II MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de sangre de pacientes deficientes en HGH fueron recolectadas en el Hospital "José E. González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Clínica-Hospital de especialidades N.25 del I.M.S.S. de Monterrey, la Clínica-Hospital del I.S.S.S.TE de Monterrey, la Clínica-Hospital del S.N.T.E sección 50 de Monterrey y en el Hospital del Centro Médico Nacional "La Raza" del I.M.S.S. de México, D.F. (tabla 4).

Tabla 4. Banco de DNAs de pacientes con deficiencia aislada y combinada de HGH (ver cuadros clínicos en apéndices 2 y 3).

aislada combinada

ORIGEN DE PACIENTES	PACIENTES IGHD EXISTENTES EN LA ULIEG	PACIENTES IGHD ADICIONADOS AL BANCO	TOTAL PACIENTES IGHD EN EL BANCO	PACIENTES CPHD EXISTENTES EN LA ULIEG	PACIENTES CPHD ADICIONADOS AL BANCO	TOTAL PACIENTES CPHD EN EL BANCO
Clínica 25 IMSS, Monterrey	17	10	27	-	4	4
Hospital de Maestros SNTE Monterrey	-	9	9	-	-	-
Hospital Regional ISSSTE Monterrey	7	1	8	1	-	1
Centro Médico Nacional "La Raza" IMSS México, D.F.	13	-	13	-	-	-
Universidad de Chile. Facultad de Medicina Stgo de Chile	4	-	4	-	-	-
Totales	41	20	61	1	4	5

2.2 REACTIVOS Y EQUIPO

REACTIVOS

Trizma base T-8524 (Sigma), EDTA E5134 (Sigma), SDS lauril sulfato L4390 (Sigma), proteinasa K P2308 (Sigma), ácido bórico B-6768 (Sigma), fenol P4161 (Sigma), acetato de amonio A1542 (Sigma), agarosa A9539 (Sigma), bromuro de etidio E4391 (Sigma), azúl de bromofenol B5525 (Sigma), cianol de xileno X4126 (Sigma), persulfato de amonio en polvo A9164 (Sigma), N, N' metilen bis-acrilamida A9099 (Sigma), acrilamida A9099 (Sigma), TEMED T7024 (Sigma), formamida F-7503 (Sigma), aceite mineral M5409 (Sigma), Tritón T-8532 (Sigma), etanol absoluto100983.2500 (Merk), cloroformo CX1055-9 MCA Merk (Probiotek), glicerol Merk (Probiotek), ácido clorhídrico 01689 (Casa Rocas), deoxinucleótidos trifosfato (DATP U-1201, DGTP U-1211, DCTP U-1221, DTTP U-1231) (Promega), Taq DNA polimerasa que incluye buffer de reacción 10X sin MgCl y solución de MgCl (Promega), iniciadores (gen HGH, exón 6 de GHR, exones 1, 3 Y 4 de PIT-1 y gen PROP-1) (Promega), estuche QIAEX II 28304 (QIAGEN), enzimas de restricción *Bgl* I, *Acc* I, *Ava* II, *Sma* I, *Afl* III, *Hae* III, *Mnl* I, *Pst* I y *Ssp* I (New Engl Biolabs), estuche de secuenciación cíclica 78500 (USB), IR2 solución stop 830-04997(LI-COR).

DESECHABLES

Puntillas amarillas 110Y (CEL Asociate Inc), puntillas azules 111B (CEL Asociate Inc), puntillas blancas 100C (CEL Asociate Inc), tubos Eppendorf 502C (CEL Asociate Inc), tubos Eppendorf 508C (CEL Asociate Inc), tubos Eppendorf 509C (CEL Asociate Inc), tubos Falcon 3216 (CEL Asociate Inc), tubos Falcon 3250 (CEL Asociate Inc), guantes de látex medianos 804-10 (CEL Asociate Inc), crioboxes de propileno R800 (CEL Asociate Inc), cinta amarilla para sellar (GIBCO BRL), recipientes (Nalgene), cajas de tubos Vacutainer con EDTA de 7 ml, cajas de agujas Vacutainer 21g11/2, agujas mariposa Vacutainer 21g3/4, bolsas de algodón 50g (Protec).

