los métodos de caminata cromosómica y saltos cromosómicos, sin recurrir a rearrreglos cromosómicos, utilizando un gran número de marcadores genéticos que están ligados al gen en la banda q31 del cromosoma 7. La identificación se logró gracias a la asociación de éste con una isla CpG y su expresión en glándulas sudoríparas, pulmones y páncreas. El gen de la FQ mide 250 kb y su ARNm es de aproximadamente 6.5 kb, y en concordancia con su papel en la FQ, este gen

se expresa casi exclusivamente en células epiteliales con la concentración más alta en el páncreas, las glándulas salivales, las glándulas sudoríparas, el intestino y el aparato reproductor. La secuenciación de este gen ha permitido conocer los tipos de mutaciones más frecuentes, sus ubicaciones a lo largo del gen y también ha permitido determinar la secuencia y deducir la estructura de su producto. Como reflejo de lo que se sabía hasta 1989 acerca del defecto de esta enfermedad, la proteína de la FQ se denominó regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (o CFTR por "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator"), una proteína de membrana que participa en el transporte del ión cloruro mediado por ATP (1, 2).

La mutación más común en el gen de la FQ es una delección de tres pares de bases, que trae como consecuencia la pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508 de la proteína ($\Delta F508$). En los estudios en caucásicos esta mutación se presenta en aproximadamente el 70% de los casos y el 30% restante está representado por cerca de novecientas mutaciones (3, 4). Debido a la gran heterogenicidad de las anomalías genéticas de la FQ, aproximadamente 70 mutaciones deben ser tamizadas para lograr una sensibilidad diagnóstica en caucásicos cercana al 90% (5).

1.2 ANTECEDENTES

En 1938 Dorothy H. Andersen de la Universidad de Columbia, tras realizar autopsias en infantes y niños, y después de revisar las historias clínicas de éstos, proveyó la primera descripción comprensiva de los síntomas de la enfermedad y de los cambios producidos en los órganos de éstos pacientes. Estos cambios habitualmente incluían la destrucción del páncreas y generalmente infección y daño en las vías aéreas superiores. Fue Andersen quien le dio el nombre de "fibrosis quística del páncreas" basada en las características microscópicas que observó en el tejido pancreático (6).

En 1953 DiSant'Agnese observó que los niños con FQ manifestaban una pérdida excesiva de sal en sudor y esto condujo a la cuantificación de sodio y cloro en el sudor como estándar diagnóstico para la enfermedad (6). En 1984, finalmente se demostró, que en los pacientes con FQ, la salida de iones cloruro a través de la membrana de las células epiteliales en respuesta a concentraciones elevadas de la molécula intracelular de señal AMP cíclico (adenosina 3', 5'-monofosfato) es deficiente. Además, la activación de una proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) no estaba afectada en las células de pacientes con FQ, pero la PKA fracasaba en estimular la conductancia del cloruro. Sin embargo, esta información no proporcionó una vía para la identificación del defecto subyacente y, por lo tanto, basándose en las herramientas de biología molecular con que se contaba, se adoptó una estrategia de clonación posicional para localizar al gen responsable (1).

1.3 UBICACIÓN DEL GEN DE LA FQ

La posición subcromosómica del gen de la FQ se averiguó mediante análisis de ligamiento. Aunque la FQ se hereda como rasgo autosómico recesivo, la frecuencia de la enfermedad hizo que este método pudiera aplicarse y después de un periodo de 5 años se asignó una región candidata a la posición 7q31. La identificación de los marcadores flanqueantes *MET* y *D7S8*, hizo posible utilizar estrategias de clonación para estrechar la región dónde se localizaba el gen. Los métodos utilizados incluyeron salto cromosómico desde los marcadores flanqueantes, clonación de fragmentos de ADN desde una región física definida utilizando electroforesis en gel de campo pulsátil, una combinación de híbridos de células somáticas y técnicas de clonación con el objeto de aislar fragmentos de ADN de las islas CpG submetiladas cerca del gen, microdissección cromosómica y clonación, y por último, clonación de saturación de un gran número de marcadores de ADN de la región 7q31 (7).

La ubicación cromosómica del gen se refinó hasta una región de menos de 1 cM. Se empleó una combinación de técnicas de recorrido y salto cromosómico para proporcionar clonas de ADN que pudieran ser usados en el mapeo genético y físico adicional a la región crítica (1). Como indicaban los datos genéticos, D7S122 y D7S340 muy probablemente se encontraban próximos al gen y el mapa físico de la región estaba bien definido. El paso lógico a seguir fue clonar grandes cantidades de ADN que rodearan esta región y buscar secuencias candidatas. Se realizaron experimentos de salto cromosómico paralelos desde D7S8 hacia D7S122 y D7S340 para estrechar la región de interés (7). (Figura 1).

Ubicación de los marcadores moleculares

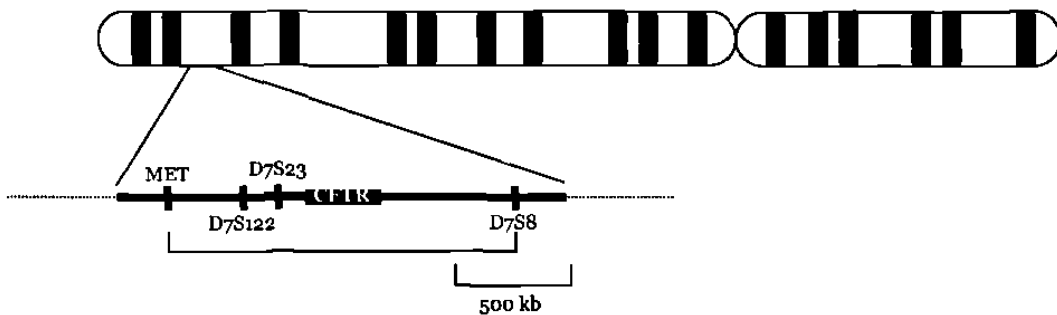


Figura 1. Mapa físico de la región de CFTR en la banda q31 del cromosoma 7. Este se determinó por medio de mapeo de restricción de amplio intervalo, clonación extensa de ADN y análisis de datos de ligamiento genético. Los marcadores que se indican son sondas de ADN que detectan polimorfismos ligados a CFTR.

Para identificar segmentos de ADN candidatos a ser el gen de la FQ se siguieron los siguientes criterios: 1) Detección de secuencias capaces de hibridar con ADN de otras especies (ya que muchos genes muestran conservación durante la evolución), 2) Identificación con islas CpG que usualmente marcan el extremo 5' de los genes en vertebrados, 3) Examen de los posibles transcritos de ARNm en los tejidos afectados de los pacientes con

FQ, 4) Aislamiento de secuencias de ADNc correspondientes y 5) Identificación de marcos de lectura abiertos por medio de la secuenciación directa de segmentos clonados de ADN (7).

Durante este proceso se identificaron polimorfismos de ADN que se hallaban en desequilibrio de ligamiento con el locus de la FQ; es decir, que más del 84% de los cromosomas de la FQ estaban asociados con un grupo particular de alelos (haplotipo) en estos sitios. Esto indicaba que no sólo era probable que estos marcadores polimórficos se hallaran cerca del gen de la FQ, sino también que una sola mutación sería responsable de la mayoría de los alelos de la FQ (1).

Finalmente se identificó un gen candidato para la FQ por su asociación con una isla CpG y su expresión en glándulas sudoríparas, pulmones y páncreas. Este gen se transcribía de una región de ADN genómico de 250 kb (que comprende al promotor y 24 exones) y su ARNm era de una 6.5 kb. En concordancia con su papel en la FQ, se expresa casi exclusivamente en células epiteliales con la concentración más alta en el páncreas, las glándulas salivales, las glándulas sudoríparas, el intestino y el aparato reproductor. La identidad del gen se confirmó por la presencia de una deleción de 3 pares de bases en el exon 10 encontrada en alrededor del 70% de los cromosomas de los afectados, lo que sustentaba la sospechada homogeneidad de la mayoría de los alelos mutantes. La deleción de los tres pares de bases ocasiona en la traducción la ausencia de una fenilalanina en la posición 508 de la proteína madura ($\Delta F508$). Además, se demostró en células en cultivo de las vías aéreas superiores de pacientes con FQ que la transferencia del gen silvestre completo a estas células era suficiente para corregir el defecto del canal de cloruro (1, 2). (Figura 2).

Localización del gen CFTR

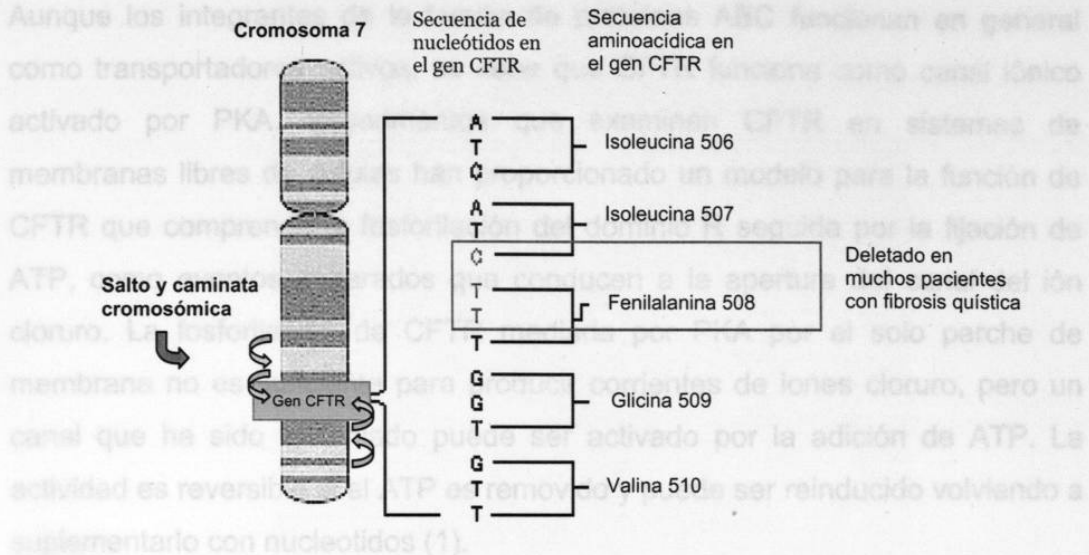


Figura 2. Localización del gen CFTR. El gen CFTR finalmente fue localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (en la banda 7q31). Esto lo lograron a través de dos técnicas básicas denominadas caminata cromosómica y salteado cromosómico e involucró a un gran número de investigadores y laboratorios que crearon librerías, estrechando así poco a poco la región hasta dar con el gen responsable de la fibrosis quística. Al mismo tiempo fueron capaces de identificar a la mutación más común para este gen: $\Delta F508$. (Figura tomada de Scientific American).

1.4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN PROTEICA

Una serie de experimentos indicaron que la proteína CFTR podía funcionar como un canal iónico. La secuencia pronosticada de aminoácidos de la CFTR presenta similitud a una gran familia de proteínas que participan en el transporte activo a través de las membranas celulares. Los miembros de esta superfamilia altamente conservada, a menudo denominada familia ABC (del inglés: ATP-binding cassette o cassette de fijación de ATP), tienen en común dos dominios transmembranales hidrofóbicos (TM) y uno o dos pliegues fijadores de nucleótidos (PFN) - cada uno habitualmente posee 6 bucles que atraviesan la membrana - que se unen a ATP y lo degradan para proveer la energía necesaria en el transporte a través de la membrana. Además de los dominios TM y PFN, contienen una región central muy cargada que es el

objetivo de la fosforilación de serina mediada por una proteína cinasa dependiente de ATPc (PKA), CFTR contiene además al dominio regulador (R). Aunque los integrantes de la familia de proteínas ABC funcionan en general como transportadores activos, se sabe que CFTR funciona como canal iónico activado por PKA. Experimentos que examinan CFTR en sistemas de membranas libres de células han proporcionado un modelo para la función de CFTR que comprende la fosforilación del dominio R seguida por la fijación de ATP, como eventos separados que conducen a la apertura del canal del ión cloruro. La fosforilación de CFTR mediada por PKA por el solo parche de membrana no es suficiente para producir corrientes de iones cloruro, pero un canal que ha sido fosforilado puede ser activado por la adición de ATP. La actividad es reversible si el ATP es removido y puede ser reinducido volviendo a suplementarlo con nucleotidos (1).

Si la forma fosforilada de CFTR se une a ATP se induce un cambio conformacional, lo que permite el flujo pasivo de iones cloruro. Esto no quiere decir que CFTR sea una bomba de cloruro, este ión se mueve de acuerdo a su gradiente electroquímico y no existe relación estequiometrica entre las moléculas de ATP cortadas y el número de iones cloruro que pasan a través de la membrana (6). (Figura 3).

Proteína CFTR

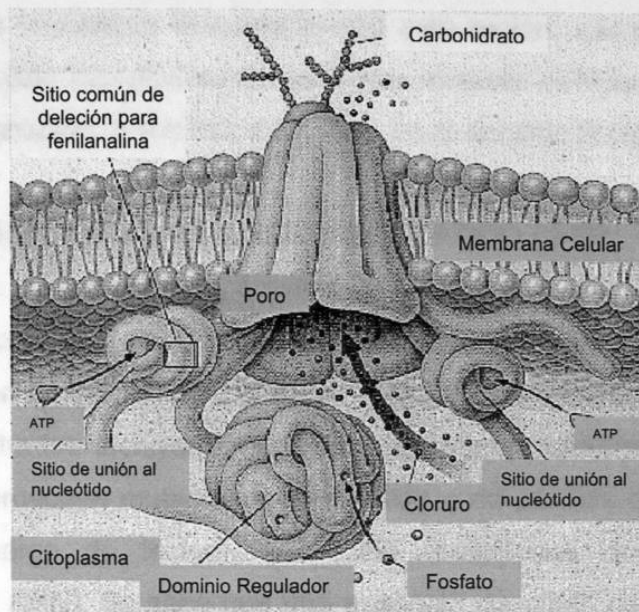


Figura 3. Proteína CFTR. CFTR es una glicoproteína transmembranal cuya estructura incluye 2 dominios transmembranales (embebidos en la membrana plasmática), 2 dominios fijadores de nucleótidos y un dominio regulador denominado R. En esta figura es posible ver que CFTR trabaja permitiendo el paso de iones cloruro a través de la luz de la misma, esto como consecuencia de un cambio conformacional resultante a la unión de 2 moléculas de ATP a sitios específicos. Adicionalmente se localiza la zona de afección de la mutación más común en el mundo, $\Delta F508$. (Figura tomada de Scientific American).

Se sabe por estudios de mutación sitio-dirigida que la cola N terminal de la proteína es un regulador positivo para la actividad de CFTR y que algunos residuos ácidos de la cola son esenciales para esta actividad reguladora. La actividad del canal de cloruro CFTR es estabilizada por la interacción entre el dominio R y la cola N terminal. Esta interacción interdominios es dependiente de un conglomerado de residuos ácidos estrictamente conservados de la región N terminal. Aparentemente la región N terminal no modula la actividad de CFTR, influenciando de manera global la fosforilación del dominio R. Mas bien se cree que la región N terminal modula la actividad del canal controlando el acceso del dominio fosforilado R a sitios inhibitorios o estimuladores en el canal. El pasaje a través de CFTR controlado por la región N terminal implica que el tráfico intracelular de CFTR y el bloqueo de este canal iónico pudieran ser un

proceso acoplado, pues componentes de la maquinaria del tráfico de la membrana pueden interactuar físicamente con esta región. Las proteínas que se unen a esta región potencialmente pudieran modular el bloqueo de CFTR estabilizando o deshaciendo sus interacciones con el dominio R (8).

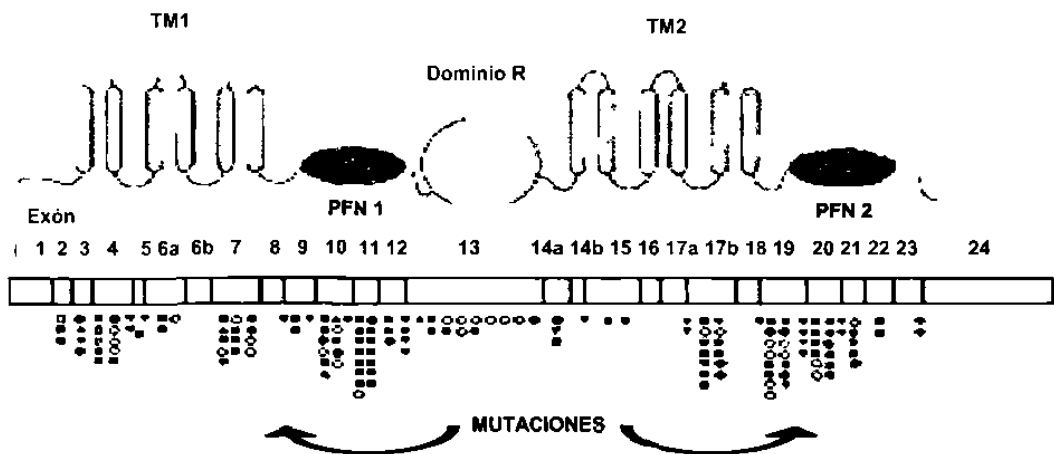
1.5 MUTACIONES EN EL POLIPÉPTIDO CFTR

Se han encontrado mutaciones de todo tipo a lo largo de la región codificadora del gen CFTR, excepto grandes deleciones o reordenamientos. Las mutaciones encontradas incluyen deleciones pequeñas, mutaciones puntuales (inserciones que provocan mutaciones sin sentido o de pérdida de sentido por cambio en el marco de lectura, así como mutaciones que afectan el procesamiento del ARN). Se sabe que una ausencia completa de la función de CFTR es compatible con la vida, porque se han reconocido pacientes homocigotos para mutaciones sin sentido y de incompatibilidad en el ensamblaje (como G542X/G542X o Δ F508/ Δ F508)(5).

Dentro de la gama tan variada de mutaciones que provocan FQ encontramos mutaciones como Δ I507 en la cual se pierden 3 pares de bases (pb) en el codón 507, lo que trae como resultado la pérdida del aminoácido Isoleucina en la posición 507 de la proteína, lo que provoca en la célula un bloqueo en el procesamiento. También mutaciones como Q493X, en donde un cambio del nucleótido citosina por el nucleótido timina en la posición 1609 en el exón 10 del gen, es responsable de una señal de alto en la posición 493 de la proteína, lo que provoca la síntesis de una proteína truncada (9). Mutaciones como G542X (sin sentido), 394delTT (cambio en el marco de lectura) y 1717-1G<A (unión de procesamientos) provocan una proteína que no se sintetiza. N1303K (mutación con pérdida de sentido) y Δ F508 (la deleción de un aminoácido) bloquean el procesamiento en la célula. Un bloqueo en la regulación se puede dar en mutaciones como G551D (mutación con pérdida de sentido). Algunas proteínas logran llegar a membrana plasmática, pero poseen

una conductancia alterada, como en R117H y R347P (mutaciones con pérdida de sentido). En algunas proteínas su función no se encuentra grandemente alterada, pero su síntesis es reducida. Esto sucede en A455E (mutación con pérdida de sentido) y en 3849+10kbC<T (mutación que provoca un procesamiento alternativo de intrones) (10). Para una descripción a grandes rasgos de lo anteriormente expuesto ver la figura 4, así como para un resumen de las mutaciones más comunes en el mundo incluidas en el primer tamizaje de este estudio.