EQUIPO DE LABORATORIO

Sistemas de electroforesis vertical modelo S2 (GIBCO BRL), fuente de poder Power PAC 3000 (Bio-Rad), equipo de electroforesis horizontal (Bio-Rad), fuente de poder modelo 250 (GIBCO), micropipetas de presición de: 2ml, 10ml, 20ml, 200ml y 1000 ml (Gilson), horno de microondas 0.7FT (LG), mechero Bunsen 6 IN (VWR), centrifuga modelo 5415C (Brinkmann), termomixer (Brinkmann), vortex Maximix, plancha térmica (Thermolyne), equipo para análisis y documentación de geles Gel-Doc (Bio-Rad),

microcentrifuga (Eppendorf), baño de agua (Precision), potenciómetro 744 (MetroHM), congelador -70°C(REVCO), portapipetas, gradillas, termociclador Minicycler TM Modelo PTC 150 (MJ Research), termociclador (Hybaid Express), transluminador UV/W (Fotodyne), equipo de secuenciación automática sistema IR2 (LI-COR), computadoras Macintosh que incluyen los programas para análisis de secuencias: Amplify, 1.2B, DNA Strider 1.1 y Oligo 4.0 y computadoras IBM con Windows 98 incluyendo el Office 2000, Explorer 5.0 y Adobe Photoshop 2.0.

2.3 METODOLOGÍA

2. 3. 1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

a) La extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica de los pacientes seleccionados, se practicó utilizando la técnica de TSNT, clasificando las muestras de los pacientes en deficiencia aislada (GHD) y combinada (CPHD).
b) En los pacientes con GHD se buscaron mutaciones en la unidad transcripcional del gen hGH-N, por medio de su amplificación y utilizando el análisis de heterodúplex.
c) Cuando la prueba anterior resultó negativa se continuó con la detección de mutaciones en la región promotora de dicho gen, por medio de PCR y usando también la técnica del análisis de heterodúplex.
d) Cuando el tamizaje anterior arrojó resultados negativos se procedió a buscar las mutaciones en el gen GHR (receptor de la hormona) con las mismas técnicas mencionadas.
e) En cuanto a los pacientes con CPHD, primero se procedió a analizar el gen Pit-1 y si el análisis resultaba negativo, se analizaba finalmente el gen Prop -1.
f) Por último se precisaron las mutaciones, rescatando y purificando las bandas de las regiones que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, con el fin de determinarles su secuencia por medio de la técnica de secuenciación automática. (Figura 8).

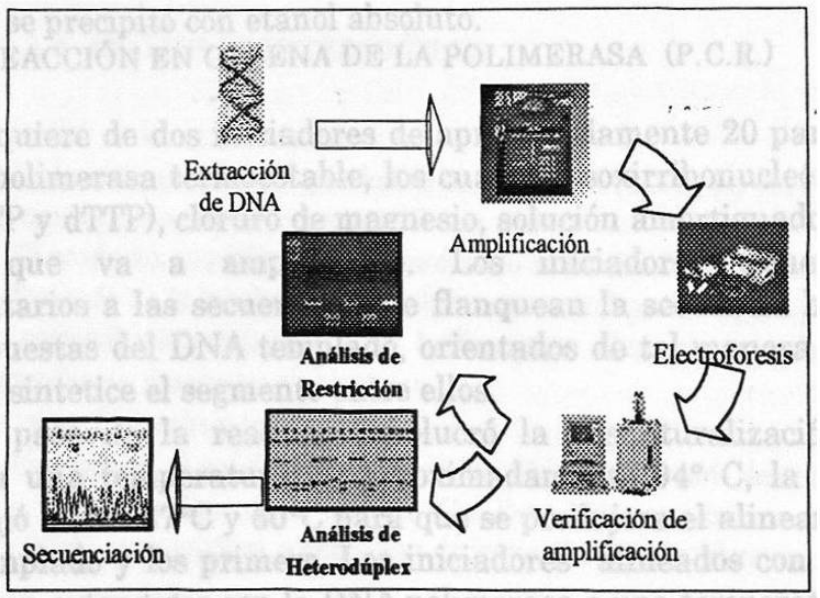

Figura 8. Estrategia experimental. Esta consistió en la extracción del DNA de muestras de pacientes, la amplificación de la región seleccionada por PCR, la verificación de la amplificación en gel de agarosa, el rastreo de mutaciones por restricción y/o heterodúplex y la secuenciación de las muestras que resultaron positivas.

2. 3. 2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes se seleccionaron basándose en los siguientes criterios:

a) Retraso del crecimiento.
b) Cara inmadura.
c) Cariotipo normal.
d) Proporciones corporales normales.
e) Retraso en el desarrollo óseo.
f) Niveles de HGH de menos de 7 ng/ml, después de la estimulación con un fármaco (clonidina, L-dopa ó propanolol).
g) Valores de los niveles de las hormonas hipofisiarias: FSH, PRL, TSH, ACTH y LH. (Ver Apéndices 2 y 3).