Representación lineal de la estructura secundaria de la proteína y localización de las mutaciones dentro de la misma



TM1; Dominio transmembranal 1

TM2; Dominio transmembranal 2

PFN1; Pliegue fijador de nucleótido 1

PFN2; Pliegue fijador de nucleótido 2

Dominio R; Dominio regulador R

FIGURA 4. Representación lineal de la estructura secundaria de la proteína y localización de las mutaciones dentro de la misma. La parte superior de esta figura representa de manera lineal a la proteína CFTR en dónde los sitios relevantes se encuentran indicados. La parte inferior de la figura muestra la representación del gen CFTR en dónde es posible ubicar las porciones codificantes con los fragmentos resultantes en la proteína (parte superior), así como las mutaciones encontradas en cada uno de los exones y de esta manera relacionarlas con el producto proteico. Cada uno de los puntos (porción inferior de la figura) representa un tipo distinto de mutación. (Figura tomada de la referencia No.1).

Tabla 1. Mutaciones entre Estuches Comerciales			
Mutación	Ubicación	Estuche	Frecuencia
1. G85E	Exón 3	Kit 30	0.2
2. 405+3 ^a >C	Exón 3	Kit 30	No se conoce
3. R117H	Exón 4	Kit 30, Kit 16	0.3
4. 621+1G>T	Exón 4	Kit 30, Kit 16	0.7
5. R334W	Exón 7	Kit 30, Kit 16	0.1
6. R347P	Exón 7	Kit 30, Kit 16	0.2
7. R347H	Exón 7	Kit 30	No se conoce
8. A455E	Exón 9	Kit 30, Kit 16	0.1
9. Polimorfismos 5/7/9	Exón 9	Kit 30, Kit 16	No se conoce
10. G480C	Exón 10	Kit 30	No se conoce
11. ΔI507	Exón 10	Kit 30, Kit 16	0.2
12. ΔF508	Exón 10	Kit 30, Kit 16	66
13. F508C	Exón 10	Kit 30	No se conoce
14. I507V	Exón 10	Kit 30	No se conoce
15. I506V	Exón 10	Kit 30	No se conoce
16. 1717-1G>A	Exón 11	Kit 30, Kit 16	0.6
17. G542X	Exón 11	Kit 30, Kit 16	2.4
18. S549N	Exón 11	Kit 16	0.1
19. G551D	Exón 11	Kit 30, Kit 16	1.6
20. R553X	Exón 11	Kit 30, Kit 16	0.7
21. A559T	Exón 11	Kit 30	No se conoce
22. R560T	Exón 11	Kit 30, Kit 16	0.1
23. 2307insA	Exón 13	Kit 30	No se conoce
24. 2789+5G>A	Intrón 14b	Kit 30	0.1
25. 3120+1G>A	Intrón 16	Kit 30	No se conoce
26. R1162X	Exón 19	Kit 30	0.3
27. 3659delC	Exón 19	Kit 30	0.1
28. 3849+10kbC>T	Exón 19	Kit 16	0.2
29. S1255X	Exón 20	Kit 30	No se conoce
30. W1282X	Exón 20	Kit 30, Kit 16	1.2
31. N1303K	Exón 21	Kit 30, Kit 16	1.3

Tabla 1. Tabla comparativa entre los dos estuches comerciales utilizados para hacer el tamizaje de mutaciones inicial con las frecuencias relativas mundiales para cada una de las mutaciones incluidas en los mismos. La primera columna nombra las mutaciones incluidas en el primer tamizaje, la segunda la localización dentro del gen, la tercera el kit que incluye la mutación y la última la frecuencia relativa de la misma. Información tomada de los insertos de los estuches diagnósticos de ROCHE y del Consorcio Internación de Fibrosis Quística.

1.6 PROCESAMIENTO CELULAR

Muchas de las mutaciones halladas en los pacientes con FQ, incluida la $\Delta F508$, producen un fallo en el tránsito intracelular, es decir que pueden impedir que la proteína CFTR traducida sea enviada a su destino correcto en la membrana plasmática. Otras impiden que la proteína se forme o suprimen específicamente la actividad de sus dominios funcionales. En la variante más común $\Delta F508$, así como con muchas de las mutaciones que afectan la secuencia localizadas a lo largo de casi todos los dominios de CFTR, se provoca un plegamiento equivocado, previniendo a la proteína de adquirir su conformación nativa. Las células detectan el plegamiento inapropiado de las proteínas y las marcan para la degradación a través de una serie de procesos descritos como control de calidad biosintético (11).

En el caso de la FQ la función normal de retención del retículo endoplásmico (RE) y las vías de degradación previenen a las moléculas CFTR variantes llegar a la membrana plasmática de células epiteliales secretoras y de reabsorción, en donde la CFTR es requerida como un canal regulador de cloro (11). Para un resumen y una descripción a grandes rasgos de lo anteriormente expuesto ver las figuras 5 y 6.

El Destino de las moléculas CFTR sintetizadas en los Ribosomas asociados al RE

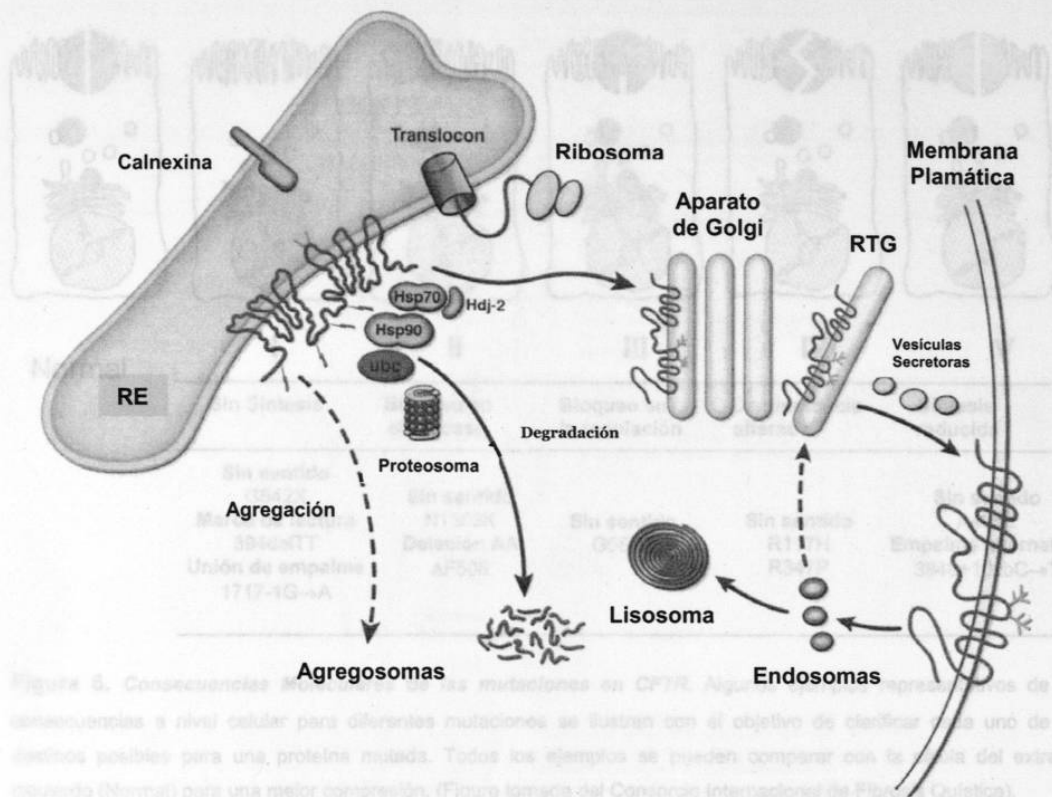


Figura 5. El destino de las moléculas CFTR sintetizadas en los ribosomas asociados al RE. Mientras que la estructura primaria es formada, el polipéptido es incorporado a la membrana del RE. Cadenas de oligosacáridos del core son incorporadas y a ellas se une la calnexina. Adicionalmente las proteínas chaperonas Hsp70, Hdj-2 y Hsp90 se unen y la ubiquitinación puede ocurrir. Para ser exportada del compartimento del RE de manera productiva vía vesículas cubiertas de COPII (Complejo Protéico de Cubierta II, no mostradas), debe ser alcanzado un grado mayor de estructura. Esta maduración conformacional dependiente de ATP es acompañada por disociación de la calnexina y las chaperonas citosólicas. Una molécula CFTR completamente plegada se encuentra protegida de degradación, pero las moléculas que no logran esta conformación (~75% de las moléculas de tipo silvestre y ~100% de las moléculas $\Delta F508$) son sustratos para enzimas ubiquitinizantes (ubc) y son degradadas por el proteosoma. Existen proteasas no identificadas involucradas, ya que no es posible prevenir la degradación por completo con la inhibición del proteosoma. Cuando la degradación es bloqueada o saturada, ocurre una degradación extensiva de moléculas incompetentes para exportación. La población competente de exportación viaja desde el RE a través del ERGIC (Compartimento Intermediario del Reticulo Endoplásmico Aparato de Golgi, no mostrado) hacia el Aparato de Golgi, en dónde se completan las cadenas de oligosacáridos complejas. Las vesículas entonces portan la molécula completa del RTG (Red Trans-Golgi) a la membrana plasmática. El reciclado endocítico de esta población y la degradación de algunas proteínas internalizadas por las proteasas lisosomales resultan en la baja cantidad de CFTR expresado en la superficie. (Figura tomada de la referencia No.11).

CONSECUENCIAS MOLECULARES DE LAS MUTACIONES EN CFTR

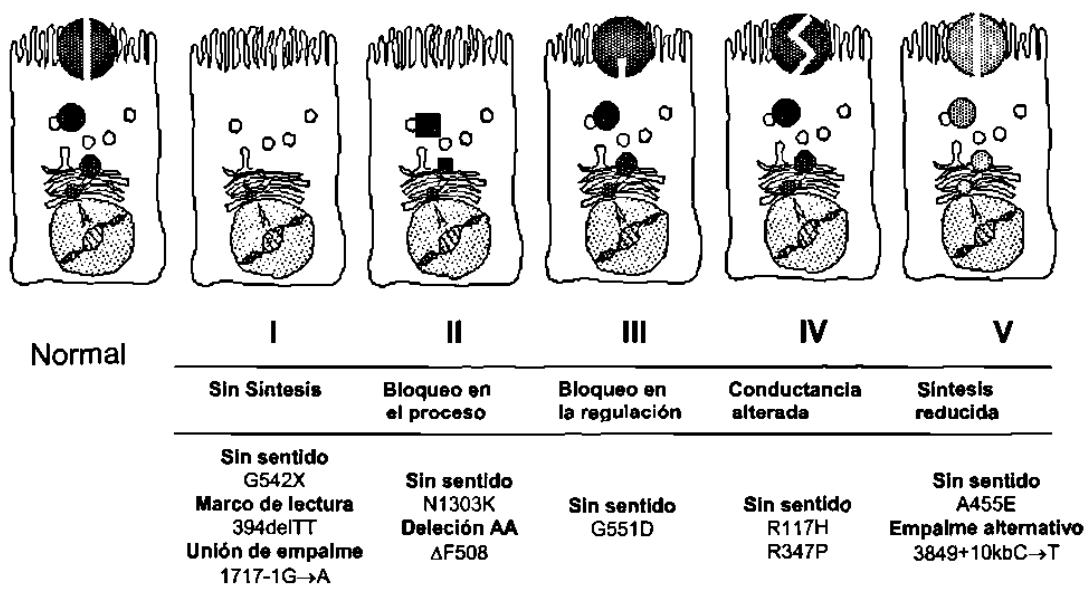


Figura 6. Consecuencias Moleculares de las mutaciones en CFTR. Algunos ejemplos representativos de las consecuencias a nivel celular para diferentes mutaciones se ilustran con el objetivo de clarificar cada uno de los destinos posibles para una proteína mutada. Todos los ejemplos se pueden comparar con la célula del extremo izquierdo (Normal) para una mejor comprensión. (Figura tomada del Consorcio Internacional de Fibrosis Quística).

1.7 PATOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

Prácticamente todas las glándulas exócrinas están afectadas con una distribución y grado variable. Las glándulas involucradas son de tres tipos: aquellas que se obstruyen por material eosinofílico sólido o viscoso en el lumen (como el páncreas, las glándulas intestinales, los ductos biliares intrahepáticos, la vejiga y las glándulas submaxilares); aquellas que son histológicamente anormales y producen un exceso de secreciones (glándulas traqueobronquiales y de Brunner); y aquellos que son histológicamente normales pero que secretan un exceso de sodio y cloruro (glándulas sudoríparas, parótidas y pequeñas glándulas salivares). Las secreciones duodenales son viscosas y contienen un mucopolisacárido anormal (12). (Figura 7).

Órganos Afectados por la Fibrosis Quística

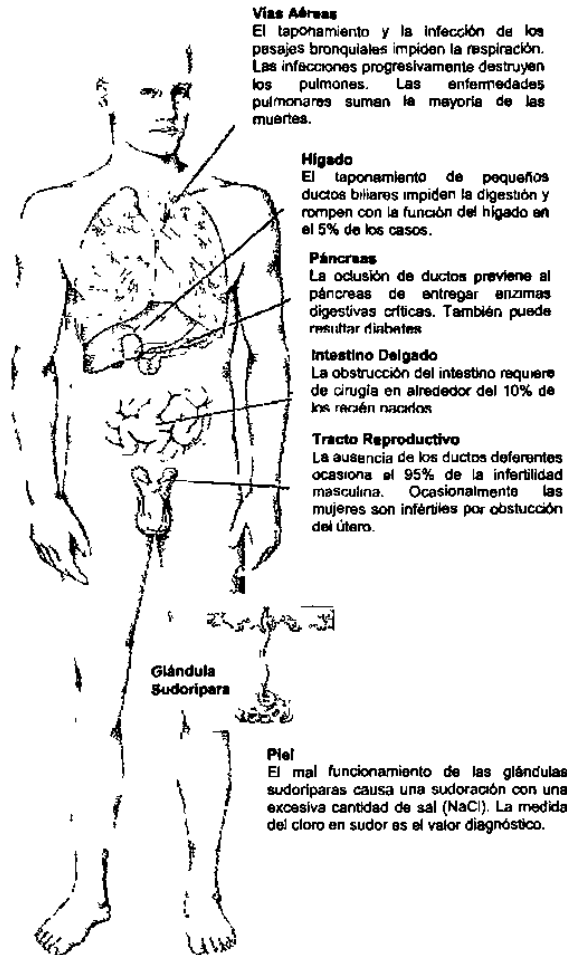


Figura 7. Órganos afectados por la Fibrosis Quística. La fibrosis quística afecta a todos los órganos que incluyen glándulas exócrinas, como lo son las vías aéreas, el hígado, el páncreas, el intestino delgado, el tracto reproductivo y la piel. (Figura tomada de referencia No.2).

1.8 FENOTIPO

El íleo meconial es la acumulación de materia mucosa anormalmente viscosa en el íleo terminal al nacimiento. Es un evento poco frecuente y un potente indicador de probable FQ, ya que no todos los pacientes con FQ nacen con íleo meconial, pero la gran mayoría de los ileos meconiales se presentan en

pacientes con FQ. La tendencia entre hermanos en la recurrencia del ileo meconial es característica de la FQ. En algunos casos se presenta el síndrome de obstrucción intestinal que ocurre en adolescentes y adultos con FQ (13).

El 96% de los pacientes con FQ que evidencian daño en hígado poseen obstrucción del tracto biliar, usualmente con un estreñimiento del ducto distal biliar común. Los pacientes sin enfermedades en hígado poseen excreciones normales intrahepáticas y del ducto común (14). Se ha descrito un caso de FQ complicado por estenosis del ducto biliar común (15).

Los pulmones y el páncreas exocrino son los órganos principalmente afectados por la enfermedad. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica se desarrolla como resultado de secreciones espesas e infecciones recurrentes, y la deficiencia de enzimas pancreáticas (lipasa, tripsina, quimotripsina) impide la digestión normal. El tratamiento de la enfermedad pulmonar parece prolongar la vida, y la digestión y nutrición pueden restablecerse en gran medida con suplementos de enzimas pancreáticas. La muerte se produce por insuficiencia pulmonar e infección. Actualmente, sólo alrededor de la mitad de los pacientes sobreviven hasta los 31 años de edad, aunque se estima que los niños nacidos en la actualidad presenten una expectativa de vida de 40 años. El curso clínico es variable. Los casos moderados se encuentran representados por pacientes que son diagnosticados hasta edad adulta (16, 12, 5).

Si estos pacientes permanecen sin tratar sus afecciones respiratorias se dañan progresivamente por infecciones crónicas que se manifiestan como pneumonías de repetición, posteriormente pneumopatía crónica, que lleva a bronquiectasis, falla respiratoria y muerte. Los pacientes de FQ habitualmente presentan problemas con organismos que regularmente no se asocian con infecciones respiratorias incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* y micobacterias no tuberculosas (17). Una explicación experimental de la

infección crónica de *P. aeruginosa* en pulmón en pacientes de FQ fue concluida de estudios con cultivos celulares epiteliales de vías aéreas superiores silvestres y mutadas que fueron expuestas a *P. aeruginosa*. Concluyeron que la proteína CFTR normalmente contribuye en un mecanismo de defensa en el hospedero que es importante para la eliminación de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio (18).

En un principio *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado del tracto respiratorio, pero a medida que la enfermedad progresa *Pseudomona aeruginosa* pasa a ser más frecuente. Una variante mucoide de *Pseudomonas* se encuentra asociada de manera única con la FQ: la colonización con *Burkholderia cepacia*, que ocurre en cerca del 7% de pacientes adultos y puede estar asociada con el deterioro rápido del pulmón (12).

Alrededor del 15% de los pacientes con FQ poseen suficiente función exocrina pancreática residual para la digestión normal, y se denominan pancreático-suficientes (PS). Estos pacientes (FQ-PS) presentan mejor crecimiento y función pulmonar, así como un pronóstico global superior que la mayoría de enfermos que son pancreático insuficientes (PI). Los datos sugieren que la mayoría de los pacientes CF-PI son descendientes de un mismo evento mutacional sencillo en el locus de FQ, mientras que los pacientes CF-PS son el resultado de múltiples eventos mutacionales distintos (19). Muchos de los pacientes CF-PI desarrollan pancreatitis idiopática (20, 21). La heterogeneidad clínica de la enfermedad pancreática se debe, al menos en parte, a heterogeneidad alélica, un punto que se discute más adelante (5).

El aparato genital también está afectado en la FQ. El 98% de los varones presentan obstrucción de las vías deferentes e incluso es usual que estas vías no se desarrollen, lo que resulta en una azoospermia obstructiva. La infertilidad en mujeres con fibrosis quística es debida a las características del moco

cervical, sin embargo muchas mujeres con FQ tienen embarazos que llevan a término. La incidencia de complicaciones maternas aumenta para éstas mujeres. Sólo algo más del 10% de las pacientes que llegan a edad reproductiva son fértiles (22, 12, 5).

De un estudio retrospectivo de cohorte donde estudiaron la ocurrencia de cáncer en 28,511 pacientes con FQ en los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá de 1985 a 1992 se concluyó que a pesar de que el riesgo de padecer cáncer en pacientes con FQ es similar al de la población general, existe un riesgo incrementado a padecer de cáncer del tracto digestivo (23).

En la mayoría de los pacientes con FQ, el diagnóstico puede basarse en los hallazgos pulmonares o pancreáticos, así como en un nivel elevado de cloruro, en el sudor (más de 60 mEq/l), una anomalía que inicialmente se refleja en el sabor salado de la piel. Menos del 2% de los pacientes presentan niveles normales de cloruro de sodio y un cuadro clínico por demás típico. En estos casos puede utilizarse el análisis molecular para detectar mutaciones en el gen CFTR (5).

1.9 CORRELACIONES ENTRE GENOTIPO Y FENOTIPO

Los análisis de ligamiento molecular han establecido sólidamente que toda FQ se debe a mutación en el locus CFTR del cromosoma 7 y no en ningún otro gen. Por lo tanto, la heterogeneidad clínica de la FQ debe generarse a partir de heterogeneidad alélica, efectos de otros loci modificadores o factores no genéticos. Hoy, muchos alelos pueden asignarse con certeza a un fenotipo clínico. Los sujetos homocigotos para la mutación $\Delta F508$ pertenecen casi exclusivamente al fenotipo PI, así como aquellos con la mutación $\Delta I507$. Por otra parte, se espera que el 20% de individuos con un fenotipo PS porten una mutación benigna en al menos uno de ambos cromosomas (5).

Las mutaciones $\Delta F508$ y $\Delta I507$ afectan al PFN1 y las mutaciones en este dominio, gran parte del cual está altamente conservado, generalmente, aunque no siempre, provocan el fenotipo PI. Así, dos mutaciones, PFN1, 455 Ala \rightarrow Glu y 547 Pro \rightarrow His, producen cada una el fenotipo PS cuando forman un compuesto genético con el alelo grave $\Delta F508$. Es interesante destacar que se han encontrado pacientes con mutaciones sin sentido en cada copia del gen CFTR, que presentan enfermedad pulmonar leve, aunque ambos sufren insuficiencia pancreática grave. Una posible explicación de este fenotipo es que la ausencia del polipéptido CFTR en el pulmón puede resultar menos perjudicial que una proteína defectuosa que afecte el transporte iónico (5).

Existe una cadena de timidinas en el extremo terminal del intron 8 denominado locus Tn del gen CFTR que es variable, de manera que se pueden encontrar 3 alelos diferentes dependiendo del número de timidinas (5,7 y 9) presentes en este sitio (24). El número de timidinas determina la eficacia por la cual el sitio aceptor de procesamiento del intron 8 es utilizado. La eficiencia disminuye a medida que la cadena residual de timidinas es más corta. Una proporción más alta de transcritos de CFTR que carecen de la secuencia del exón 9, que codifica para parte de el PFN1 serán encontrados cuando este gen posea una cadena de timidinas corta (25). Si un gen CFTR con la mutación arg117 \rightarrow his (R117H) alberga al alelo 5T el gen mutante será el responsable de la FQ. La mutante del gen CFTR R117H que alberga el alelo 7T puede traer como consecuencia FQ o ausencia bilateral de las vías deferentes (CBAVD por sus siglas en inglés) (26). La mayoría de los transcritos de CFTR que poseen el alelo 5T carecerán de la secuencia del exón 9. Se sabe que tales transcritos deficientes del exón 9 traducirán proteínas que no madura y por lo tanto no funcionan como canales de iones cloruro en la membrana apical de las células epiteliales. Se postula que diferencias específicas de tejido en la proporción de transcritos de CFTR que carezcan del exón 9 pueden contribuir a fenotipos con especificidad de tejido que se observan en individuos con CBAVD (27).

Además del locus polimórfico Tn, más de 120 polimorfismos han sido descritos en el gen CFTR (10). Se ha hipotetizado que la combinación de alelos particulares en varios loci polimórficos pueden resultar en una proteína CFTR menos funcional o insuficiente. La cantidad y la calidad de los transcritos de CFTR se encuentran afectadas por otros dos loci polimórficos: M470V y un polimorfismo de repetición dinucleotídica (TG)_n. Se ha encontrado que las proteínas CFTR M470 maduran de manera más lenta y presentan un incremento en su función intrínseca de pasaje de iones cloruro al compararla con las proteínas V470, lo que sugiere que el locus M470V también puede participar parcialmente en la penetrancia de 5T como mutación. Tales genes mutantes polivalentes pueden explicar por qué genes CFTR aparentemente normales causan enfermedad. Más aún, pueden ser responsables de la variación en la expresión fenotípica de las mutaciones en CFTR (28).

Problemas adicionales en la realización de las correlaciones genotipo - fenotipo pueden tener su origen en la presencia no de dos mutaciones causantes del fenotipo de FQ, sino de tres mutaciones; dos de ellas dentro de un mismo alelo. En un estudio en el que se trabajó con 44 pacientes de origen Búlgaro, 4 de ellos poseían 2 mutaciones distintas en un mismo alelo. Dos de los alelos mutantes dobles incluían una mutación con pérdida de sentido y una mutación sin sentido. Aunque la mutación con pérdida de sentido puede ser considerada el defecto principal, las sustituciones aminoacídicas son candidatas de mutaciones causantes de enfermedad (29). Un ejemplo para sustentar esto, se refiere a pacientes homocigotos para $\Delta F508$ que presentan concentraciones normales de electrolitos en sudor si una segunda mutación, R553Q también se encuentra presente. De esta forma se comprueba que genotipos complejos como estos pueden fácilmente escapar un primer análisis de mutaciones y aportar fenotipos no concordantes para el genotipo identificado.

1.10 CITOGENÉTICA EN LA FQ

Se cuenta con por lo menos dos casos que evidencian errores de no disyunción que contribuyeron en la herencia de FQ. Los investigadores Spence y cols. en 1988 y Voss y cols. en 1988 y 1989 reportaron estos casos. Estos errores suceden durante la mitosis y pueden ocurrir en la primera o en la segunda división meiótica. Básicamente lo que sucede es que al momento de dividirse una célula en dos, una de ellas se lleva un cromosoma más de los que debería. Esto resulta en dos células anormales en su número de cromosomas, una contiene un cromosoma extra (y por lo tanto repetido) y la otra contiene un cromosoma menos. Normalmente cuando esto sucede en los gametos, los productos derivados de los mismos no son viables o poseen cromosopatías numéricas como la trisomía 21, 18, 13 o el síndrome de Turner (unisomía 11) o el de Klinefelter (uno o varios cromosomas X adicionales, aunque se han presentado algunos casos de mosaicismo – cromosomas X y Y) (5).

En estos casos la etiología de los mismos no es clara, pero pueden ser explicados por uno de varios mecanismos como la concepción monosómica con subsecuente adquisición cromosómica, la concepción trisómica con la subsecuente pérdida cromosómica, error de postfertilización o la complementación de gametos. Cualquiera de éstos mecanismos traen como consecuencia que uno de los padres aportara un cromosoma 7 doble (idéntico poseyendo la misma mutación por duplicado) y el otro no aportara ningún cromosoma 7, lo que se conoce como disomía uniparental. De manera que el producto posee un número de cromosomas normal, pero el cromosoma 7 fue heredado solo de uno de sus padres (30, 31, 32).

1.11 EL GEN CFTR EN LAS POBLACIONES

En la actualidad no es posible explicar la elevada frecuencia del gen CFTR mutado de 1 por 45 alelos que se observa en poblaciones de raza

blanca. La enfermedad resulta mucho menos frecuente en individuos de otras razas, si bien se ha documentado en indios americanos, negros y asiáticos (por ejemplo: 1 por 90.000 hawaianos de ascendencia asiática) (5).

El alelo $\Delta F508$ es el único hallado hasta la fecha que es frecuente en casi todas las poblaciones de raza blanca. El análisis de haplotipos en poblaciones de raza blanca indica que la mayor parte de los alelos y en particular el alelo $\Delta F508$, poseen una estricta correlación de haplotipos y por tanto, tienen un solo origen. El análisis directo de ADN mediante la secuenciación de ADN amplificado se ha utilizado para determinar la frecuencia del alelo $\Delta F508$ en varias partes de Europa. La frecuencia de este alelo parece variar de modo significativo en diferentes poblaciones, de 0.88 en Dinamarca a 0.45 en las partes sur y central de Italia (5).

La frecuencia con que esta enfermedad se presenta en Latinoamérica, especialmente en México es desconocida. En la actualidad el diagnóstico de FQ se puede realizar buscando directamente la mutación $\Delta F508$ mediante PCR y gel de poliacrilamida o por estuches comerciales diseñados con las mutaciones más comunes para la población caucásica, en la cual detectan hasta un 85% de las mutaciones. Estos estuches sólo detectan aproximadamente el 50% de las mutaciones en la población mexicana, ya que nuestra etnia presenta mutaciones nativas o propias que aún no han sido investigadas o descritas.

En México se han hecho algunos estudios al respecto y se ha encontrado que de entre los alelos diagnosticados, las frecuencias de mutaciones en nuestro país tienen una distribución semejante a las observadas en España, aunque el 52.1% de los alelos permanecen sin identificación (3). En un estudio hecho en un grupo de pacientes de la población del centro y sur de nuestro país se detectaron 7 mutaciones nuevas en el gen de la FQ k2055del9→A, 1924del7, W1098C, P750L, 846delT, 4160insGGGG y 297-1G→A (4), sin

embargo, en este trabajo aún quedó un gran porcentaje (20.66%) de alelos sin ser diagnosticados.

Es importante notar que en una investigación reciente hecha en varios países de América Latina (México, Colombia y Venezuela) se encontraron para México los siguientes porcentajes de mutaciones conocidas: $\Delta F508$ (47.8%), G542X (4.4%), N1303K (1.1%), 3849+10kb C>T (2.2%), 621+1 G>T (1.1%) y S549N (1.1%). El 42.2% de las mutaciones de pacientes con FQ resultaron ser mutaciones desconocidas (3).

Esta incidencia de mutaciones no descritas es muy alta. Como consecuencia de la carencia de un estuche diagnóstico de FQ apropiado para la población mexicana, según este último estudio, solo se puede detectar el 58.8% de las mutaciones para la FQ. Este porcentaje tan bajo de efectividad para la prueba provoca una incertidumbre muy alta en las familias con un integrante afectado (generalmente un menor) que no presenta un cuadro clínico característico, en aquellas parejas que deseen conocer el riesgo de procrear un niño afectado, o en aquellos pacientes para los cuales la prueba molecular confirmatoria no arroja resultados positivos.

Un mejor conocimiento de nuestras mutaciones y su distribución, así como un futuro estudio de haplotipos podrían despejar muchas incógnitas (muy probablemente la gran mayoría de ellas) que actualmente nublan el diagnóstico, terapia de sostén y el origen de esta enfermedad en nuestra población.

1.12 JUSTIFICACIÓN

Se ha estudiado intensamente al gen CFTR en las poblaciones caucásicas y en algunas poblaciones de etnicidad distinta que actualmente habitan mezclados dentro de estas poblaciones. En Latinoamérica, y específicamente en México, muy poco se ha hecho al respecto. El propósito del presente trabajo es contribuir a acrecentar el conocimiento molecular del gen CFTR que a la fecha es casi nulo para la población del noreste de México. Los datos por este estudio develados servirán para mejorar tanto al diagnóstico como a la terapéutica de la fibrosis quística.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar las mutaciones en el gen CFTR prevalentes en una población del noreste de México, en pacientes clínicamente diagnosticados con fibrosis quística y que fueron negativos en cuando menos un alelo para las 16 mutaciones más comunes reportadas para caucásicos.

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar incidencia de las mutaciones más comunes en nuestra población.
- Describir mutaciones poco frecuentes o nuevas en el gen de la fibrosis quística y conocer su frecuencia en una muestra de la población del noreste de México.
- Una vez caracterizadas las mutaciones en los pacientes, se llevará a cabo una correlación entre el tipo de mutación y la severidad de la enfermedad.
- Si se encuentra alguna mutación en un paciente se procederá al análisis de portadores en los padres y hermanos de éste.
- Comparar nuestros resultados con los obtenidos tanto en otros grupos de México como en otras partes del mundo.

2.2 HIPÓTESIS

H1. La frecuencia de mutaciones en el gen de la fibrosis quística en México se encuentra en desequilibrio con respecto a la de la población caucásica debido a la existencia de mutaciones nativas de la población mexicana.

H2. Existe una relación entre la mutación y el cuadro clínico, así como con mutación y severidad en la fisiopatología de la enfermedad.

Ho1. La frecuencia de mutaciones en el gen de la fibrosis quística en México no se encuentra en desequilibrio con respecto a la de la población caucásica.

Ho2. No existe una relación entre mutación y el cuadro clínico, así como con mutación y severidad en la fisiopatología de la enfermedad.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1. Área de trabajo.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L..

3.1.2. Material Biológico.

De cada uno de los individuos a analizar, así como de los individuos control, se obtuvieron 2 muestras de sangre periférica tratadas con EDTA.

3.1.3. Reactivos Químicos.

Para el aislamiento de ADN se utilizó EDTA, SDS, NaCl, trizma base, tritón X-100 y fenol, adquiridos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA), así como ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico y etanol, de la compañía Merck (México, D.F.).

Se utilizó enzima Biotaq producida en el Laboratorio de Biotecnología de la ULIEG, (U.A.N.L., Monterrey, N.L., México), empleando una clona de *Escherichia coli*, portadora de un plásmido que expresa la enzima, donado por el Dr. Pedro León de la Universidad de Costa Rica. La solución amortiguadora de reacción, cloruro de magnesio y dNTP's se adquirieron de Promega (Madison, WI, EUA) y el aceite mineral de Sigma Chemical Company.

Para las electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio; y para las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED, EDTA, trizma base, glicerol y bromuro de etidio, todos de Sigma Chemical Company. Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis, se utilizó ADN del plásmido pUC, digerido con las enzimas de restricción *Hae III* o *Alu I*. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA) y los ADN's plasmidicos se obtuvieron mediante protocolos estándares de extracción de ADN a mediana escala realizados en la ULIEG y descritos por Sambrock y cols., 1989.

El tamizaje de las 28 mutaciones para fibrosis quística se realizó con el estuche de investigación "Ensayo prototipo de investigación de FQ" de Roche Molecular System, Inc. (Alameda, CA, EUA). Para la purificación de ADN a partir de geles de poliacrilamida obtenidas por SSCP se utilizó el estuche comercial QIAEX II de la compañía Qiagen (Alemania).

3.1.4. Material.

Los tubos de microcentrífuga (de 0.5, 1.5 y 2.0 ml), las puntillas (de 0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de precisión, los tubos cónicos de polipropileno (de 15 y 50 ml) y los guantes de látex fueron comprados a Cell Associates (Houston, TX, EUA). Las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20, 200 y 1000 μ l fueron obtenidas de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA).

3.1.5. Equipo.

En el aislamiento de ADN's se utilizó una centrífuga clínica de mesa Beckman TJ6, un vortex modelo 376000 de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen,

Alemania) y una microcentrífuga Eppendorf modelo 5412 (Hamburg, Alemania). Los termocicladores utilizados fueron: Termociclador PTC-100 de 60 pozos JM-Research (Watertown, MA, EUA), Omni-E Haydbaid de 96 pozos (Reino Unido) y el modelo 24000 de Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA).

Para analizar los productos amplificados por la PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales Fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras verticales de 20 x 20 cm y una fuente de poder de Gibco-BRL modelo 250.

Para analizar los geles, tanto de agarosa como de poliacrilamida, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa de apoyo molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

3.1.6. Apoyo Computacional, de Informática y Sistemas.

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Acer Power P75 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido por una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD). El procesador de texto utilizado fue Microsoft Word 97 (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos Microsoft Power Point 97 (Microsoft Corporation), Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1 (Adobe System Incorporated) y UMAX Scan (UMAX Scanner Driver, Impact Research, Inc.).

Los programas computacionales de Biología Molecular empleados fueron: Amplify versión 1.2b (Bill Engels 1992, University of Wisconsin Genetics M, Madison, WI, EUA), Oligo versión 4.0 (Plymouth, MN, EUA) y Molecular Analyst (BIO RAD). Las páginas y programas utilizados por vía INTERNET fueron: Entrez (National Center for Biotechnology Information [NCBI]; Blast Network Service [Blaster]; Gen Bank [ICEBERG, Trieste, Italia]). El programa utilizado para navegar en Internet fue el Microsoft Internet Explorer versión 4.0.

Alemania) y una microcentrífuga Eppendorf modelo 5412 (Hamburg, Alemania). Los termocicladores utilizados fueron: Termociclador PTC-100 de 60 pozos JM-Research (Watertown, MA, EUA), Omni-E Haydbaid de 96 pozos (Reino Unido) y el modelo 24000 de Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA).

Para analizar los productos amplificados por la PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales Fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras verticales de 20 x 20 cm y una fuente de poder de Gibco-BRL modelo 250.