2. 3. 3 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS TÉCNICAS CLAVES

2. 3. 3. 1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

El DNA se obtuvo a partir de las muestras de sangre obtenidas de los pacientes y de los controles, utilizando para ello el método TSNT el cual utiliza como solución amortiguadora de lisis al Tris-HCl, EDTA, SDS y a la proteinasa K. Después de la lisis celular se procedió a la extracción del DNA

genómico usando solventes orgánicos (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico) y finalmente se precipitó con etanol absoluto.

2. 3. 3. 2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (P.C.R.)

La PCR requiere de dos iniciadores de aproximadamente 20 pares de bases, una DNA polimerasa termoestable, los cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), cloruro de magnesio, solución amortiguadora y el DNA templado que va a amplificarse. Los iniciadores tienen que ser complementarios a las secuencias que flanquean la secuencia blanco de las cadenas opuestas del DNA templado, orientados de tal manera que la DNA polimerasa sintetice el segmento entre ellos.

El primer paso de la reacción involucró la desnaturalización del DNA templado a una temperatura de aproximadamente 94° C, la temperatura luego se bajó entre 37°C y 60°C para que se produjera el alineamiento entre el DNA templado y los primers. Los iniciadores alineados con la secuencia blanco fueron extendidos con la DNA polimerasa a una temperatura de 72°C. El ciclo de desnaturalización, alineamiento y síntesis de DNA se repitió aproximadamente 30 veces (el primer ciclo generó un producto de tamaño indeterminado, pero ya para el segundo empezó a reemplazar exponencialmente al delimitado por los primers). Los productos de un ciclo de amplificación sirvieron como templados para el siguiente ciclo y así sucesivamente cada ciclo dobló la cantidad de producto, resultando en la acumulación exponencial del DNA blanco.

En la tabla 5 se enlistan los iniciadores que se utilizaron en cada una de las amplificaciones que se llevaron a cabo.

Tabla 5. Iniciadores utilizados en el presente estudio

CLAVE	SECUENCIA	AMPLIFICA
PITEX1A	5' GAATCGGCCCTTTGAGACAG 3'	EXÓN 1 DEL GEN PIT 1
PITEX1B	5' CCCGGTCATATGTAAACTGT 3'	EXÓN 1 DEL GEN PIT 1
PITEX3A	5' GTAGTTTAACCCCTTGTCTTTA 3'	EXÓN 3 DEL GEN PIT 1
PITEX3B	5' TTCTTGAACCCAAACGTTTAGA 3'	EXÓN 3 DEL GEN PIT 1
PITEX4A	5' GATACACAGATTTGTGTGAC 3'	EXÓN 4 DEL GEN PIT 1
PITEX4B	5' TCCTACTTATTGAAGCCATTA 3'	EXÓN 4 DEL GEN PIT 1
403	5' CCGAATTCCAGGAGAGGCACTGGGGA 3'	GEN HGH-N
138	5' TTGGTTCTCTCTAGAGGTCAGTGTTGGA 3'	GEN HGH-N y Promotor
145	5' TTTACGGCCGCTTACCTGTAGCCAT 3'	GEN HGH-N (Promotor)
PROP 3'	5' CGAACATTCAGAGACAGAGTCCCAGA 3'	GEN PROP-1
PROP 5'	5' GAATTCACCATGATGTCCCA 3'	GEN PROP-1
PROEX2A	5' TGGTCCAGCACCGAGCAG 3'	EXÓN 2 DE PROP-1
PROEX2B	5' TGCCCAACATTCTATGATAGC 3'	EXÓN 2 DE PROP-1
GHREX6A	5' ATTGTGTCTGTCTGTGTACTAATG 3'	EXÓN 6 DEL GEN GHR
GHREX6B	5' ATAGAAAGAAAAGTCAAAGTGTAAG 3'	EXÓN 6 DEL GEN GHR

2. 3. 3. 3 ANÁLISIS DE HETERODÚPLEX

Se realizó de la siguiente manera:

1.-Se desnaturalizaron los productos amplificados (200ng en vol de 2µl) incubando a una temperatura de 95°C durante 10 min.

2.- El producto amplificado desnaturalizado se incubó durante 6 hrs a 37°C.

3.- Después de la incubación se realizó una centrifugación ligera y se cargó en un gel de poliacrilamida adicionándole buffer stop. Generalmente las condiciones de electroforesis fueron las siguientes:

Voltaje = 250 volts y tiempo=15 hrs.

4.- Finalmente, el gel de poliacrilamida se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/ml), para su posterior análisis en el aparato Gel Doc 1000 que cuenta con transluminador (UV/Vis), computadora e impresora de inyección de tinta blanco y negro (Fig 9).