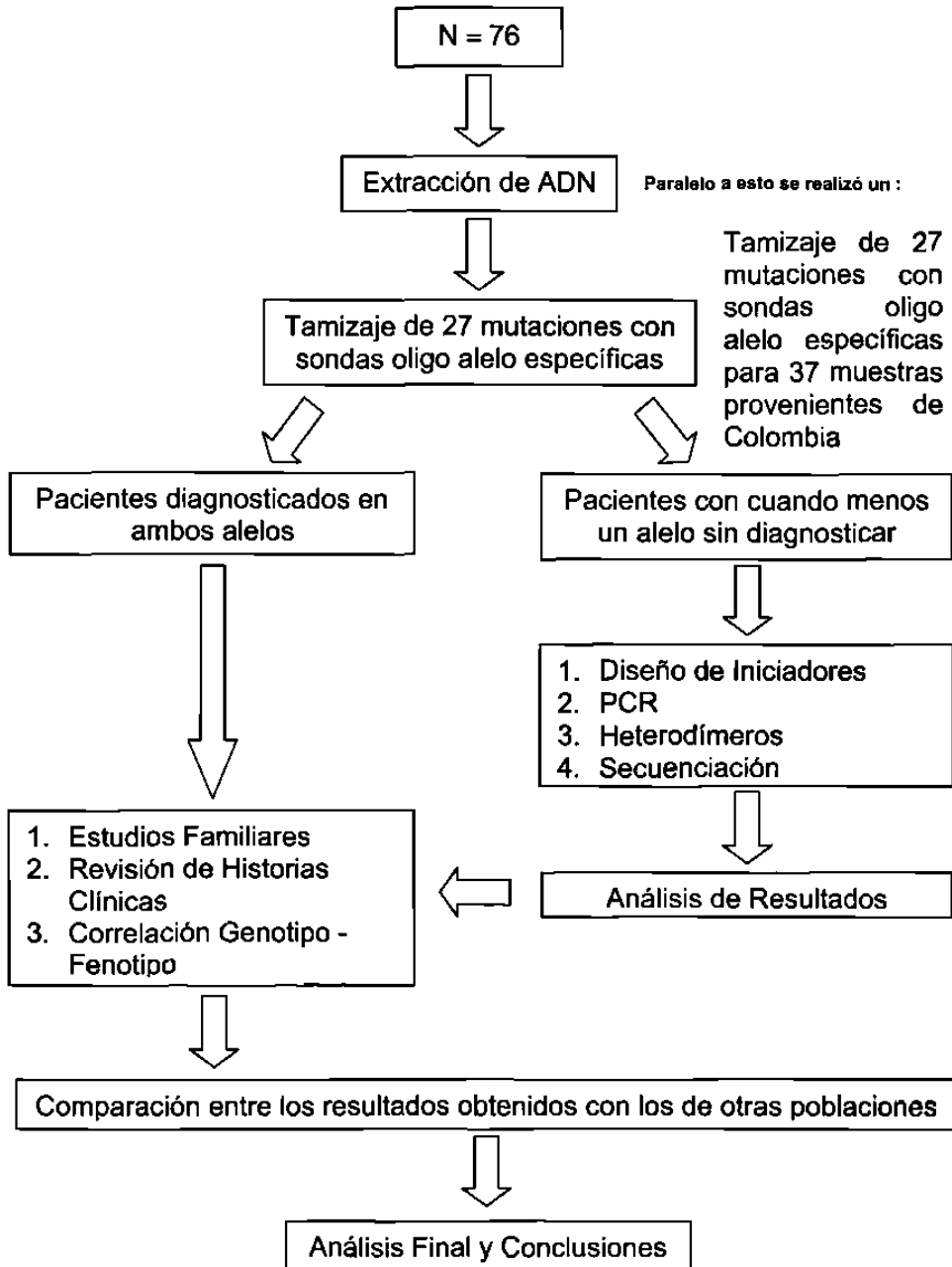
Para analizar los geles, tanto de agarosa como de poliacrilamida, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa de apoyo molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

3.1.6. Apoyo Computacional, de Informática y Sistemas.

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Acer Power P75 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido por una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD). El procesador de texto utilizado fue Microsoft Word 97 (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos Microsoft Power Point 97 (Microsoft Corporation), Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1 (Adobe System Incorporated) y UMAX Scan (UMAX Scanner Driver, Impact Research, Inc.).

Los programas computacionales de Biología Molecular empleados fueron: Amplify versión 1.2b (Bill Engels 1992, University of Wisconsin Genetics M, Madison, WI, EUA), Oligo versión 4.0 (Plymouth, MN, EUA) y Molecular Analyst (BIO RAD). Las páginas y programas utilizados por vía INTERNET fueron: Entrez (National Center for Biotechnology Information [NCBI]; Blast Network Service [Blaster]; Gen Bank [ICEBERG, Trieste, Italia]). El programa utilizado para navegar en Internet fue el Microsoft Internet Explorer versión 4.0.

3.2 Estrategia General



3.3 Selección de la Muestra

El universo de estudio estuvo constituido por individuos clínicamente diagnosticados con FQ (electrolitos en sudor elevados, íleo meconial en el nacimiento, esteatorrea, pneumopatía crónica e hipocratismo - cuando menos tres de los criterios anteriores para cada individuo incluido -). Esta muestra se obtuvo del banco de ADN de pacientes con FQ del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de pacientes del servicio de diagnóstico molecular de la ULIEG o pacientes que ingresaron a la Asociación de Fibrosis Quística de Nuevo León, a los cuales se les hizo el diagnóstico y no se les detectó mutación alguna en por lo menos un alelo por un estuche comercial capaz de detectar las 16 mutaciones más comunes en caucásicos.

Los controles negativos fueron individuos sanos que no padecen fibrosis quística y que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Universitario, aceptando participar en forma voluntaria en el estudio propuesto; ambos grupos debieron firmar una Forma de Consentimiento Informado (anexo 1).

Todos los individuos se encontraban en pleno uso de sus facultades mentales, y en los casos en los cuales se trató con un menor, sus padres cumplieron con este requisito.

3.3.1 Datos Familiares

Se realizó un cuestionario a cada individuo que aceptó participar en el estudio con el fin de sustentar que los individuos sanos fueron seleccionados correctamente asegurándose que no presenten antecedentes propios ni familiares de fibrosis quística.

3.3.2 Datos Demográficos y Severidad de Fibrosis Quística

Se realizó un cuestionario a cada individuo que aceptó participar en el estudio, con el fin de calificar la severidad del caso, así como su patrón de herencia y el lugar de su procedencia.

3.4 Identificación de mutaciones

3.4.1 Naturaleza de la muestra

La muestra de trabajo fue sangre periférica, recolectada en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante. Se tomaron aproximadamente 5 ml de muestra en estas condiciones. Las muestras se homogeneizaron en un homogeneizador Labquake de Barnstead/Thermoline por espacio de 1 hora y posteriormente se refrigeraron.

3.4.2 Extracción de ADN

Una vez muestreada la población de la Asociación de Fibrosis Quística de Nuevo León y después de realizar la búsqueda de ADN de pacientes con FQ del Banco de ADN del laboratorio de Diagnóstico Molecular de la ULIEG, se procedió a realizar la extracción del ADN de las muestras nuevas.

La extracción de ADN se realizó por la técnica de TSNT como se muestra en el anexo 2. Para este propósito, los leucocitos son lisados con el buffer de lisis TSNT (Tritón, SDS, NaCl, Tris-HCl y EDTA), liberando el contenido citoplasmático y resultando una mezcla compuesta básicamente de proteínas, lípidos y ácido nucleicos. Las proteínas desnaturalizadas fueron extraídas con fenol y cloroformo. Esta mezcla se sometió a centrifugación de la que se deriva una placa sólida entre la fase acuosa y la fase orgánica. Enseguida se recuperó la fase acuosa (la fase superior) que contiene al ADN. Finalmente se obtuvo el material genético en la fase acuosa mediante precipitación con etanol.

El ADN se lavó con etanol al 70% para limpiarlo del exceso de sales, se secó y disolvió en una solución amortiguadora de Tris-EDTA.

El último paso fue el de la verificación del éxito de la extracción, en dónde también se comprobó la cantidad y calidad del ADN extraído. Para ello se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con una alícuota (4 μ l) de la solución en dónde se disolvió el ADN de cada una de las muestras. Concluyendo el procedimiento con la verificación en el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 de Bio Rad después de teñir el gel con bromuro de etidio y exponerlo a la luz ultravioleta (anexo 3).

3.4.3 Estrategia de detección de la mutación Δ F508

El ADN extraído fue sometido a la PCR, en la cual la enzima termoestable Taq polimerasa se encargó de sintetizar de manera muy precisa la secuencia nucleotídica complementaria a la hebra molde comprendida entre los cebadores diseñados para cubrir el área flanqueante a la región del exón 10, dónde reside el codón Δ F508 (anexo 4).

Para que la reacción se lleve a cabo con eficacia es necesario realizar una mezcla de reacción que incluye dNTPs, $MgCl_2$, un amortiguador especial, la mezcla de iniciadores, el ADN de interés, la enzima Taq polimerasa y el agua miliQ. El primer paso de la reacción es la desnaturalización del ADN, es decir, separar las dos cadenas sencillas que forman la doble hebra del ADN. Para lograr este propósito solo es necesario elevar la temperatura del tubo en el que se encuentra el ADN a una temperatura muy cercana al del punto de ebullición del agua (94°C son suficientes). Enseguida se disminuye la temperatura a una menor o igual a 72°C y habitualmente mayor a 50°C, en este caso la temperatura utilizada fue de 55°C. A esta temperatura se lleva a cabo el acoplamiento y alineación de los iniciadores. Ahora lo siguiente es llevar la

temperatura a 72°C, que es la temperatura óptima de acción de la Taq polimerasa, enzima encargada de copiar fielmente el fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores específicos de la reacción. A esta secuencia de eventos se le denomina ciclo, para obtener numerosas copias del fragmento de interés es ineludible efectuar varios ciclos. Lo usual es realizar de 25 a 40 ciclos, en este caso se utilizaron 30 ciclos. Una vez obtenido el producto amplificado de la reacción anterior este es corrido en un gel de agarosa al 2% y posteriormente se tiñe con bromuro de etidio para verificarlo en el equipo de fotodocumentación.

Confirmada la amplificación se procedió a correr los productos amplificados en un gel de poliacrilamida al 12% el cual se tiñó con bromuro de etidio y el patrón de bandas se analizó para ver diferencias en el corrimiento de las muestras aún cuando estas sean muy pequeñas (anexo 5).

El objetivo de realizar esta metodología es lograr discernir entre dos alelos, el sano (con una longitud de 98 pares de bases) y el afectado (con una longitud de 95 pares de bases). Esta diferencia en la longitud de los fragmentos es debida a que los iniciadores utilizados flanquean al codón 508 del gen, posición que se pierde al hallarse presente la mutación $\Delta F508$. Esta pérdida de 3 bases es suficiente para resolverse en un gel de poliacrilamida al 12% cuando se someten las moléculas a un campo eléctrico de 100 Volts, forzándolas a recorrer una distancia promedio de 15 cm.

3.4.4 Análisis por sondas Oligo Alelo Específicas (ASO)

El prototipo del ensayo de investigación de FQ está basado en tres procesos (que se describen con detalle posteriormente): una PCR, la hibridación de sondas oligo alelo específicas con productos amplificados complementarios y la detección de los productos amplificados unidos a las sondas por color. En un principio se utilizó un estuche que detecta a las 16

mutaciones más comunes en el mundo, pero durante la investigación Roche diseñó un nuevo estuche que nos pidió probáramos, lo cual hicimos. Con este estuche de investigación fuimos capaces de detectar a las 26 mutaciones más comunes en el mundo (incluida $\Delta F508$), los 3 polimorfismos Tm y los 3 polimorfismos de la región del exón 10 que contiene a los codones 508 y 507.

3.4.4.1 Ensayo de PCR

El ensayo de PCR involucra la identificación positiva de la región particular del ADN blanco a amplificar y la utilización de dos pequeños iniciadores oligonucleotídicos biotinilados que son complementarios a la región flanqueante a la secuencia blanco. En la reacción de amplificación, estos iniciadores biotinilados (13 pares) se utilizan simultáneamente, se unen a la región blanco y entonces, catalizado por la polimerasa, se realiza una extensión en la dirección 5' a 3' utilizando un exceso de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) en la mezcla de la reacción, creando trece secuencias de ADN complementarias biotiniladas denominadas amplicón. (anexo 6).

3.4.4.2 Ensayo de Hibridación de sondas ASO

Las sondas oligonucleotídicas específicas de las secuencias de FQ de interés son fijadas a una membrana de nylon para la captura de secuencias específicas, los amplicones. El sistema de detección utilizado en este ensayo es el del conjugado estreptavidina – peroxidasa de rábano (SA-HRP) que se une a los amplicones biotinilados capturados en la membrana. Después del proceso de amplificación de PCR los amplicones son químicamente desnaturalizados de las hebras sencillas para su posterior traslado a las cubas de hibridación que contienen a las membranas de nylon con las sondas que contienen fijados las sondas oligonucleotídicas. Los amplicones marcados con biotina se unirán (hibridarán) a las sondas específicas de secuencia y por lo tanto podrán ser capturadas por la membrana. Las condiciones astringentes para la hibridación y los lavados aseguran la especificidad de la reacción.

3.4.4.3 Reacción de Detección

Los sustratos utilizados para la transformación de color en el ensayo son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la tetrametilbenzidina (TMB). Después de un lavado astringente a la membrana de nylon para la remoción del material no unido, el SA-HRP (conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano) es adicionado a cada una de las cubas de la placa de hibridación. La estreptavidina se une a los amplicones marcados con biotina capturados por la sonda unida a la membrana. Después de lavar el conjugado no unido, al conjugado SA-HRP se le hace reaccionar con peróxido de hidrógeno y TMB para formar un complejo coloreado. La reacción se detiene al lavar las cubas con agua MiliQ. La presencia de los controles de los exones es verificada y se toma nota del patrón de señales (anexo 7).

3.4.5 Tamizaje de mutaciones mediante heterodímeros y SSCP's

Hasta este momento de las técnicas utilizadas tan solo la de hibridación (para detectar las 26 mutaciones más comunes) fue estandarizada por primera vez en el laboratorio. La PCR para $\Delta F508$ y la hibridación para tamizaje de las 16 mutaciones más comunes en el mundo ya habían sido previamente estandarizadas.

Después de haber realizado éstos dos primeros tamizajes en busca de $\Delta F508$ y las otras 25 mutaciones más comunes, se procedió a realizar un tamizaje exón por exón del gen CFTR. Para lograr esta empresa, hubo que diseñar iniciadores que abarcaran al gen.

Se diseñaron 30 juegos de iniciadores que amplifican la región promotora y los primeros 23 de los 24 exones del gen CFTR. Como herramientas del trabajo fue necesaria la utilización de los programas computacionales Oligo, Amplify y Clustaw. El programa Oligo fue la herramienta utilizada para el diseño crudo de los iniciadores. El programa Amplify se utilizó para verificar que la

amplificación virtual fuera posible y de buena calidad sin inespecificidades a condiciones astringentes. Por último el Clustaw se utilizó para determinar si estos oligos una vez sintetizados podrían aparearse con otras secuencias ya sea del genoma humano o de cualquier otro y con qué porcentaje de similitud.

Con esto fue posible amplificar la región promotora y la región traducible del gen, tan solo con la excepción del exón 24. Los fragmentos amplificados varían en tamaño, pero se procuró que estuvieran dentro de los límites adecuados para el tamizaje por SSCP's (entre 80 y 350 pb). En el diseño se cuidó de no aparearse los iniciadores muy cerca del inicio de la transcripción o del inicio y terminación del procesamiento o "splicing". Aún así hubo casos en los que no fue posible evitar el apareamiento cerca del sitio de inicio de la transcripción o del inicio y terminación del procesamiento o "splicing". (anexo 8).

3.4.6 Análisis de SSCP's

El análisis por SSCP (por sus siglas en inglés; Single Stranded Conformational Polimorphisms) presenta una alta sensibilidad (varía de un 35 a casi un 100% para secuencias cortas de 100 a 150 pb) a la presencia de variaciones en las secuencias. Éste se basa en una desnaturalización por calor del producto previamente amplificado, que es sometido a una electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Durante la electroforesis los fragmentos de ADN de cadena sencilla se pliegan en una estructura tridimensional de acuerdo a su secuencia primaria. La separación entonces se realiza basándose en la forma que adoptan las moléculas. Si productos de PCR silvestre y mutante difieren en su secuencia, aunque sea tan solo en un solo nucleótido, adoptaran estructuras tridimensionales distintas y exhibirán movildades electroforéticas diferentes.

Para prevenir que las dos hebras de ADN se reaparean para formar una cadena doble, la concentración de los productos de PCR debe mantenerse

muy baja en el amortiguador de cargado. Habitualmente para lograr visualizar las bandas es necesario marcarlas con radioactividad. Sin embargo, como alternativa la tinción con plata ha dado buenos resultados de sensibilidad (anexo 9).

3.4.7 Análisis de Heterodímeros

Los heterodímeros es un método de búsqueda de mutaciones basado en la resolución electroforética de los fragmentos de ADN de doble hebra, de los fragmentos de ADN de longitud y secuencia idéntica a excepción de un mal apareamiento de bases. Este mal apareamiento es formado cuando un fragmento de ADN es mezclado con un fragmento mutado de ADN. Cuando la mezcla es calentada hasta la desnaturalización y se le permite enfriarse lentamente para permitir el apareo al azar de las hebras, cuatro tipos de moléculas se formarán:

1. ADN de tipo silvestre - formado cuando la hebra de tipo silvestre se aparea con otra hebra de tipo silvestre.
2. ADN mutante - formado cuando la hebra mutante se aparea con otra hebra mutante; y
3. Dos especies de heterodímeros, formadas cuando la hebra silvestre I se aparea con una mutada II y cuando una mutada I se aparea con una silvestre II.

Existen dos tipo de heterodímeros. El primero se forma cuando ocurren diferencias en las secuencias debidas a una o más mutaciones puntuales entre dos fragmentos de ADN, el heterodímero resultante es denominado heterodímero de tipo "burbuja". El segundo tipo se forma cuando las diferencias en las secuencias entre los fragmentos son pequeñas inserciones o deleciones, el heterodímero resultante es denominado heterodímero de tipo "abombado". A pesar de que los "abombamientos" son el resultado de grandes perturbaciones estructurales del homodímero de doble cadena y son fácilmente resueltos en

geles de poliacrilamida, el cambio en la estructura general debido a una "burbuja" es mucho más sutil y estos heterodímeros son típicamente no resolubles de los heterodímeros en geles de agarosa o poliacrilamida (anexo 10).

3.4.8 Secuenciación

La secuenciación fue el último paso obligado una vez terminados los pasos anteriores de tamizaje e identificación de variantes por heterodímeros.

3.4.8.1 Purificación del Producto Amplificado

Una vez amplificadas las muestras identificadas como variantes (probables mutaciones o polimorfismos a lo largo del gen) se proceda a purificar el producto amplificado para éstas muestras, previo a su secuenciación.

El procedimiento de purificación llevado a cabo fue el método enzimático. Éste consiste en adicionar a un producto amplificado de interés una mezcla de dos enzimas, la exonucleasa I y la fosfatasa alcalina encogedora. Una vez terminada la PCR en la mezcla quedan remanentes de dNTP's e iniciadores que interfieren en el procedimiento de secuenciación. Ambas enzimas son activas en el buffer de reacción de PCR, y su objetivo es degradar a los iniciadores y a los dNTP's. La exonucleasa I remueve los iniciadores residuales de cadena sencilla y cualquier ADN de cadena sencilla ajeno producido por la PCR. La fosfatasa alcalina encogedora remueve a los dNTP's remanentes de la mezcla de PCR que pueden interferir en la reacción de secuenciación. Ambas enzimas se inactivan simplemente calentando la mezcla a 80°C por espacio de 15 minutos (anexo 11).

Reacción de PCR para secuenciación

La reacción de PCR para la secuenciación difiere de la reacción de PCR tradicional en que en este caso se preparan cuatro cockteles, todos con un

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de Mutaciones en el gen CFTR en la Población del Noreste de México

nucleótido distinto en cantidad insuficiente para llevar a cabo todas las reacciones cíclicas completas, y además este nucleótido se encuentra marcado fluorescentemente. Esto da como resultado productos de diferente longitud y que poseen todos el mismo nucleótido marcado para cada tubo (anexo 12).

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Frecuencias y Localización de las Mutaciones

El número total de pacientes incluidos en este estudio fue de 76, lo que equivale a 152 alelos (100%). Se obtuvieron 54 alelos X (35.50%) a los que no fue posible tipificarles la mutación. El resto, 98 alelos (64.50%) fueron positivos para alguna mutación. A continuación se muestran los resultados del primer tamizaje realizado con las sondas ASO para 27 mutaciones, así como su localización en el gen, su distribución en la proteína y el número y promedio de alelos encontrados.

Tabla 2: Resultados de Primer Tamizaje

Mutación	Exón	Localización de la mutación	Alelos	Porcentaje
Δ F508	10	PFN1	82	55.90%
G542X	11	PFN1	6	3.90%
S549N	11	PFN1	4	2.60%
3849+10kb C>T	19	PFN2	2	1.30%
621+1 G>T	4 (Intrón)	TM2	1	0.70%
Δ I507	10	PFN1	1	0.70%
N1303K	21	PFN2	1	0.70%
R1162X	19	PFN2	1	0.70%
X			54	35.50%
		TOTAL	152	100%

PFN1 (Pliegue Fijador de Nucleótido 1); PFN2 (Pliegue Fijador de Nucleótido 2); TM2 (Dominio Transmembranal 2). Es de utilidad ver la figura 2 de la Proteína CFTR.

El genotipo más frecuente fue el mutación conocida/mutación conocida, es decir, dos mutaciones conocidas (37, 48.68%), seguido por el genotipo mutación conocida/mutación desconocida, es decir, una mutación conocida y otra desconocida (24, 31.58%), y por último, el genotipo mutación desconocida/mutación desconocida, con dos mutaciones desconocidas (15,

19.74%). A continuación se presentará una tabla en la cual se podrán comparar los distintos genotipos obtenidos con los fenotipos observados y su frecuencia en la población en estudio.

Como actividad paralela, un estudio similar se realizó en pacientes colombianos, sus resultados se muestran en el anexo 13.

Tabla 3: Correlaciones Genotipo - Fenotipo

Genotipo	Fenotipo	Casos	%
$\Delta F508/\Delta F508$	PI - Pneumop. - CS	28	39
$\Delta F508/X$	PI - Pneumop. - CSaM	21	27.3
$\Delta F508/G542X$	PI - Pneumop.- CS	3	3.9
$\Delta F508/S549N$	PI- CM	1	1.3
$\Delta F508/3849+10kb C>T$	PS - CM	1	1.3
$S549N/S549N$	PI - Pneumop. M - CM*	1	1.3
$G542X/R1162X$	PI- Pneumop. M -	1	1.3
$\Delta I507/X$	PI	1	1.3
$N1303K/X$	PI - variable	1	1.3
$3849+10kb C>T/621+1 G>T$	PS - CM	1	1.3
$G542X/S549N$	PI - Pneumop. M	1	1.3
$G542X/X$	PI - Pneumop. M - variable	1	1.3
X/X	Muy variable	15	18.2
	TOTAL	76	100

PI (Pancreático Insuficiente); PS (Pancreático Suficiente); Pneumop. (Pneumopatía crónica); C (Cuadro Clínico) - S (Severo), M (Moderado), Variable

En el tamizaje por heterodímeros realizado a todas aquellas muestras que poseían al menos un alelo sin identificar, se encontraron 55 variantes, es decir, 55 alelos con patrón de corrimiento anómalo. La distribución de las variantes por exón se incluyen en la tabla 4.

Tabla 4: Número de Variantes obtenidas por Exón

Exón	Número de variantes
1a	7
2a	4
4a	1
5a	1
6a	2
6b	16
7a	4
10a	8
13b	1
17a	1
19a	1
21a	3
22a	5
23a	1
Total	55

En la tabla a continuación, se muestra el número de variantes en cada una de las muestras del estudio. En algunas muestras es posible observar una o hasta tres variantes.

Tabla 5: Número de Variantes obtenidas por Heterodimeros

Muestra	Variantes
2	3
3	1
7	2
8	3
21	2
27	3
28	3
29	2
31	2
32	2
33	2
34	1
37	3
38	1
39	1
40	1
41	1
43	1
44	1
45	1
51	2
53	1
54	2
56	1
57	1
58	2
59	3
60	2
61	1
64	1
68	1
70	1
73	1

Total: 33 Total: 55

Para confirmar los resultados obtenidos, antes de secuenciar se realizó un corrimiento de verificación para todos aquellos patrones anómalos observados. En esta ocasión solo fue posible confirmar 24 corrimientos candidatos a encontrar una posible mutación.

Tras la secuenciación de las variantes tan solo fue posible identificar una mutación (L206W) cuyo paciente - muestra 33 - posee el genotipo $\Delta F508/L206W$ y un polimorfismo (1540A/G) cuyo paciente - muestra 59 - posee el genotipo X/X.

4.2 Frecuencias y Localización de los Polimorfismos

También se tipificó la región polimórfica Tm (alelos 5T, 7T y 9T) del intrón 8. Los resultados obtenidos fueron comparados contra los de la mutación más común, $\Delta F508$, siendo los resultados son interesantes y descritos en la tabla 6.

Tabla 6: Distribución de Genotipos Tm

Intrón 8	N (%)	$\Delta F508$ (%)	No $\Delta F508$ (%)
7T/7T	34 (45.95)	3 (8.8)	31 (91.2)
7T/5T	3 (4.05)	1 (33.3)	2 (66.7)
7T/9T	21 (28.38)	18 (85.7)	3 (14.3)
9T/9T	15 (20.27)	14 (93.3)	1 (6.6)
9T/5T	1 (1.34)	1 (100)	
TOTAL	74 (100)		

En el 89.2% de las muestras en las cuales se encontró el alelo 9T, también se encontró la mutación $\Delta F508$. Para el homocigoto 9T la incidencia de $\Delta F508$ fue del 93.3%, para 9T/7T fue del 85.7% y para 9T/5T fue del 100%. Para el homocigoto 7T la incidencia de $\Delta F508$ fue del 8.8% y para el heterocigoto 7T/5T fue del 33.3%.

El genotipo 7T/7T se encontró en 34 pacientes (45.95%) y en 40 controles (80% de los controles cuya población total fue de 50). El genotipo 7T/5T se encontró en 3 pacientes (4.05%) y en 4 controles (8%). El genotipo 7T/9T se encontró en 21 pacientes (28.38%) y en 6 controles (12%). Los genotipos 9T/9T y 9T/5T se encontraron en 15 pacientes (20.27%) y en 1 paciente (1.35%), respectivamente, y no se encontró en ningún control. A continuación, la tabla 7 muestra estos resultados.

Tabla 7: Genotipos de pacientes Vs. controles (alelos Tm)

Genotipo	Pacientes	Controles
7T/7T	34 (45.95%)	40 (80%)
7T/5T	3 (4.05%)	4 (8%)
7T/9T	21 (28.38%)	6 (12%)
9T/9T	15 (20.27%)	
9T/5T	1 (1.35%)	
Total	74	50

Posteriormente se realizó un análisis de χ^2 para corroborar que el comportamiento observado distaba mucho del esperado, ya que era evidente que existía un desequilibrio entre el número de muestras que compartían las secuencias características de la mutación $\Delta F508$ y el polimorfismo 9T, contra cualquier otra de las posibles combinaciones. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: χ^2 de polimorfismos Tm

	9T	5T	7T	
$\Delta F508$	48 (22.22)	2 (1.78)	25 (40)	75
No $\Delta F508$	4 (24.31)	2 (1.94)	68 (43.75)	74
	52	4	93	149

Las cifras que se encuentran entre paréntesis corresponden al cálculo del valor esperado de χ^2 y los valores a la izquierda de los paréntesis son los obtenidos en el estudio. Setenta y cinco y Setenta y cuatro son el número de alelos $\Delta F508$ y No $\Delta F508$ respectivamente; de la misma manera, cincuenta y dos, cuatro y noventa y tres son el número de alelos 9T, 5T y 7T. Ciento cuarenta y nueve es el número total de alelos, la suma tanto de $\Delta F508$ y No $\Delta F508$, como de 9, 5 y 7T's. El resultado del cálculo de χ^2 fue de 62.29 con una $p < 0.001$, lo cual claramente indica que los datos no se encuentran en equilibrio o son altamente discordantes con lo esperado, cuando menos en lo que respecta a la frecuencia en que el alelo 9T se presenta junto con la mutación $\Delta F508$, presentándose este binomio reiteradamente.

4.3 ESTUDIOS FAMILIARES

Se realizó un estudio familiar en aquellas familias de la Asociación de Fibrosis Quística de Nuevo León que acudieron al laboratorio una vez que se le detectó alguna mutación al afectado. Dicho estudio consistió de una búsqueda de la(s) mutación(es) encontrada(s) en el paciente, en el resto de su familia. La información se proporcionó a la familia de manera confidencial para el uso que ellos desearan darle.

ANÁLISIS FAMILIARES PARA $\Delta F508$

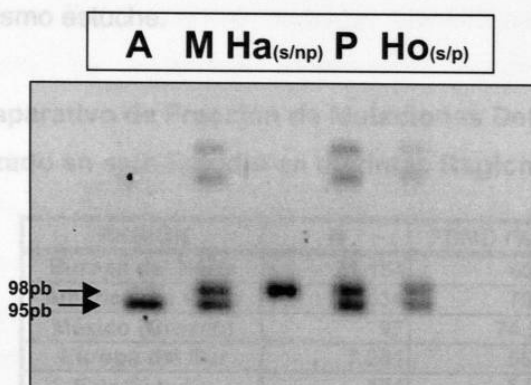


Figura 8. Análisis Familiares para $\Delta F508$. Se realizaron los análisis de detección de las mutaciones encontradas en cada paciente de este estudio a toda su familia (solo en aquellas familias que aceptaron). Esta figura muestra un análisis típico (para la detección de $\Delta F508$) realizado a una de las 9 familias que se tamizaron. Aquí es posible observar a los padres portadores de la mutación (M [madre], P [padre]) y a sus tres hijos, cada uno presentando un genotipo distinto (las tres posibilidades: A [afectado], Ho(s/p) [hermano sano portador] y Ho (s/np) [Hermano sano no portador]).

Para aquellas familias en las que se sabía existía una mutación diferente a $\Delta F508$, se hizo el análisis por hibridación de sondas oligo alelo específicas.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Fracción de Mutaciones Detectadas

La fracción de mutaciones detectada (FDMD) para este estudio fue de 64.5%. A continuación se muestra en la tabla 11 una comparación de la fracción de mutaciones detectadas por este estudio (con el estuche que incluye las 27 mutaciones más comunes en el mundo) y las mutaciones detectadas en otros países por este mismo estuche.

Tabla 11: Comparativo de Fracción de Mutaciones Detectadas por el estuche utilizado en este Estudio en distintas Regiones del Mundo

REGIÓN	N	FDMD (%)
Europa del Norte	21,154	80.2
América del Norte	10,434	79.9
México (Orozco)	97	74.58
Europa del Sur	7,281	66.7
Este Estudio	154	64.5
Brasil	520	59
Colombia	200	53.9
Venezuela	54	33.3

FDMD (Fracción de Mutaciones Detectadas)

N (Tamaño de la población dado en individuos estudiados)

La información listada en esta tabla está basada en datos obtenidos de distintos estudios y su propósito es comparativo; fue recabada de un metaanálisis realizado por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística. Es evidente que el estuche comercial no posee un poder de detección adecuado para aplicarse con certeza en el tamizaje de personas de etnicidad mexicana, a menos que se conozcan las mutaciones de sus padres y éstas se encuentren incluidas en el estuche. La fracción de mutaciones detectadas en este estudio es muy similar a la encontrada en la población de Europa del Sur (66.7%) y a la

de Brazil (59%). De antemano es bien conocido que estas tres poblaciones difieren en su composición genética, aunque el componente europeo de la población en México es principalmente Español.

En 1519 desembarcaron un poco más de 600 soldados castellanos al mando de Hernán Cortés cerca del actual puerto de Veracruz. De ese entonces, hasta la proclamación de independencia en 1821, México vivió un periodo de arribo de presuntos colonizadores o pobladores, como se les llamaba, que eran estimulados precisamente para ello. La mezcla entre españoles e indios es a todas luces evidente tanto en la cultura como en la fisionomía de la actual población mexicana. De la misma manera, genéticamente hablando, el mejicano del norte, se encuentra íntimamente ligado al Español. La particularidad de este periodo de conquista y colonización reside en el hecho de que a diferencia de otros países conquistadores, los Españoles destruyeron cultura y civilización e impusieron la suya, pero puede decirse que su conquista fue paternalista y se mezclaron con cierta libertad con los indígenas mexicanos. A pesar de que conquistadores y pobladores importaron esclavos negros (en su mayoría de ascendencia guineana, pero que habían pasado por España o las Antillas), esta no fue una práctica común y difundida, debido en parte al alto costo. Además, la población de este estudio (noreste del país) no posee un componente importante africano (aseveración basada en hechos históricos mas que en estudios genéticos).

De igual manera, el componente Europeo de la población Brasileña es Portugués y además poseen un componente africano importante, debido a que en Brasil entre los siglos 16 y 19 se comerció con africanos y se importaron entre 3.000.000 y 4.000.000 de africanos (bastante importante si se considera que el año de su descubrimiento - 1500 - la población indígena se estima era de 2.000.000). Brazil es un país en dónde la mezcla de razas está incrementando. La población indígena brasileña descendió entre los siglos 16 y 18 debido a que fueron perseguidos por los portugueses para esclavizarlos y las tribus fueron

diezmadas grandemente por el simple contacto con los "blancos", ya que no poseían inmunidad frente a enfermedades Europeas (como la influenza, paperas y viruela). Proceso similar al que ocurrió en nuestro país. También en Brasil la mezcla de razas fue mas aceptada que en la mayoría de los países conquistados por los Europeos, lo que contribuye grandemente a su complejidad genética. Por último, desde el siglo 19 han arribado a Brasil inmigrantes Europeos y Asiáticos buscando mejores oportunidades, aunque lógicamente el componente genético de estos pueblos no es importante en cantidad y si la tendencia se detiene (como parece ser el caso), muy probablemente este componente termine diluyéndose en el mar genético Brasileño.

Lo expuesto anteriormente sustenta que existe un componente genético que nos asemeja - población del noreste de México - con una fracción de la población del Sur de Europa - España -. Adelantándonos un poco a los siguientes análisis de resultados, tan sólo se mencionará que basados en los acontecimientos históricos, en la fracción de mutaciones no detectadas, y en un par de resultados obtenidos del análisis de incidencia de mutaciones, podemos llegar a la misma conclusión, aunque claro, establecer una relación de este tipo únicamente con los resultados de este estudios sería irresponsable y muy probablemente falaz debido a que éste no ha sido un estudio de genética de poblaciones, no fue estructurado de esa forma, ni ha sido el objetivo a perseguir. Únicamente se establece esta relación con el objeto de confirmar los resultados y aclarar que son concordantes con lo que podríamos encontrar si conocemos el fondo histórico. Esto, respalda los resultados y ayuda a su solidez y confianza.

5.2 Frecuencia de la Mutación $\Delta F508$

Como ya se comentó en la introducción, la mutación $\Delta F508$ es la mutación más común en el mundo y se presenta con una frecuencia relativa

mundial del 66%. A continuación se mostrará en la figura 8 una comparación de frecuencias de la mutación $\Delta F508$ en diversas poblaciones.

Fracción de la mutación $\Delta F508$ detectada en diversos estudios y en distintas Poblaciones

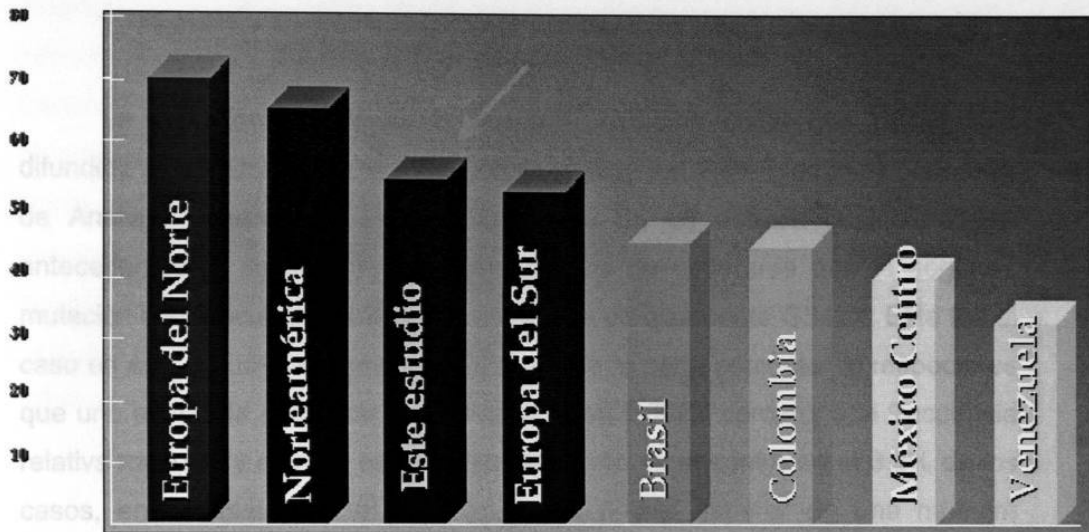


Figura 9. Fracción de la mutación $\Delta F508$ detectada en diversos estudios y en distintas poblaciones. En esta figura es posible observar como difiere la prevalencia de $\Delta F508$ en distintas poblaciones. Es evidente que existen grandes diferencias en la fracción de afectados portadores de esta mutación que van desde un 70% para el Norte de Europa hasta menos del 40% para el Venezuela.

Una vez más la evidencia obtenida de los resultados de este estudio nos indica que existe una importante similitud de la población del noreste de México con la de la población de Europa del Sur en la frecuencia relativa de la mutación más común en todo el mundo, la $\Delta F508$. En este estudio $\Delta F508$ se encontró en el 55.90% de los alelos, mientras que en el Sur de Europa se encuentra en el 55.03% de éstos alelos. Basado en los resultados publicados por el Consorcio de Análisis Genético de Fibrosis Quística de cuatro estudios españoles, es posible calcular que la frecuencia alélica de $\Delta F508$ en España es del 52.35%, lo que la coloca no muy lejos del resultado obtenido en nuestro estudio para la población del noreste de México. Evidentemente para relacionar los alelos

encontrados en México con los Españoles es necesario como mínimo conocer los haplotipos de ambas poblaciones, esto rebasa el objetivo del presente estudio, pero una vez más, no nulifica la argumentación, es concordante y abre la posibilidad de estudios posteriores sobre este tema, sobre todo al no poder identificar o diferenciar alelos nativos de alelos Españoles.