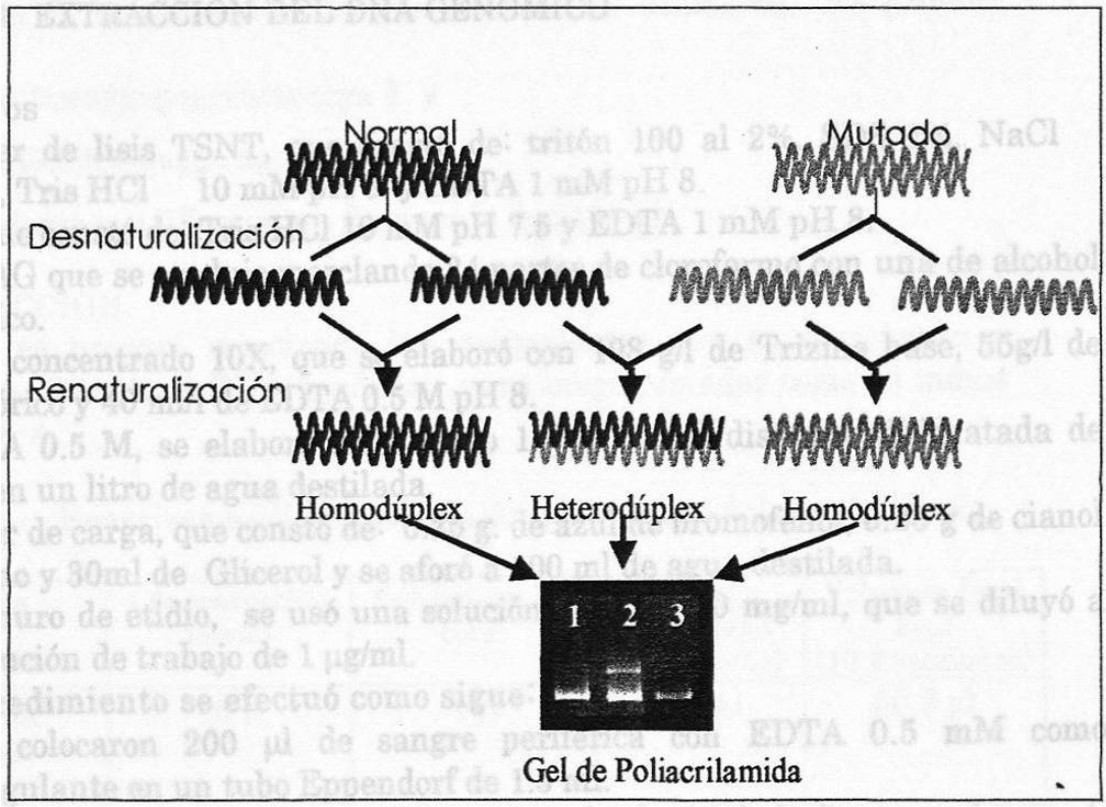

Figura 9. Análisis de un heterodúplex. En esta figura se muestra claramente la formación de un heterodúplex. Inicialmente se tiene un paciente con un alelo normal y el otro mutado. Al someter el amplicón a desnaturalización se generan cadenas sencillas de DNA en ambos alelos y después de permitir la renaturalización se pueden producir tres tipos de cadenas al azar: un homodúplex normal, un homodúplex mutado y el heterodúplex que resulta de la combinación de una cadena normal y una cadena mutada. Este proceso se puede visualizar en un gel de poliacrilamida por medio de una banda con corrimiento electroforético relativamente alterado.

2. 3. 3. 4 SECUENCIACIÓN

Las bandas que mostraron un patrón de movilidad electroforética alterado se extrajeron, se purificaron con el estuche comercial "QIAEX II", para finalmente secuenciarlas para precisar la mutación. En algunos casos, los productos de PCR se cortaron con enzimas para detectar con certeza la mutación. Por ejemplo, en el caso de los productos de la amplificación del exón 2 del gen Prop-1, éstos se cortaron con *Bcg* I, ya que cuando se presenta la mutación, se genera un sitio de restricción para esa enzima.
Para analizar las secuencias se utilizaron programas computacionales como: Amplify versión 1.2, DNA Strider versión 1.2 y OLIGO versión 4.0, además de los programas de Microsoft Office 2000.