5.3 Frecuencia de la Mutación G542X

La mutación G542X es la segunda mutación en el gen CFTR más difundida en el mundo, con una frecuencia relativa del 2.4% (según el Consorcio de Análisis Genético de Fibrosis Quística). En un estudio cualquiera (sin antecedentes) y de tamaño representativo es de esperarse que la segunda mutación más frecuentemente encontrada sea precisamente G542X. Este fue el caso en este estudio, sin embargo, lo que vale la pena comentar al respecto es que uno esperaría encontrar una frecuencia en G542X cercana a la frecuencia relativa mundial, y esto no es así. Esta mutación se encontró en el 3.9% de los casos, en contraste con el 2.4% que uno podría esperar de una muestra representativa. La mutación G542X es una mutación que se encuentra con una prevalencia más o menos constante y que presenta una baja varianza entre poblaciones. La población estudiada que presenta la más alta prevalencia a escala mundial de esta mutación es la población española. Puede decirse que en la población del noreste de México esta mutación se encuentra en desequilibrio al manifestarse más común de lo esperado y, sin embargo, corrobora la gran influencia del "conquistador (¿probable fundador?)".

5.4 Frecuencia de la Mutación S549N

La mutación S549N es considerada una de las 27 mutaciones más comunes en el mundo, es decir, es lo suficientemente común como para ser incluida en el estuche comercial utilizado en el primer tamizaje de este estudio. Aún así, esta mutación presenta una frecuencia relativa de tan solo el 0.1% (de acuerdo a información del Consorcio de Análisis Genético de Fibrosis Quística,

el cual asigna este valor a toda aquella mutación que se encuentra con un 0.1% de frecuencia relativa o, en su defecto, con un valor menor). Esto es debido al gran número de mutaciones encontradas a la fecha (hasta el día de hoy, más de 900) y al gran desequilibrio que existe con una de ellas ($\Delta F508$). Esta es una mutación que se presenta con poca variación en el resto de las poblaciones estudiadas y no figura como altamente prevalente para ninguna. En el presente estudio se encontró a esta mutación en un claro desequilibrio con una frecuencia relativa del 2.6%. Esto es 26 veces más alto que lo esperado. Claro, el tamaño de la muestra (número de pacientes o alelos del estudio) es pequeño, sobre todo para medir variables poco comunes. Sin embargo, en términos generales pienso que es válido resaltar este desequilibrio por el interés que se genera cada vez que una mutación "extraña" se encuentra "comúnmente" en una población determinada. Desafortunadamente no fue posible conseguir la información genealógica de las familias portadoras de esta mutación.

5.5 Frecuencias de los Polimorfismos Tm

El análisis de la frecuencia de los polimorfismos Tm se realizó en un principio con la finalidad de computar más datos que de alguna manera pudieran servir para este estudio y para un estudio que se estaba realizando con pacientes con infertilidad masculina idiopática, pero sin saber que se iba a encontrar. Los resultados han sido interesantes, pues como se mencionó en el capítulo de resultados, en el 89.2% de las muestras en las cuales se encontró el alelo 9T también se encontró la mutación $\Delta F508$. No rescribiré aquí todos los resultados obtenidos en esta parte del estudio, solo mencionaré que el análisis de χ^2 indica (con una $p < 0.001$) que los datos no se encuentran en equilibrio. Es patente el hecho de que tanto la mutación ($\Delta F508$) como el polimorfismo (9T) se encuentran en los mismos pacientes, para establecer el ligamiento habría sido necesario realizar un estudio de ligamiento el cual no fue contemplado debido a lo inesperado de los resultados.

¿Por qué se encuentran el polimorfismo 9T y la mutación $\Delta F508$ en los mismos pacientes? Un gen se encuentra en un organismo debido a que fue heredado de alguno de sus progenitores y este es un proceso que puede seguirse hacia atrás en el tiempo en dónde seríamos testigos de pequeños cambios, pérdidas de genes, duplicaciones, importación de genes, etc. Todos estos procesos regidos por las interacciones de los genes con otros genes, de los genes con el organismo y el organismo con el ambiente. Todas estas interacciones a su vez originan los cambios a través de uno de dos mecanismos, la selección natural y la deriva genética. Estos cambios pueden favorecer al organismo, perjudicarlo o no afectarlo en lo más mínimo. El caso del polimorfismo 9T asociado a la mutación $\Delta F508$ en los pacientes de la población del noreste de México es probable que se deba a un efecto de fundador de hace, probablemente, un par de siglos. En lo personal, no creo que la mutación afecte la patología de los pacientes que la poseen en conjunción con $\Delta F508$, ya que por esta mutación se interrumpe el procesamiento celular de CFTR en el retículo endoplásmico y la proteína es destruida, por lo que nunca llega a la membrana plasmática. Esto explica la patología de la mutación que es distinta de digamos $3849+10kbC<T$, en dónde la síntesis de CFTR se ve reducida, pero esta llega hasta la membrana plasmática, aunque en cantidades pequeñas. En el último caso, una mayor afinidad por el sitio de procesamiento controlado por este polimorfismo indudablemente puede afectar su patología. Resumiendo, es muy probable que nos encontremos ante un efecto de fundador que no ha sido favorecido ni perjudicado por el ambiente, sino más bien ha perdurado por azar al no poseer, presumiblemente, efecto alguno sobre el desenvolvimiento natural de la enfermedad.

5.6 Correlación Genotipo - Fenotipo

En la tabla del capítulo de resultados en dónde se muestra la correlación entre Genotipo – Fenotipo, es posible observar la coherencia entre los genotipos determinados y los fenotipos esperados y observados. La

insuficiencia pancreática se observó en todos los genotipos excepto en $\Delta F508/3849+10kbC<T$ y en $3849+10kbC<T/621+1G<T$. Como ya se ha comentado en el gen CFTR con la mutación $3849+10kbC<T$, es posible la exportación de cantidades reducidas de la proteína y esto, podría explicar la razón de la suficiencia pancreática y lo moderado del cuadro clínico.

En el caso de los genotipos que contienen la mutación S549N es evidente que el cuadro clínico es moderado, con pocos problemas respiratorios y mayormente problemas digestivos. Puede decirse que son genotipos no severos. Sobre todo es importante el hecho de haber tenido la oportunidad de valorar al genotipo S549N/S549N (homocigoto para la mutación); pancreático insuficiente, neumopatía moderada y con un cuadro clínico moderado. Es importante puntualizar que en la manifestación del cuadro clínico también influyen el ambiente, las costumbres (como la alimentación), y algunas otras variables, incluso moleculares, como el efecto de otros loci sobre la expresión de la proteína, su plegamiento, etcétera. Por todo esto, hay que ser cuidadosos en la interpretación de cualquier resultado, sobre todo cuando nos basamos en un número tan reducido de casos (un homocigoto, en este caso).

5.7 La mutación L206W

La mutación L206W fue descrita por Claustres et al. en 1993 para la población del Sur de Francia. A escala proteica, consiste en la sustitución de una Leucina por un Triptofano en la posición aminoacídica 206, lo que en la proteína corresponde al primer dominio transmembranal. A nivel nucleotídico, consiste en la sustitución de una Timina (codón TTG) por una Guanina (codón TGG) en la posición 749, lo que la ubica en el exón 6a.

Es curioso el hecho de que esta mutación haya sido descrita en la población del Sur de Francia debido a que aparentemente un batallón de soldados franceses se estableció en Nuevo León tras perder su curso a finales

del siglo XIX (1864 - 1867) en la inestable y confusa época del presidente de la República Benito Juárez y el emperador (Archiduque austríaco) Fernando Maximiliano de Habsburgo. A pesar de que la paciente y sus padres son nacidos en Nuevo León, una vez más, no ha sido posible establecer la genealogía de esta familia y ligarla a un origen francés por falta de instrumentos adecuados para hacerlo. Por último, también es adecuado mencionar que los historiadores de Nuevo León no saben con certeza si la pérdida del batallón fue un hecho real a falta de pruebas históricas concluyentes.

5.8 El polimorfismo 1540A/G

El polimorfismo 1540A/G fue descrito por Kerem et al. en 1990 en la población de Jerusalén. Este polimorfismo tiene su origen en un cambio nucleotídico en la posición 1540 del ADNc de una A (adenina) por una G (guanina) o viceversa en la posición 470 de la proteína. Teóricamente, este cambio no debe presentar repercusiones en el fenotipo del individuo que lo porta, es por lo tanto indistinto el nucleótido que se encuentra en esta posición (siempre y cuando sea A o G). Esto es muy probablemente debido a que este cambio repercute en un cambio aminoacídico en la proteína CFTR en dónde una A en este codón traduce al aminoácido metionina, mientras que una G traduce al aminoácido valina y ambos son aminoácidos no polares. Esta última característica compartida puede ser la razón por la cual un cambio entre estos aminoácidos no se transforme en una función alterada por parte de la molécula proteica CFTR. Esto último es debido a que al mantener esta propiedad química la molécula protéica probablemente se pliegue igual, y suponiendo que no exista impedimento estérico ni interacciones moleculares de baja fuerza como enlaces dipolo-dipolo ni dipolo inducido, así como probables enlaces disulfuro ni puentes de hidrógeno, la molécula seguramente mantendrá íntegra su conformación tridimensional en el espacio. Esto claro, desechando las fuerzas de van der Waals y probables malos plegamientos por parte de las cheperonas que detecten el cambio. Lo expuesto anteriormente explica en parte la problemática de su conformación, pero también es importante para evaluar su

función que el cambio de radical aminoacídico seguramente no afecta (cuando menos de manera significativa) el poder de fijación en el primer pliegue fijador de nucleótidos (en dónde se localiza este cambio). De lo contrario, esta sustitución sería considerada mutación.

Existe también la posibilidad de que una combinación entre una mutación en un alelo y un polimorfismo en otro deriven en un cuadro clínico de fibrosis quística moderado o ligero. Este caso podría ser de este tipo, aunque esto no es evidencia suficiente para deducir y asegurar que este sea el caso en el paciente. Muchos alelos quedaron sin diagnosticar al eludir la técnica de heterodímeros tal y como se practicó en esta tesis, por lo tanto, no se tiene la seguridad para afirmar lo anteriormente expuesto.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Éste análisis nos ha permitido conocer mejor a nuestra población. Esto ha servido para establecer con certeza qué porcentaje de alelos pueden ser detectados por los estuches comerciales que contienen a las mutaciones utilizadas en el presente estudio. Es axiomático que los estuches comerciales por el momento disponibles no poseen un poder de detección adecuado para utilizarse en el tamizaje de pacientes del noreste de la República Mexicana. Lo más recomendable para este fin es conocer las mutaciones que afectan a una familia en particular para buscar selectivamente las mutaciones familiares. Realizar un tamizaje a la población general sin antecedentes previos con un estuche comercial actual es una práctica económicamente costosa y médicamente irresponsable, al no poder emitir un reporte contundente sobre el estado de salud del paciente. Lo que este estudio hace manifiesto (y que es corroborable por otros estudios en el pasado) es la necesidad imperiosa de contar con un estuche adecuado para nuestra población.

La comparación entre las mutaciones encontradas y sus frecuencias contra las de otras poblaciones nos permite corroborar propuestas anteriores. La perpetuación de los errores moleculares en el gen CFTR ha hecho posible establecer una importante similitud entre la población del noreste de México y la del Sur de Europa, principalmente con España. Los principales indicadores son la frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$ y G542X, así como la fracción de mutaciones detectadas por el estuche. Es innegable que estos resultados corroboran la existencia de un fuerte componente español e indígena.

El análisis de la frecuencia de la mutación S549N evidencia un claro desequilibrio en su presencia cuando se compara con lo esperado, de acuerdo a los resultados mundiales de frecuencia, siendo esta 26 veces más frecuente.

A pesar de no haber sometido a los alelos a un análisis de ligamiento es posible concluir que existe una fuerte asociación entre la mutación $\Delta F508$ y el polimorfismo 9T. Concluir que esto es debido a un efecto de fundador es un tanto aventurado, pero parece ser la explicación más viable por el momento.

El análisis de heterodímeros y la secuenciación buscando mutaciones en aquellos alelos pendientes de dilucidar nos ha permitido la identificación de una mutación no incluida en el estuche de 27 mutaciones. De este hecho se desprenden dos conclusiones: la primera, que es probable que exista un componente francés secundado por referencias históricas; y la segunda, que la técnica de heterodímeros tal y como se practicó en este estudio necesita pulirse debido a que se encontraron muchas variantes, pero pocas fueron confirmadas y más pocas aún demostraron ser variantes reales.

Existe la posibilidad que en el caso estudiado en el cual se encontró el polimorfismo 1540A/G, éste sea en parte responsable del cuadro clínico moderado que se presenta en el paciente, debido a que el genotipo encontrado fue $\Delta F508/X$, en dónde se sabe que la gran mayoría de pacientes con la mutación $\Delta F508$ presentan un cuadro severo de la enfermedad.

X. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

POR MEDIO DE LA PRESENTE HAGO CONSTAR QUE ESTOY INFORMADO (A) DE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO "DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO EN EL GEN DE LA FIBROSIS QUÍSTICA", POR LO CUAL ACCEDO DE MANERA VOLUNTARIA A CONTESTAR EL CUESTIONARIO QUE ME SERÁ HECHO Y A DONAR 5 ML DE SANGRE VENOSA.

ASÍMISMO, AUTORIZO A LAS PERSONAS QUE REALICEN ESTE PROYECTO A QUE UTILICEN LOS DATOS PROPORCIONADOS POR MÍ COMO LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE SE OBTENGAN DE MÍ, PARA REALIZAR LAS INVESTIGACIONES QUE CONSIDEREN NECESARIAS EN EL ENTENDIDO DE QUE TANTO LOS RESULTADOS COMO MI PERSONA SERÁN MANTENIDOS EN ABSOLUTA CONFIDENCIALIDAD.

Nombre y firma del participante: _____

Dirección:

Nombre y firma del testigo: _____

Dirección:

Investigador: _____

Extracción de ADN a partir de sangre periférica (Técnica Miniescala)

1. Colocar de 300 a 500 μ l de sangre periférica anticoagulada con EDTA en un tubo Eppendorf de 2 ml.
2. Añadir al paquete celular 200 μ l de buffer de lisis de TSNT y mezclar perfectamente por inversión por espacio de 1 minuto.
3. Agregar 500 μ l de fenol saturado y mezclar perfectamente por inversión mínimo 1 minuto.
4. Agregar 100 μ l de SEVAG y agitar en vortex por 5 minutos.
5. Añadir 200 μ l de TE 1X, mezclar por espacio de 1 minuto.
6. Centrifugar 8 minutos a 14,000 r.p.m., transferir la fase acuosa a otro tubo Eppendorf de 2 ml.
7. Precipitar el ADN agregando 1 ml de etanol al 100% y mezclar perfectamente por inversión hasta observar la precipitación en forma de una hebra blanca.
8. Centrifugar 8 minutos a 14,000 r.p.m. y decantar el sobrenadante teniendo cuidado de que no se desprenda la pastilla de ADN.
9. Agregar cuidadosamente de 500 a 1,000 μ l de etanol al 70% mezclar por inversión un par de veces, centrifugar 8 minutos a 14,000 r.p.m. y decantar. Secar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Resuspender en 20 a 30 μ l de TE 1X y almacenar a 4°C para posteriormente determinar la concentración.

Extracción de ADN Genómico de Células Sanguíneas Técnica TSNT

1. Colocar 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA en un tubo Falcon de 50 ml, centrifugar por 4 minutos a 2,000 r.p.m. para separar el paquete celular. Recuperar con micropipeta el plasma y descartarlo.
2. Añadir al paquete celular 2 ml de buffer de lisis de TSNT (2% tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM tris-HCl pH=8, 1mM EDTA disódico). Mezclar por inversión durante 1 minuto.
3. Agregar 5 ml de fenol saturado pH=8. Mezclar.
4. Agregar 1 ml de SEVAG. Agitar en el vortex hasta homogenizar completamente (entre 3 y 5 minutos).
5. Añadir 2 ml de TE 1X pH=8.
6. Centrifugar 20 minutos a 10,000 r.p.m.. Transferir la fase acuosa a un tubo Falcon de 15 ml. Si después de centrifugar una vez la fase acuosa está muy turbia es necesario centrifugar nuevamente todo 10 minutos a 10,000 r.p.m..
7. Precipitar el ADN agregando 2 volúmenes de etanol al 100%. Mezclar lentamente por inversión hasta observar la precipitación de ADN en forma de una hebra blanca.
8. Centrifugar 5 minutos a 10,000 r.p.m.. Decantar el sobrenadante teniendo cuidado de que no se desprenda la pastilla de ADN.
9. Añadir 1 ml de etanol al 70%, mezclar y transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
10. Centrifugar 3 minutos a 14,000 r.p.m., decantar y secar.

Resuspender en TE 1X pH=8, el volumen dependerá del tamaño de la pastilla, aproximadamente 200 μ l.

Verificación de la Extracción

La verificación de la extracción de ácidos nucleicos se realiza por el método de electroforesis.

Método (Etiquetar y Correr en Gel de Agarosa):

1. Rotular los tubos Ependorff de 1.5 ml necesarios de acuerdo al número de muestras y de diluciones a realizar.
2. Hacer diluciones en los tubos correspondientes de acuerdo a la viscosidad observada en la muestra concentrada (pueden hacerse diluciones 1:2, 1:5 ó 1:10 para muestras diluidas, o para muestras concentradas de 1:20 a 1:50, por ejemplo). Las diluciones se hacen con buffer TE 1X de preferencia, aunque también es posible hacerlo con agua destilada, aunque no es lo más recomendable.
3. Mezclar muy bien estas diluciones por 24 horas antes de cargarlas en el gel.
4. Pesar la cantidad necesaria para preparar 50 ml de agarosa al 1%, colocarla en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y agregar 50 ml de buffer TBE. Calentar a ebullición en una plancha de calentamiento hasta disolver la agarosa y dejar enfriar hasta aproximadamente 50 °C.
5. Armar el molde para preparar el gel colocando los dos extremos laterales, asegurándolos con los tornillos y sellando la parte inferior con cinta masking. Colocar el peine en las ranuras correspondientes en el molde.
6. Vaciar la agarosa en el molde y dejar gelificar.
7. Desmontar los extremos del molde y colocarlo en la cámara de electroforesis. Agregar 200 ml de buffer TBE. Sacar con cuidado el peine del gel de manera que queden formadas las casillas en el gel sin perforaciones. El buffer deberá cubrir completamente el gel.
8. Depositar en los pocillos las muestras bien mezcladas en el gel siguiendo un orden previamente establecido.
9. Conectar correctamente los cables de la cámara a la fuente de poder. El cable que se encuentra en el lado donde se aplicaron las muestras

conectarlo al polo negativo (cátodo/color negro) y cable del otro extremo, hacia donde migrarán las muestras conectarlo al polo positivo (anodo/color rojo).