2. 3. 4. PROTOCOLOS

2. 3. 4. 1 EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

Reactivos
a) Buffer de lisis TSNT, que constó de: tritón 100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.
b) TE que constó de: Tris HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM pH 8.
c) SEVAG que se produjo mezclando 24 partes de cloroformo con una de alcohol isoamílico.
d) TBE concentrado 10X, que se elaboró con 108 g/l de Trizma base, 55g/l de ácido bórico y 40 ml/l de EDTA 0.5 M pH 8.
e) EDTA 0.5 M, se elaboró disolviendo 186 g de sal disódica dihidratada de EDTA en un litro de agua destilada.
f) Buffer de carga, que constó de: 0.25 g. de azul de bromofenol, 0.25 g de cianol de Xileno y 30ml de Glicerol y se aforó a 100 ml de agua destilada.
g) Bromuro de etidio, se usó una solución stock de 10 mg/ml, que se diluyó a una solución de trabajo de 1 µg/ml.
El procedimiento se efectuó como sigue:
1.- Se colocaron 200 µl de sangre periférica con EDTA 0.5 mM como anticoagulante en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2.- Se centrifugó durante 5 min a 4500 rpm Se desechó el plasma y el paquete celular se resuspendió en 200 µl de solución amortiguadora de lisis TSNT.
3.- Se adicionaron 500 µl de fenol saturado, 100 µL de SEVAG y 200 µL de TE 1X.
4.- En cada adición de una nueva solución se mezclaron por inversión a excepción del SEVAG con el que se utilizó vortex por 5 min
5.- Después se centrifugó por 8 min a 14000 rpm, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf, al cual le fué agregado 1 ml de etanol al 100% y después se mezcló por inversión hasta que se observó la precipitación del DNA genómico.
6.- Se centrifugó a 14000 rpm durante 8 min, descartándose el sobrenadante.

7.- La pastilla se lavó con etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones citadas en el paso 6.
8.- La pastilla se dejó secar por 10 min a 37°C.
9.- Finalmente el DNA se resuspendió en 50 µL de TE 1X y para la verificación de su integridad se corrió en un gel de agarosa al 2.0%, ya después de su tinción con bromuro de etidio, se estimó su concentración con el aparato de análisis de imágenes Gel-Doc 1000.
10.- La concentración del DNA se puede determinar espectrofotométricamente (Absorbancia a 260 nm), donde la calidad es detectada mediante la relación de absorbancia 260nm/280nm.

2. 3. 4. 2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

2. 3. 4. 2. 1 PCR DEL GEN hGH-N

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS
Para realizar la amplificación del gen hGH-N, se utilizaron los primers consenso:
403 = 5´ccgaattccaggagaggcactgggga 3´ y

138 = 5´ ttggttctctctagaggtcagtgttgga 3´

Estos iniciadores amplificaron un fragmento de 2155 pb.

B) LA REACCIÓN.
1.-La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 6-A.

Tabla 6-A Reactivos utilizados en la amplificación del gen hGH-N.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 50µl (1 Reacción)	Volumen final 50µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	5.0 µl	50.0 µl
Iniciador 403	25 µM	0.5 µM	1.0 µl	10.0 µl
Iniciador 138	5 µM	0.3 µM	3.0 µl	30.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1.0 µl	10.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	2.0 mM	4.0 µl	40.0 µl
Enzima: Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1.0 U	0.2 µl	2.0 µl
H_2O MiliQ estéril	------	------	34.8 µl	348.0 µl
DNA	200 ng/µl	200 ng/µl	1.0 µl	------

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.
3.- Se agregó 1.0 µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (MiniCycler Programmable Thermal Controller Model PTC-150), utilizando el programa MCPHGH-AAV que contiene las condiciones detalladas en la tabla 6-B:

Tabla 6-B. Condiciones aplicadas en el PCR del gen hGH-N.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
MCPHGH-AAV	1	94°C	0:05:00
	2	94°C	0:00:30
	3	62°C	0:01:00
	4	72°C	0:01:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 2.0%, junto con un marcador de peso molecular (λ+*Pst* I) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.
8.-Después de verificar la amplificación se continuó con la digestión del producto amplificado con la endonucleasa de restricción *Ava* II que cuenta con 5 sitios de reconocimiento en el producto amplificado.
9.- Después de la restricción se procedió a efectuar la técnica del análisis por heterodúplex iniciando con la desnaturalización del producto, colocándolo a una temperatura de 95°C durante 10 min.
10.-Después de la desnaturalización, se incubaron los amplicones a temperatura ambiente durante 2 hrs, para permitir la renaturalización de las cadenas de DNA y la posible formación de heterodúplex.
11.- Finalmente para analizar estos productos digeridos, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y se realizó la electroforesis a 12 miliamperes durante 15 hrs. Al término de este periodo, se sacó el gel y se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/ml) durante 10 min, para después

visualizarlo en el Gel-Doc, donde se analizaron las seis bandas producidas con la digestión enzimática.

12.- Finalmente, para precisar las mutaciones, se secuenciaron las bandas que tenían un patrón de corrimiento electroforético diferente a las demás, utilizando el equipo de secuenciación automática.

2. 3. 4. 2. 2 PCR DEL PROMOTOR DEL GEN hGH-N.

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para amplificar la región promotora de este gen se usó el juego de oligos :

138= 5′ ttggttctctctagaggtcagtgttgga 3′ y

145= 5′ tttacggccgcttacctgtagccat 3′

Estos iniciadores generaron un producto de amplificación de 655 pb.

B) LA REACCIÓN.

1.-La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 7-A.

Tabla 7-A. Reactivos utilizados en la amplificación del promotor del gen hGH-N.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25 µl
Iniciador 145	5 µ M	0.5 µM	2.5 µl	25 µl
Iniciador 138	5 µ M	0.5 µM	2.5 µl	25 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl	5.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	2.0 mM	2.0 µl	20.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/ µl	1.0 U	0.2 µl	2.0 µl
H_2O MiliQ estéril	------	------	13.8 µl	138.0 µl
DNA	200 ng/µl	200 ng/µl	1.0 µl	------

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.

3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (MiniCycler Programmable Thermal Controller Model PTC-150), utilizando el programa MPHGH-AAV que contiene las condiciones que se detallan en la tabla 7-B.

Tabla 7-B. Condiciones usadas en el PCR del promotor del gen hGH-N.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
MPHGH-AAV	1	94°C	0:05:00
	2	94°C	0:00:30
	3	55°C	0:01:00
	4	72°C	0:01:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 2.0%, junto con un marcador de peso molecular (pBS + *Hae* III) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.
8.- Después de verificar la amplificación se procedió al análisis de heterodúplex (2.3.4.2.1).
9.- Para analizar los productos amplificados, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7 %, y se realizó la electroforesis a 12 miliamperes durante 18 hrs, este gel se tiñó también con bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder analizar las bandas en el Gel-Doc 1000.
10.-Finalmente se secuenciaron las bandas que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, usando el equipo de secuenciación automática.

2. 3. 4. 2. 3 PCR DEL GEN PROP-1

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS
Para realizar la amplificación del gen PROP-1 se utilizaron los primers:
Prop5 = 5´ cgaacattcagagacagagtcccaga 3´ y

Prop3 = 5´ gaattcaccatgatctccca 3´

Estos iniciadores produjeron un fragmento de 3513 pb
(Mullis y Rosenfeld, 1998).

B) LA REACCIÓN.
1.- La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 8-A.

Tabla 8-A. Reactivos utilizados en la amplificación del gen Prop-1.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25.0 µl
Iniciador Prop 3	25 µM	0.6 µM	0.6 µl	6.0 µl
Iniciador Prop 5	25 µM	0.6 µM	0.6 µl	6.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl	5.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5 µl	15.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.3 µl	3 µl
H_2O MiliQ estéril	------	------	18 µl	180.0 µl
DNA	100 ng/µl	100 ng/µl	1 µl	------

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.
3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (MiniCycler Programmable Thermal Controller Model PTC-150), utilizando el programa PROP1-AAV que contiene las condiciones detalladas en la tabla 8-B.

Tabla 8-B. Condiciones aplicadas en el PCR del gen Prop-1.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
PROP1-AAV	1	94°C	0:01:00
	2	94°C	0:00:30
	3	55°C	0:00:30
	4	68°C	0:06:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.4 %, junto con un marcador de peso molecular (λ +*Pst* I) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.
8.- Después de verificar la amplificación se procedió a la digestión del amplicón con las enzimas: *Sma* I, *Afl* III y *Ssp* I para obtener fragmentos que se pudieran analizar por heterodúplex (2.3.4.2.1).
10.- Para analizar los productos amplificados, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, y se realizó la electroforesis a 12 miliamperes durante 15 hrs, este gel se tiñó también con bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder analizar las bandas en el Gel-Doc.
11.-Finalmente se secuenciaron las bandas que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, usando el equipo de secuenciación automática.

2. 3. 4. 2.4 PCR DEL GEN GHR

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para realizar la amplificación del exón 6 del gen GHR se utilizaron los primers:
GHREX6A = 5′ attgtgtctgtctgtgtactaatg 3′ y

GHREX 6B = 5′ atagaaagaaaagtcaaagtgtaag 3′

Estos iniciadores produjeron un fragmento de 263 pb (Berg., 1994).

B) LA REACCIÓN.

1.- La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 9-A.