10. Finalmente, encender la fuente de poder y ajustarla a un voltaje no mayor a 60 volts, por 20 minutos (mientras entra la muestra al gel), posteriormente aumentar el voltaje a 100 hasta que termine el corrimiento.

Método (Tinción con Bromuro de Etidio):

1. Se debe disolver una pastilla de Bromuro de Etidio en TE (Tris - EDTA) de manera que alcance la concentración final de trabajo (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Es importante utilizar guantes en todo momento por el peligro mutagénico y tóxico en el manejo del Bromuro de Etidio.
2. Una vez hechos los cálculos y la dilución, mezclar muy bien la solución y finalmente sumergir el gel de agarosa por un tiempo aproximado de 5 minutos.

Reacción de PCR para la detección de $\Delta F508$

Las concentraciones finales en la reacción de PCR para la detección de la mutación $\Delta F508$ son las siguientes:

ADN	200 ng
Buffer Taq 10X	1X
Oligo F 5 μ M	1 μ M
Oligo R 5 μ M	1 μ M
dNTPs 10 mM	0.2 mM
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
H ₂ O	
Taq 5 U/ μ l	0.05 U/l

Es recomendable que el volumen final de reacción sea de 30 μ l para cargar el gel de agarosa para verificar la amplificación con 4 ó 5 μ l de producto amplificado y posteriormente se puedan tomar 12 μ l para cargar el gel de acrilamida y queden cuando menos otros 12 μ l de producto amplificado para repetir en caso de que sea necesario sin tener que volver a hacer la reacción.

Antes de trabajar el gel de acrilamida, se debe verificar la amplificación en un gel de agarosa al 2%, corriendo inicialmente las muestras a no más de 60 volts por un periodo no menor a 5 minutos y posteriormente se puede aumentar la corriente hasta 100 volts.

El siguiente es el Programa a echar a andar en el Termociclador para este ensayo:

STEP1	2 minutos a 94 °C
STEP2	30 segundos a 94 °C

STEP3 30 segundos a 60 °C
STEP4 30 segundos a 72 °C
STEP5 Ir al paso número 2 30 ciclos.
STEP6 7 minutos a 72 °C
STEP7 END

Al finalizar este programa es recomendable que se trabaje con el producto amplificado de inmediato, de no ser posible, se deberá guardar en refrigerador si se trabajará al día siguiente o en congelador si se trabajará en un par de días.

Electroforesis en el gel de Poliacrilamida para la detección de $\Delta F508$

La detección de la mutación $\Delta F508$ en el producto amplificado de su reacción de PCR se realiza por medio de la electroforesis del mismo.

Preparación del gel de poliacrilamida al 12%:

1. Lave los vidrios con agua y jabón, luego con agua desionizada y finalmente límpielos con alcohol.
2. Ensamble el molde, colocando los separadores en los lados a menra de sandwich y aprisione los bordes firmemente con dos clamp grandes a cada lado.
3. En un aplaca de viedrio, forme una línea de agarosa caliente e inmediatamente coloque el molde descansando sobre esta línea, de tal modo que se sellará el borde inferior. Posteriormente, agregue agarosa caliente en los bordes externos del molde para sellar los lados.
4. Tenga a la mano el peine para colocarlo inmediatamente después de la preparación de la mezcla de poliacrilamida.
5. Prepare las siguientes mezclas en un vaso de precipitado lo más pequeño posible, según el caso:

Agua destilada	5.0 ml
TBE 10X	1.0 ml
Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) 30%	4.0 ml
Persulfato de amonio 10%	300 μ l
TEMED	30 μ l

Agite rápidamente y vacíe la mezcla en el molde hasta el borde superior.

6. Coloque el peine rápidamente, sin dejar burbujas en su porción inferior. Para esto, coloque todos los dientes del peine en contacto con la superficie de la mezcla.
7. Deje gelificar la mezcla por lo menos unos 20 minutos. Posteriormente retire cuidadosamente el peine y lave los pozos y el borde superior del molde con solución TBE 1X para eliminar residuos de gel.

Para realizar el análisis de la mutación, mezcle manualmente 12 μ l de cada tubo de reacción con 4 μ l de jugo azul 6X en un tubo de 0.5 ml, centrifugue las muestras y deposite todo el contenido de cada uno de ellos en los pozos del gel vertical de poliacrilamida al 12% (20 cm x 20 cm x 1.5 mm). Realice la electroforesis a 100 v hasta que la banda del xilencianol haya migrado 7 cm (aproximadamente 8 horas). Finalmente, desprenda cuidadosamente el gel de las placas de vidrio y tñfalo en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ μ l) durante 1 minuto para luego observar las bandas en el transiluminador o el equipo de fotodocumentación con luz ultravioleta y detectar los alelos sanos y mutantes y realizar los diagnósticos de afectado, portador o sano.

Reacción de PCR para el Kit de 30 mutaciones de ROCHE

Las concentraciones finales en la reacción de PCR para el Kit de detección de mutaciones de ROCHE son las siguientes:

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl pH 8.3
0.3 mM de dATP, dCTP, y dGTP
0.6 mM dUTP
1X Primer Mix (0.12 mM de cada primer)
15 unidades de Ampli Taq ADN polimerasa
3 unidades de Amp Erase Uracil-N-Glicosilasa
Agua MiliQ

Los volúmenes de reacción para montar en el tubo para depositar en el termociclador son los siguientes.

	100µl de Rx.	50µl de Rx.
ADN (10-100ng)	1µl	1µl
Buffer 10X	10µl	5.0µl
3dNTP's/dUTP 1:2	3µl	1.5µl
10X Primer Mix CF30	10µl	5.0µl
Taq pol 5 U/µl	3µl	1.5µl
Amp Erase 1U/µl	3µl	1.5µl
MgCl ₂ 25mM	32µl	16µl
Agua MiliQ	38µl	18.5µl

El siguiente es el Programa a echar a andar en el Termociclador para este ensayo:

STEP1	10 minutos a 42°C	
STEP2	1 minuto a 93°C	
STEP3	30 segundos a 93°C	Repetir este paso a 32 ciclos.
	30 segundos a 60°C	
	1 minuto a 72°C	
STEP6	15 minutos a 72°C	

En cuanto se termina este programa es necesario adicionarle a cada 100µl de reacción 100µl de solución desnaturizante.

Preparación de reactivos para hibridación de Kit de 30 mutaciones

- Buffer SSPE 20X (3.6 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂EDTA, pH= 7.4) 250 ml.
 1. Disolver 1.86 g de EDTA disódico dihidratado (Na₂EDTA·2H₂O) en 200 ml de H₂O destilada.
 2. Ajustar el pH a 6.0 ± 0.2 con NaOH 10 N.
 3. Agregar 52.5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 6.9 g de fosfato de sodio monobásico-monohidratado (NaH₂PO₄· H₂O).
 4. Mezclar hasta disolver completamente (30 - 60 minutos). De ser necesario calentar levemente (aprox. 37 °C) para la disolución de sólidos.
 5. A temperatura ambiente, ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 con NaOH 10 N.
 6. Ajustar el volumen final a 250 ml utilizando agua destilada y mezclar fuertemente.
 7. Autoclavear o filtrar a través de un filtro de polietersulfona con tamaño de poro estandarizado de 0.2 µm.

- SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 20% (w/v) 62.5 ml.
 1. Lentamente adicionar 12.4 g de SDS grado electroforesis (ultra puro) a 50 ml de agua destilada. De ser necesario, calentar levemente (aprox. 37 °C) para la disolución de sólidos.
 2. Ajustar el volumen final a 62.5 ml utilizando agua destilada y mezclar fuertemente.
 3. Autoclavear o filtrar a través de un filtro de polietersulfona con tamaño de poro estandarizado de 0.2 µm.

- Buffer de Citratos (0.1 M Citrato de Sodio, pH=5.0) 250 ml
 1. Disolver 4.6 de citrato trisódico dihidratado (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) en 200 ml de agua destilada.

2. Ajustar el pH a 5.0 ± 0.2 por adición de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$).
3. Ajustar el volumen final a 250 ml utilizando agua destilada y mezclar fuertemente.
4. Autoclavear o filtrar a través de un filtro de polietersulfona con tamaño de poro estandarizado de $0.2 \mu m$.

Ensayo de Detección

1. Preparación de Buffer

Calentar el concentrado SSPE y el concentrado SDS en un baño tibio de agua a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que todos los sólidos precipitados se encuentren en solución. (Notar que el SSPE que provee el kit no tiene la misma formulación que el que se encuentra en el Maniatis).

Preparar las siguientes soluciones de trabajo:

Buffer de Lavado e Hibridación (3X SSPE, 0.5% SDS) (1.000 ml)

Mezclar en el siguiente orden: 150 ml de buffer SSPE 20X, 825 ml de H₂O destilada y 25 ml de SDS al 20%. Mezclar bien. Para lograr la disolución, calentar hasta $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Vaciar hasta un volumen ajustado que dispense hasta 5 ml. Fecha y almacena a temperatura ambiente. El buffer de hibridación preparado puede ser almacenado a temperatura ambiente por 3 meses.

Buffer de Citratos (1.000 ml)

Vaciar el buffer de citratos estéril en un dispensador de volumen que dispense 5 ml. Fecha y almacena a temperatura ambiente. El buffer de citratos preparado puede ser almacenado a temperatura ambiente por 3 meses.

2. Detección

- a. Calienta el buffer de hibridación y de lavado a 37 °C en baño María. **TODOS LOS SÓLIDOS PRECIPITADOS DEBEN SER DISUELTOS.**
- b. El resto de los reactivos se deben atemperar en el ambiente.
- c. Calienta un baño con movimiento a 50 °C y ajusta el nivel del agua de 1/4 a 1/2 de pulgada por encima de la plataforma de mezclado. Revisa la posición del traste de manera que el agua no salpique dentro de los canales del traste a una velocidad de 60 rpm.
- d. Utilizando unos forceps limpios, remover el número apropiado de tiras de tipificación de Fibrosis Quística y marcarlas con una pluma con tinta resistente al agua. Colocar una sola tira viendo hacia arriba en cada canal del traste de tipificación.
- e. Adiciona 5 ml de buffer de hibridación y lavado a cada canal.
- f. Utilizando un micropipeteador con puntilla desechable, pipetear 70 µl de muestra amplificada y desnaturalizada en el canal apropiado. Mezclar con un movimiento suave horizontal de ida y vuelta con cada nueva adición de muestra. Repetir este procedimiento para cada muestra utilizando una nueva puntilla en cada vez.
- g. Coloca la tapa sobre el traste y ponlo en el baño mezclador a 50 °C con un peso adicional de 0.5 kg en la superficie para prevenir que el traste resbale o flote. Incuba por 20 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- h. Prepara el Conjugado Enzimático. Justo antes de utilizarse, mezcla 5 ml de buffer de hibridación y de lavado y 20 µl de SA-HRP por tira. Mezcla gentilmente en movimiento horizontal. Mantén a temperatura ambiente. No lo prepares con más de 15 minutos de anticipación. (Ejemplo: para 8 tiras mezcla 40 ml del buffer de lavado y 160 µl de SA-HRP).
- i. Retira el traste del baño de agua, colócalo en un ángulo que te permita aspirar el contenido líquido. Cuidadosamente seca el canal con papel absorbente.
- j. Dispensa 5 ml de buffer de hibridación y de lavado en cada canal. Mezcla en movimiento horizontal por varios segundos y aspira la solución.

- k. Adiciona 5 ml del conjugado enzimático a cada canal. Coloca la tapa del traste y el traste en el baño con movimiento a 50 °C con un peso de 0.5 kg en la superficie para prevenir que el traste se resbale o flote. Incuba por 20 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- l. Retira el traste del baño de agua, colócalo en un ángulo que te permita aspirar el contenido líquido. Cuidadosamente seca el canal con papel absorbente.
- m. Dispensa 5 ml del buffer de hibridación y de lavado en cada canal. Coloca la tapa del traste y el traste en el baño con movimiento a 50 °C con un peso de 0.5 kg en la superficie para prevenir que el traste se resbale o flote. Incuba por 10 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- n. Retira el traste del baño de agua, colócalo en un ángulo que te permita aspirar el contenido líquido. Cuidadosamente seca el canal con papel absorbente. Adiciona 5 ml de buffer de citratos a cada canal. Limpia el traste con papel absorbente. Cubre el traste y colócalo en un mezclador orbital a temperatura ambiente y protegido de la luz por 10 minutos a 60 rpm.
- o. Prepara la solución de trabajo. Justo antes de utilizarla, mezcla 5 ml de buffer de citratos, 5 µl de peróxido de hidrógeno al 3% y 0.25 ml (250 µl) de solución TMB por tira. Mezclar gentilmente en movimiento horizontal. Mantener a temperatura ambiente y protegido de la luz. No lo prepares mas de 15 minutos antes de su uso.
- p. Retira el traste del baño de agua, colócalo en un ángulo que te permita aspirar el contenido líquido. Cuidadosamente seca el canal con papel absorbente. Adiciona 5 ml de la solución de trabajo a cada canal. Limpia el traste con papel absorbente. Cubre el traste y colócalo en un mezclador orbital a temperatura ambiente y protegido de la luz por 10 a 20 minutos a 60 rpm.
- q. Retira el traste del baño de agua, colócalo en un ángulo que te permita aspirar el contenido líquido. Adiciona 5 ml de agua destilada a cada canal. Limpia el traste con papel absorbente. Mezclar gentilmente con movimiento horizontal, desechar el agua.

- r. Adicionar 5 ml de agua destilada o desionizada a cada canal. Cubre el traste y colocalo en el mezclador orbital a temperatura ambiente por 5 minutos a una velocidad de 60 rpm.**
- s. Interpreta las tiras en el fondo especial del kit de fibrosis quística. Fotografía las tiras húmedas para tener un récord permanente.**

Secuencias de los Iniciadores diseñados para este estudio

	Secuencias	Tmp	Longitud	Tmf	Temp apareamiento
Promotor	GCCGCTAGAGCAAATGGG	60	198pb	80.9298	62.3609
	GCCAAAGACCTACTACTCTGGGTGC				
Ex1	CCTAGCAGGGACCCAGCG	60	115pb	76.1323	59.7826
	CTTCCGAAGCTCGGTTGGC				
Ex2	GAATATCTGTTCCCTCTCTTTAT	51	182pb	72.3481	53.3837
	GAATTTCTCTCTTCAACTAAACAAT				
Ex3	CAACTTATTGGTCCGACTTTTT	51	174pb	70.5376	52.6863
	CATAATGAATGTACAATGAGATCC				
Ex4	GAAATTTAATTTCTCTGTTTTCC	53	300pb	75.6929	56.5050
	TACGATACAGAAATATGTGCCATG				
Ex5	GTTGAAATTATCTAECTTTCCATTTTT	50	163pb	69.6608	52.0126
	CAATAGTGCCTAAAAGATTAATCAAT				
Ex6a	CAATGACACCTGTJTITGCTG	53	257pb	76.3617	57.4832
	GGGCTTTTTGAAAACATAATTTTTA				
Ex6b	GAGCAGTCTTAATAGATAATTTGACT	51	252pb	70.3853	51.8597
	AAATTAAGGACAGAACTACTAACAATATT				
Ex7	ACATCCYGAATTTTATTGTTATTGTT	53	317pb	75.2396	55.9477
	TCATAGTATATAATGCAGCATTATGGT				
Ex8	GCTATTCTGATTCTATAATATGTTTTGC	51	187pb	69.2493	51.9945
	GAAAACAGTTAGGTGTTTAGAGCAA				
Ex9	CTATTGAAAATATCTGACAACTCAT	59.3	309pb	72.6424	53.7397
	GACATGGACACCAAATTAAGTT				
Ex10	TTGATAATGACCTAATAATGATGGGT	62.1	282pb	71.9823	54.1176
	AGTGTGAAGGGTTCATATGCA				
Ex11	GAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTT	60.9	185pb	71.5063	53.4244
	CATTTACAGCAAATGCTTGC				
Ex12	GATGACCAGGAAATAGAGAGGA	61.1	208pb	67.1537	50.4376
	GATGGGACAGTCTGTCTTCTT				
Ex13.1	GATTATATATCTTAAAGCTGTGTC	62	255pb	71.2368	53.5658
	CGTGAAGGTCTCAGTTAGG				
Ex13.2	CCAATTTAGTCCAGAAAGAAG	60	261pb	72.9787	54.1851
	GGACAGCCTACTCTCTAAAG				
Ex13.3	GAAGAGGATTCTGATGAGCC	60	212pb	78.4079	57.9856
	CACTTTTCGTGTGGATGCTG				
Ex13.4	CAGAACATTACCGAAAGAC	58	194pb	73.4795	53.9357
	GCATTCTGTGGGGTGAATA				
Ex14a	TGAAACTGTACTGTCTTATTG	56	204pb	71.4361	51.9053
	TAATACTTTACAATAGAACATTG				
Ex14b	GGGAGGAATAGGTGAAGATG	60	185pb	71.5473	53.1831
	GATTACAATACATACAACATAG				
Ex15	ACGATTTCTTATTGCTTTAC	56	307pb	74.5142	54.0599
	GCAGTTTCATTTCTTAGACC				
Ex16	GTCATCTTGATATTATAGG	52	121pb	70.0274	49.7192
	CGGTACTTATTTTACATAC				
Ex17a	CAATGTGAAAATGTTTACTC	56	267pb	72.9138	52.9397
	AATAAAGAATCTCAAATAGC				
Ex17b	ATTTGTGTTTTATGTTATTTGC	56	293pb	73.7531	53.5272
	TGAGTTCATAGTACCTGTTG				
Ex18	TCACAGAAGAGAGAATAAC	54	216pb	71.7019	51.4913
	CATACTTTGTTACTTGTCTG				
Ex19	AATGTTGTTATTTTATTTACG	56	297pb	75.4652	54.7256
	AAGCAAGCAGTGTCAAATC				
Ex20	CCATCACTTTACCTTATAG	54	248pb	74.3191	53.3234
	GTACAAGTATCAAATAGCAG				
Ex21	AGTTATTCATACTTTCTTCTTC	60	149pb	68.0007	50.7005
	TCAGTTAGCAGCCTTACCTC				
Ex22	CTCCTGTGTTATTTTGAATG	60	304pb	76.3785	56.5650
	TGATTTCTGTTCCCACTGTGC				
Ex23	TATGTGTGGTATTTCTTTC	56	180pb	69.9289	50.8502
	ATTACAAGGGCAATGAGATC				

Procedimiento para la realización de SSCP's

Reactivos:

Solución STOP. 95% formamida, 20 mM Na₂EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xilencianol.