Tabla 9-A. Reactivos utilizados en la amplificación del exón 6 del gen GHR.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25.0 µl
Iniciador GHREX6A	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
Iniciador GHREX6B	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
dNTPs	10 mM	0.4 mM	1.0 µl	10.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	2.0 mM	2.0 µl	20.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.3 µl	3 µl
H_2O MiliQ estéril	------	------	15.2 µl	------
DNA	100 ng/µl	100 ng/µl	1.0 µl	------

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.

3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.

4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.

5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (Hybaid Express) utilizando el programa A32 que contiene las siguientes condiciones:

Tabla 9-B. Condiciones aplicadas en el PCR del exón 6 del gen GHR.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
A32	1	94°C	0:03:00
	2	94°C	0:00:45
	3	55°C	0:01:00
	4	72°C	0:01:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.4 %, junto con un marcador de peso molecular (pBS + *Hae* III) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.
8.-Después de verificar la amplificación se continuó con la detección de la mutación de Adenina a Guanina que genera un nuevo sitio de corte para la restricción con la enzima
Mnl I, en el codón 180 del fragmento amplificado y la presencia de esta mutación genera un fragmento de 113 pb, en caso contrario se obtiene un fragmento de 194 pb.
9.-Posteriormente esta digestión, se cargó en un gel de poliacrilamida al 10%, tiñendo el gel con Bromuro de Etidio (2 µg/ml), para analizar las bandas en el Gel-Doc.
10.- Finalmente se secuenciaron las bandas que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, usando el equipo de secuenciación automática.

2. 3. 4. 2. 5 PCR DEL GEN Pit-1

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS
Para realizar las amplificaciones se utilizaron los iniciadores siguientes, para el exón 1: PITEX1A y PITEX1B; para el exón 3: PITEX3A y PITEX3B y para el exón 4: PITEX4A y PITEX4B, que produjeron los fragmentos que se detallan en la tabla 10 (Pellegrini, 1996).

Tabla 10. Fragmentos producidos en las amplificaciones del gen Pit-1.

Claves	Oligonucleótidos	Fragmentos
PITEX1A	5′ gaatcggccctttgagacag 3′	261 pb
PITEX 1B	5′ cccggtcatatgtaaactgt 3′	
PITEX3A	5′ gtagtttaacccttgtcttta 3′	259 pb
PITEX 3	5′ agatttgcaaaccaagttctt 3′	
PITEX4A	5′ gatacacagatttgtgtgac 3′	318 pb
PITEX 4B	5′ tcctacttattgaagccatta 3′	

B) LA REACCIÓN.
1.- La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 11-A.

Tabla 11-A. Reactivos utilizados en las amplificaciones del gen Pit-1.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25.0 µl
Iniciador PITEX1A o PITEX3A o PITEX4A	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
Iniciador PITEX1B o PITEX3B o PITEX4B	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl	5.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	2.5 mM	2.5 µl	25.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.3 µl	3 µl
H_2O MiliQ estéril	------	------	15.2 µl	------
DNA	100 ng/µl	100 ng/µl	1.0 µl	------

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.
3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (Hybaid Express) utilizando el programa A22 que contiene las condiciones detalladas en la tabla 11-B.

Tabla 11-B. Condiciones aplicadas en los PCRs del gen Pit-1.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
A22	1	94°C	0:05:00
	2	94°C	0:01:00
	3	50°C	0:01:30
	4	72°C	0:02:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.5 %, junto con un marcador de peso molecular (pBS + *Hae* III) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en el transluminador UV.
8.-Después de verificar la amplificación, se continuó con la detección de la mutación por medio del análisis de heterodúplex (descrito anteriormente), para lo cual se realizó una electroforesis del producto amplificado en un gel de poliacrilamida al 10%.
9.- Finalmente, para visualizar las bandas del gel de heterodúplex, este se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/ml) y se analizó en el gel-doc.
10.- Las muestras que resultaron positivas al análisis de heterodúplex se purificaron por Qiaex II para secuenciarlas y precisar las mutaciones.

2.3. 4. 3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS PARA SECUENCIACIÓN