Buffer 10X. Tris-HCl pH = 8.3 0.5 M, MgCl₂ 0.1 M y ditioneitol 50 mM.

Gel de poliacrilamida al 5%. 40% Acrilamida/Bis-acrilamida 75:1 (1.3%C): 39.5 g de acrilamida + 0.53 g de bis-acrilamida + 100 ml de agua destilada.

62.5 ml 40% Acrilamida/Bis-acrilamida 75:1 (1.3%C) + 25 ml TBE 10X + 3.000 µl Persulfato de amonio + 300 µl TEMED + 409.2 ml de agua destilada = 500 ml Poliacrilamida al 5%.

Protocolo:

1. Se debe montar inicialmente la reacción de PCR de interés. Posteriormente se deja un paso final de calentamiento a 94 °C por 5 minutos. Al finalizar es importante adicionar de inmediato 25 µl de la solución STOP (colorante - formamida) e introducirlas rápidamente en hielo, agitar suavemente por 30 segundos antes de cargarlos en el gel de poliacrilamida.
2. Ensamblar los vidrios para el gel.
3. Mezclar las siguientes soluciones en un tubo Falcon de 50 ml. Los volúmenes están calculados para un gel de 0.03 x 30 x 40 cm. Los volúmenes pueden cambiarse siempre y cuando se respeten las proporciones de acuerdo a las dimensiones de los vidrios.
4. Adicionar 45µl de TEMED, mezclar e inmediatamente transferir al ensamblado vítreo. Mantener el ensamblado horizontal, insertar el lado plano de una dentadura tipo tiburón hasta una profundidad aproximada de 5 mm y dejar polimerizando por cuando menos 2 horas.
5. Remueve la dentadura, coloca el ensamblado en el equipo de electroforesis (preferentemente incluye una placa de aluminio a la pared anterior del

Procedimiento para la realización de Heterodímeros

Reactivos:

Solución STOP. 95% formamida, 20 mM Na₂EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xilencianol.

Buffer 10X. Tris-HCl pH = 8.3 0.5 M, MgCl₂ 0.1 M y ditiotreitól 50 mM.

Gel de poliacrilamida al 5%. 40% Acrilamida/Bis-acrilamida 75:1 (1.3%C): 39.5 g de acrilamida + 0.53 g de bis-acrilamida + 100 ml de agua destilada.

62.5 ml 40% Acrilamida/Bis-acrilamida 75:1 (1.3%C) + 25 ml TBE 10X + 3.000 µl Persulfato de amonio + 300 µl TEMED + 409.2 ml de agua destilada = 500 ml Poliacrilamida al 5%.

Protocolo:

1. Se debe montar inicialmente la reacción de PCR de interés. Posteriormente se deja un paso final de calentamiento a 94 °C por 5 minutos. Al finalizar es importante dejar reposar a temperatura ambiente por 20 a 30 minutos y posteriormente adicionar 25 µl de la solución STOP (colorante - formamida), agitar suavemente por 30 segundos antes de cargarlos en el gel de poliacrilamida.
2. Ensamblar los vidrios para el gel.
3. Mezclar las siguientes soluciones en un tubo Falcon de 50 ml. Los volúmenes están calculados para un gel de 0.03 x 30 x 40 cm. Los volúmenes pueden cambiarse siempre y cuando se respeten las proporciones de acuerdo a las dimensiones de los vidrios.
4. Adicionar 45µl de TEMED, mezclar e inmediatamente transferir al ensamblado vítreo. Mantener el ensamblado horizontal, insertar el lado plano de una dentadura tipo tiburón hasta una profundidad aproximada de 5 mm y dejar polimerizando por cuando menos 2 horas.

5. Remueve la dentadura, coloca el ensamblado en el equipo de electroforesis (preferentemente incluye una placa de aluminio a la pared anterior del ensamblado de vidrio como sistema de transferencia de calor), llene el reservorio con TBE 0.5X, y enjuaga la parte superior de la superficie del gel con el buffer utilizando una pipeta Pasteur. Inserta la dentadura dientes abajo.
6. Calienta los productos de PCR en el colorante - formamida a 80 °C por 5 minutos y carga el gel (1µl por 5 mm de carril). El aceite mineral (de estarlo usando) debe ser eliminado. El enfriamiento de las muestras tras el calentamiento no es recomendado, ya que puede propiciar la asociación de iniciadores restantes y de ADN sencillo y esto puede traer complicaciones en el electroforetograma final de los heterodímeros.
7. Comienza la electroforesis a 40 W. También comienza el enfriamiento con abanicos, trabajando en un cuarto frío o de algún otro modo. El tiempo requerido para la electroforesis depende de la longitud y de la secuencia del fragmento. Los tiempos sugeridos para un primer intento son: 1 hora para fragmentos de 150 pares de bases cuando el azul de bromofenol llega a 5 cm de la parte baja del gel y 2 horas para fragmentos de 4.000 pares de bases cuando el xilencianol llega a 5 cm de la parte baja del gel sin glicerol, corriendo a temperatura ambiente. La adición del glicerol detiene la movilidad de 1.5 a 2 veces. La electroforesis a temperaturas bajas también requiere de tiempos de corrida mayores.
8. Corta el gel a la mitad trabajando con la mitad en donde esperas las bandas, esto te permite un fácil manejo del gel (si no sabes dónde esperar las bandas, tendrás que experimentar mientras estandarizas).
9. Transferir el gel al recipiente de bromuro de etidio para su tinción. Dejar tiñendo 10 minutos para una concentración de bromuro de etidio de 2 mg/ml.
10. Fotodocumentar las bandas lo más pronto posible pues la tinción pierde intensidad al exponerse a la radiación ultravioleta además que una tinción prolongada y en general con el tiempo, se difuminan las muestras en el gel y se pierde precisión y sensibilidad.

Purificación de Productos Amplificados (para secuenciación) - Método Enzimático -

Método:

1. Tomar una alícuota del producto amplificado que se desea purificar (preferentemente la alícuota deberá ser no mayor a 10 µl ya que de ser así se tendrán que duplicar los volúmenes de enzimas siguientes) y verter en un tubo de PCR aparte.
2. A la alícuota adicionarle 1µl de "Exonucleasa 1" y 1 µl de "Fosfatasa Alcalina" (por cada 10 µl de producto amplificado).
3. Colocar los tubos de PCR de las muestras a purificar con las enzimas en el termociclador y someterlas al siguiente programa:

STEP 1	30'	37 °C
STEP 2	30'	80 °C
STEP 3	END	

4. Una vez finalizado este programa, el producto amplificado se encuentra purificado y puede ser utilizado para la reacción de secuenciación inmediatamente, de lo contrario, congelar a -20 °C (sin exceder dos semanas de congelación).
5. Si se desea guardar los productos purificados hacerlo en una gradilla especial para ello.

Secuenciación

Reacción:

Las concentraciones finales en la reacción de PCR para secuenciación son las siguientes:

ADN	200 ng
Buffer Taq 10X	1X
Oligo F 5 μ M	1 μ M
Oligo R 5 μ M	1 μ M
dNTPs 10 mM	0.2 mM
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
H ₂ O	
Taq 5 U/ μ l	0.05 U/l

El volumen final de la reacción es de 7.4 μ l.

El siguiente es el Programa a echar a andar en el Termociclador para este ensayo:

STEP1	3 minutos a 94 °C
STEP2	30 segundos a 94 °C
STEP3	30 segundos a 2 °C más que la Temperatura de apareamiento estandarizada.
STEP4	45 segundos a 72 °C
STEP5	Ir al paso número 2 35 ciclos.
STEP6	5 minutos a 72 °C
STEP7	END

Al finalizar este programa es recomendable que se trabaje con el producto amplificado de inmediato, de no ser posible, se deberá guardar en refrigerador si se trabajará al día siguiente o en congelador si se trabajará en un par de días.

Precipitación:

1. Para precipitar el ADN a secuenciar es necesario adicionarle al tubo de reacción de PCR (producto de la muestra), 1 μ l de "Vivid Violet coprecipitador de ADN/ARN", 1 μ l de Acetato de Sodio 3 M pH = 5.4 y 2.5 volúmenes de Etanol al 100%. Dejar precipitando a temperatura ambiente durante 30 minutos protegido de la luz.
2. Una vez terminado este tiempo, centrifugar durante 30 minutos a 14.000 r.p.m.
3. Decantar el sobrenadante y depositar 100 μ l de etanol al 70% (lavado) y centrifugar durante 30 minutos a 14.000 r.p.m.
4. Decantar el sobrenadante.
5. Secar la pastilla en un secador automático por un lapso de 10 minutos.
6. Una vez terminado esto, depositar 3 μ l de solución STOP (marca Li-cor - IR² STOP solution -) para resuspender la pastilla.
7. Tomar 1.5 μ l de esta solución y depositar en el gel de secuenciación.

Gel de secuenciación:

1. Se utilizan vidrios templados de 44 cm de largo con separadores de 0.2 mm, el peine es de 0.2 mm con 48 dientes rectangulares. En la zona del peine es necesario rociar un fijador (binxilano al 5% en mezcla con etanol y ácido acético).
2. El gel se prepara con una concentración de 4.5% de acrilamida-bisacrilamida (95:5) en condiciones desnaturizantes (urea 7M). La polimerización tarda cuando menos 30 minutos.
3. El buffer de corrimiento es TBE al 0.7% y por corrida se utiliza 1 lt.
4. Se utilizan 3.000 V con una temperatura de 45 °C por 4 horas.

RESULTADOS EN COLOMBIA Y VENEZUELA

Como un trabajo adicional se realizó un tamizaje de las 27 mutaciones más comunes en el mundo a dos poblaciones colombianas una de 21 miembros y otra de 16, sumando un total de 37 pacientes.

Tabla 9: Distribución de Genotipos en Muestras Colombianas

GENOTIPO	PROBABILIDAD
ΔF508/ΔF508	2.70%
ΔF508/R1162X	2.70%
ΔF508/ΔI507	5.40%
ΔF508/X	18.91%
G542X/X	10.81%
G542X/G621T	2.70%
W1282X/G621T	2.70%
G621T/X	2.70%
G2789A/X	2.70%
X/X	48.64%

Aunado a esto, también se realizó el tamizaje de polimorfismos Tm. Los resultados son los siguientes:

Tabla 10: Distribución del Polimorfismo Tm en Muestras Colombianas

GENOTIPO	N	PORCENTAJE
7T/7T	12	44.44%
7T/9T	13	48.15%
9T/9T	2	7.41%

BIBLIOGRAFÍA

1. Cox TM y Sinclair J. "Biología Molecular en Medicina". Editorial Panamericana, Primera Edición. España, 1998. PAGES. 120-124.
2. Welsh M.J., Smith A.E., "Cystic Fibrosis". Scientific American, December. 1995.
3. Restrepo C.M., Pineda L., Rojas-Martínez A., Gómez Y., Villalobos M.C., Morales A. y Barrera-Saldaña H.A. "Cystic Fibrosis Gene Mutations In Three Latin American Countries". Enviado a American Journal of Clinical Genetics. 1999.
4. Chávez M., Velázquez R., Hernández E., Lezana J.L., Carnevale A., Orozco L. "Espectro de Mutaciones en el gen CFTR en pacientes mexicanos con fibrosis quística: Identificación de siete mutaciones nuevas". Memorias del congreso de Zacatecas de la Sociedad de Genética, 1999.
5. Thompson M.W., McInnes R.R., Willard H.F., "Genética en Medicina". Editorial Masson, Cuarta Edición, México 1996. PAGES. 273-277.
6. Francis S. Collins "Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications" Science, Vol. 256, May 1992. PAGES. 774-779.
7. Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L., Collins F.S. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene Chromosome Walking and Jumping" Science, Vol. 245, September 1989. PAGES. 1059-1065.
8. Naren A.P., Cornet-Boyaka E., Fu J., Villain M., Blalock E., Quick M.W., Kirk K.L. "CFTR Chloride Channel Regulation by a Interdomain Interaction" Science Vol. 286, October 1999. PAGES. 544-548.
9. Kerem B., Zielenski J., Markwicz D., Bozon D., Gazit E., Yahav J., Kennedy D., Riordan J.R., Collins F.S., Rommens J.M., Tsui L.-C. "Identification of mutations in regions corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP)-binding folds of the Cystic Fibrosis gene" Proc. Nat. Acad. Sci. 87: 8447-8451, 1990.

10. <http://www.sickkids.on.ca/cftr>
11. Riordan J.R., "Cystic Fibrosis as a Disease of Microprocessing of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Glycoprotein". *American Journal of Genetics* 64:1499-1504, 1999.
13. Allan J.L., Robbie M., Phelan P.D., Danks D.M. "Familial occurrence of meconium ileus" *Europ. J. Pediat.* 135: 291-292, 1981.
14. Gaskin K.J., Waters D.L., Howman-Giles R., de Silva M., Earl J.W., Martin H.C.O., Kan A.E., Brown J.M., Dorney S.F.A. "Liver Disease and Common bile-duct stenosis in Cystic Fibrosis" *New Eng. J. Med.* 318: 340-346, 1988.
15. Bilton D., Fox R., Webb A.K., Lawler W., McMahon R.F.T., Howat J.M.T. "Pathology of Common bile duct stenosis in Cystic Fibrosis" *Gut* 31: 236-238, 1990.
16. Knowles M.R., Barnett T.B., McConkie-Rosell A., Sawyer C., Kahler S.G. "Mild Cystic Fibrosis in a consanguineous family" *Ann. Intern. Med.* 110: 599-605, 1989.
17. <http://web.bham.ac.uk/walterss/cfintro.htm>
18. Pier G.B., Grout M., Zaldi T.S., Olsen J.C., Johnson L.G., Yankaskas J.R., Goldberg J.B. "Role of mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis patients to lung infections" *Science* 271: 63-67, 1996.
19. Kerem B., Buchanan J.A., Durie P., Corey M.L., Levinson H., Rommens J.M., Buchwald M., Tsui L-C. "DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in Cystic Fibrosis" *Am. J. Hum. Genet.* 44: 827-834, 1989.
20. Sharer N., Schwarz M., Malone G., Howarth A., Painter J., Super M., Braganza J. "Mutations in the Cystic Fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis" *New. Eng. J. Med.* 339: 645-652, 1998.
21. Cohn J.A., Friedman K.J., Noone P.G., Knowles M.R., Silverman L.M., Jowell P.S. "Relation between mutations of the Cystic Fibrosis gene and Idiopathic Pancreatitis" *New. Eng. J. Med.* 339: 653-658, 1998.

22. Oppenheimer E.H, Case A.L., Esterly J.R., Rothberg R.M. "Cervical mucus in Cystic Fibrosis: a possible cause of Infertility" *Am. J. Obstet. Gynec.* 108: 673-674, 1970.
23. Neglia J.P., FitzSimmons S.C., Maisonneuve P., Schoni M.H., Schoni-Affolter F., Corey M., Lowenfels A.B., Boyle P., Dozor A.J., Durie P. "The risk of Cancer among patients with Cystic Fibrosis" *New Eng. J. Med.* 332: 494-499, 1995.
24. Chu C.-S., Trapnell B.C., Murtagh J.J., Moss J., Dalemans W., Jallat S., Mercenier A., Pavirani A., Lecocq J.-P., Cutting G.R., Guggino W.B., Crystal R.G. "Variable detection of exon 9 coding sequences in Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium" *EMBO J.* 10: 1355-1363, 1991.
25. Chu C.-S., Trapnell B.C., Curristin S., Cutting G.R., Crystal R.G. "Genetic basis of variable exon 9 skipping in Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA" *Nature Genet.* 3: 151-156, 1993.
26. Kiewewetter S., Macek M.Jr., Davis C., Curristin S.M., Chu C.-S., Graham C., Shrimpton A.E., Cashman S.M., Tsui L.-C., Mickle J., Amos J., Highsmith W.E., Shuber A., Witt D.R., Crystal R.G., Cutting G.R. "A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background" *Nature Genet.* 5: 274-278, 1993.
27. Teng H., Jorissen M., Van Poppel H., Legius E., Cassiman J.-J., Cuppens H. "Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells" *Hum. Molec. Genet.* 6: 85-90, 1997.
28. Cuppens H., Lin W., Jaspers M., Costes B., Teng H., Vankeerberghen A., Jorissen M., Droogmans G., Reynaert I., Goossens M., Nilius B., Cassiman J.-J. "Polyvariant mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator genes: the polymorphic (TG)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation" *J. Clin. Invest.* 101: 487-496, 1998.

29. Savov A., Angelicheva D., Balassopoulou A., Jordanova A., Noussia-Arvanitakis S., Kalaydjieva L. "Double mutant alleles: are they rare?" *Hum. Molec. Genet.* 4: 1169-1171, 1995.
30. Spence J.E., Perciaccante R.G., Grieg G.M., Willard H.F., Ledbetter D.H., Hejtmancik J.F., Pollack M.S., O'Brien W.E., Beaudet A.L. "Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease" *Am. J. Hum. Genet.* 42: 217-226, 1988.
31. Voss R., Ben-Simon E., Zlotogora Y., Dagan J., Godfrey S., Haberfeld A., Hillel Y. "Uniparental disomy for chromosome 7-cause for homozygosity at the cystic fibrosis locus" (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 43: A73 only, 1988.
32. Voss R., Ben-Simon E., Avital A., Godfrey S., Zlotogora J., Dagan J., Tikochinski T., Hillel J. "Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental disomy be common in humans?" *Am. J. Hum. Genet.* 45: 373-380, 1989.
33. Klinger K., Horn G.T., Stanislovitis P., Schwartz R.H., Fujiwara T.M., Morgan K. "Cystic Fibrosis mutations in the Hutterite brethren" *Am. J. Hum. Genet.* 46: 983-987, 1990.
34. Hill A.J.M., Graham C.A., Kelly E.D., Morrison P.J., Nevin N.C. "Linkage disequilibrium and CF allele segregation analysis in Cystic Fibrosis families in Northern Ireland" *Hum. Genet.* 83: 391-394, 1989.
35. Kerem E., Kalaman Y.M., Yahav Y., Shoshani T., Abeliovich D., Szeinberg A., Rivlin J., Blau H., Tal A., Ben-Tur L., Springer C., Augarten A., Godfrey S., Lerer I., Branski D., Friedman M., Kerem B. "Highly variable incidence of Cystic Fibrosis and different mutation distribution among different Jewish ethnic groups in Israel" *Hum. Genet.* 96: 193-197, 1995.
36. Dork T., El-Harith E.-H.A., Stuhmann M., Macek M.Jr., Egan M., Cuttings G.R., Tzetis M., Kanavakis E., Carles S., Claustres M., Padoa C., Ramsay M., Schmidtke J. "Evidence for a common ethnic origin of Cystic Fibrosis mutation 3120+10G>T in diverse populations" *Am. J. Hum. Genet.* 63: 656-662, 1998.



DONATIVO