1.- Se extrajo la banda de interés del gel de poliacrilamida, se trituró y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Enseguida se adicionaron 50-100 µl de agua destilada de manera que cubriera la totalidad del fragmento.
2.- Se incubó el frag. a 85 °C, durante 5 min y enseguida a 65°C por 25 min.
3.-.Se rescató el sobrenadante con una micropipeta, cuidadosamente sin tocar la poliacrilamida y se colocó en tubo nuevo rotulado.
4.- Se hicieron varias diluciones con la solución anterior, para reamplificar el fragmento.
5.- Se corrió en gel de agarosa el total de la reamplificación, para extraer dicha banda y purificarla con el estuche de Qiagen (QIAEXII).
6.- Se extrajo la banda y se añadieron 300 µl de buffer QX 1 por cada 100 mg de gel.
7.- Se adicionaron 20 µl de solución de QIAEX II y se mezclaron cuidadosamente con el vortex durante 25 seg.
8.- Se incubó a 53 °C por 10 min para solubilizar la agarosa y unir el DNA. (se checó que el color de la mezcla fuera amarilla, pero si era naranja se adicionaban 10 µl de acetato de sodio 3M, pH 5.0 y se mezclaba e incubaba 5 min adicionales).
9.- Se centrifugó por 25 seg y se removió cuidadosamente el sobrenadante.
10.- Se lavó la pastilla con 500 µl de buffer QX1, se mezcló con el vortex y se centrifugó por 25 seg (este paso removió restos de agarosa).
11.- Se lavó la pastilla 2 veces con 500 µl de buffer PE. Se resuspendió la pastilla, se mezcló con el vortex y se centrifugó durante 25 seg (este paso removió trazas de sales contaminantes).
12.- Se puso a secar la pastilla a 37 °C durante 10-15 min (evitando que se secara demasiado porque ello dificultaba la disolución de la pastilla).

13.- Se eluyó con 20 µl de agua (PH 7.0-8.5) y se incubó a 53 °C por 5 min.
14.- Se centrifugó por 25 seg y se rescató cuidadosamente el sobrenadante en un tubo de 0.2 ml rotulado previamente.
15.- Generalmente se repitieron los pasos 13 y 14 y se combinaron los eluidos.

2. 3. 4. 4 SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA.

A) REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN CÍCLICA.

1.- Se preparó la mezcla maestra de la tabla 12-A.

Tabla 12-A. Reactivos de la mezcla maestra para secuenciación.

Reactivos	Volumen
Templado de DNA*	variable
Primer no-marcado (1 pmol/µl)	3.0 µl
Buffer de reacción (concentrado)	1.5 µl
Termo-secuenasa (4U/µl)	2.0 µl
H_2O	variable
Total	completar 27 µl

* Templados: Plásmido 350-500 fmol
Producto PCR 20-50 fmol
DNA ss 100-250 fmol

2.- Se etiquetaron cuatro tubos de PCR de 0.2 ml con: A, C, T, G, enseguida se agregaron a cada uno 2µl de la mezcla de terminación específica.
3.- Se mezcló perfectamente la mezcla maestra y se centrifugó brevemente.
Se adicionaron 6.5 µl de esta mezcla a cada tubo del p. anterior y se mezclaron.
4.- Se adicionó una gota de aceite mineral a cada tubo
5.- Se centrifugó brevemente a 12000 rpm
6.- Se colocaron los tubos en el termociclador (Hybaid express) y se eligió el programa Sequenase que contiene las condiciones de la tabla 12-B.

Tabla 12-B. Condiciones aplicadas en el PCR de secuenciación.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
Sequenase	1	95°C	0:02:00
	2	95°C	0:00:30
	3	50°C	0:00:30
	4	72°C	0:00:45
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	4°C	Humedecer

7.- Se purificaron las muestras (para remover terminadores marcados que no estaban incorporados) con la técnica de precipitación que se describe a continuación.

B). PURIFICACIÓN DE MUESTRAS (Precipitación con violeta intenso)

1.- En un tubo de 0.5 ml se colocaron los siguientes reactivos: 1.0 µl de acetato de sodio 3M, 8.5 µl de reacción de secuenciación cíclica, 1.0 µl de co-precipitante violeta intenso y 20 µl de etanol al 100%.
2.- Se mezclaron en vortex aproximadamente 10 seg, luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 min, después se mezclaron para aumentar la consistencia de la pastilla (esto hizo que el proceso de aspiración fuera más eficiente y efectivo).
3.- Se centrifugó a 12000 rpm por 20 min.
4.- El sobrenadante se aspiró evitando perturbar la pastilla.
5.- Se adicionaron 200 µl de etanol al 70 %.
6.- Se mezclaron en vortex aproximadamente 10 seg.
7.- Se repitieron los pasos 3 y 4.
8.- Se dejaron secar al aire. Alternativamente se secaron con vacío, o se incubaron a 90 °C.
9.- Se resuspendieron con 5.0 µl de solución Stop IR^2 (LI-COR).
10.- En vortex se mezclaron por aproximadamente 20 seg, se centrifugaron brevemente y se transfirieron las muestras tubos de 0.2 ml.
11.- Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C, durante 3 min, se almacenaron a 4 °C y se cargaron entre 1.0 y 1.5 µl en el gel de secuenciación.