



11216  
4  
2FJ  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

" FACULTAD DE MEDICINA "

SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

FRECUENCIA DE LA MUTACION G542X  
EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS  
CON FIBROSIS QUISTICA

T E S I S

DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA

EN GENETICA MEDICA

P R E S E N T A :

**DRA. M<sup>a</sup>. TERESA VILLARREAL MOLINA**

**INP**

MEXICO, D.F.

ABRIL 1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México

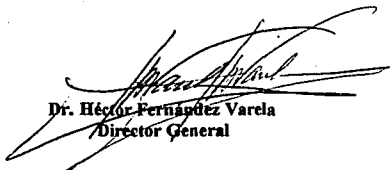


## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

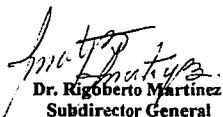
### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

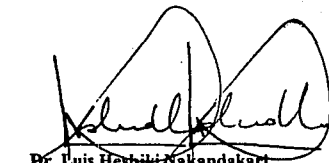
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



**Dr. Héctor Fernández Varela**  
Director General



**Dr. Rigoberto Martínez**  
Subdirector General  
de Enseñanza



**Dr. Luis Heshili Nakandakari**  
Jefe del Departamento de Enseñanza  
de Pre y Posgrado



**Dra. Lorena Orozco Orozco**  
Tutor de Tesis



**Dra. Alessandra Carnevale Cantoni**  
Profesor Titular del Curso



## **FRECUENCIA DE LA MUTACION G542X EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON FIBROSIS QUISTICA.**

María Teresa Villarreal, Margarita Chávez, José Luis Lezana, Alessandra Carnevale y Lorena Orozco. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Investigación en Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría. Secretaría de Salud. Asociación Mexicana de Fibrosis Quística. México, D. F.

### **RESUMEN**

Se estudió la frecuencia de la mutación G542X en una muestra de 80 pacientes mexicanos con fibrosis quística mediante la técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR. Se encontró que el 6.2% de los cromosomas de estos pacientes presentaban dicha mutación. Esta frecuencia es mayor a la reportada a nivel mundial de acuerdo con el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística, pero menor a la reportada en España. La variación en esta frecuencia puede explicarse por factores étnicos. En las poblaciones de EEUU y Canadá, las mutaciones  $\Delta F508$  y G542X se encuentran presentes en cerca del 75% de los cromosomas de pacientes con fibrosis quística. En mexicanos la búsqueda de estas dos mutaciones resuelve menos del 50% de los cromosomas, por lo que es necesario implementar otras técnicas para caracterizar otras mutaciones, buscar cuáles son las más frecuentes en mexicanos, y posiblemente proponer un esquema de tamizaje diferente al usado en poblaciones caucásicas.

**Palabras clave:** Fibrosis quística, mutación G542X, mutación  $\Delta F508$ , mutagénesis dirigida, PCR.

## **SUMMARY**

The frequency of the G542X mutation was determined in a sample of Mexican cystic fibrosis (CF) patients by PCR-mediated site-directed mutagenesis. Eighty patients were included in the study, and 6.2% of the CF chromosomes presented this mutation. This frequency is higher than that reported by the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, but lower than that reported in Spain. This difference can be explained by ethnic factors. While the  $\Delta F508$  and G542X mutations account for around 75% of CF mutations in caucasian populations in the U.S.A. and Canada, they account for less than 50% of the CF mutations in Mexican patients. It is therefore necessary to use different methods to characterize other mutations, to determine mutation frequencies, and possibly to propose a different scheme for mutation screening in Mexican CF patients.

**Key words:** Cystic fibrosis, G542X mutation,  $\Delta F508$  mutation, site-directed mutagenesis, PCR.

## INTRODUCCION

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica (1), y se calcula que su incidencia es de 1 en 2,000 nacidos vivos (2). Recientemente se calculó que en México 1 de cada 8,000 a 9,000 nacidos vivos padece esta enfermedad (J.L. Lezana, comunicación personal). Fue descrita por primera vez por Guido Fanconi en 1936 como un síndrome caracterizado por la presencia de fibrosis quística del páncreas y bronquiectasias (3). Más tarde se encontró que existe una afección generalizada de las glándulas exócrinas que producen secreciones viscosas, por lo que Farber la llamó "mucoviscidosis" (4).

Actualmente se sabe que los pacientes con FQ presentan una alteración en el transporte de cloro que produce una disfunción de las glándulas exócrinas y de las células epiteliales secretoras (5). Como consecuencia, en estos pacientes se observa elevación de los valores de cloruros en sudor y las secreciones mucosas de los tractos digestivo y respiratorio son anormalmente viscosas. En el páncreas ocurre obstrucción de los ductos y en ocasiones degeneración acinar, con producción insuficiente de enzimas pancreáticas que conduce a una absorción intestinal deficiente. Sin embargo, el problema más grave es la obstrucción a nivel del tracto respiratorio, que causa enfermedad pulmonar crónica obstructiva e infecciones repetitivas por bacterias como *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, lo que hace de la FQ una enfermedad letal (6). Actualmente la determinación de cloruros en sudor es el método diagnóstico más utilizado.

Uno de los avances más importantes en el estudio de la FQ fue la clonación del gen responsable de la enfermedad en 1989 (7, 8). Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en la banda q31, y consta de 250 kilobases (kb), tiene 27 exones, y transcribe un RNAm maduro de 6.5 kb que codifica para una proteína de

1480 aminoácidos llamada proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). Esta proteína es un canal de cloro dependiente de AMPc (9, 10).

A la fecha, se han descrito más de 200 diferentes mutaciones en el gen FQ. La frecuencia de estas mutaciones varía considerablemente de un área geográfica a otra y en los diferentes grupos étnicos (11). En la población caucásica alrededor del 70% de los cromosomas de pacientes con fibrosis quística presentan una delección de 3 pares de bases en el exón 10 que elimina el codón para la fenilalanina en la posición 508 de la proteína CFTR ( $\Delta F508$ ) (8). Nosotros hemos encontrado que el 39% de los cromosomas de pacientes mexicanos con FQ presentan esta mutación (12).

De acuerdo con los datos reportados por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística, a nivel mundial la segunda mutación más frecuente es la G542X (13). En esta mutación ocurre el cambio del codón para la glicina en la posición 542 de la proteína por un codón de terminación, debido a un cambio de una guanina por una timina en el exón 11. Se ha encontrado en el 3.4% de los cromosomas FQ de acuerdo al Consorcio. Sin embargo, en España el 8% de los cromosomas FQ presentan dicha mutación, y aún más, en el área de la costa Mediterránea y en las Islas Canarias la frecuencia es del 14% y 25% respectivamente (14).

## JUSTIFICACION

En el Instituto Nacional de Pediatría y en la Asociación Mexicana de Fibrosis quística acuden un gran número de niños afectados con fibrosis quística, a los cuales se les otorga atención médica incluyendo el asesoramiento genético. Sin embargo en muchas de las familias no ha sido posible otorgar un asesoramiento genético adecuado, dada la imposibilidad para detectar portadores por métodos clínicos. El conocimiento de los aspectos moleculares que han surgido a últimas fechas ha resuelto éste problema en países desarrollados. En México es muy poco lo que se sabe acerca de las

mutaciones que afectan a los pacientes con FQ. La frecuencia de la mutación  $\Delta F508$  en la población mexicana es baja en comparación con poblaciones caucásicas. La mutación G542X es la segunda mutación más frecuente a nivel mundial, y tiene una frecuencia alta en la población española. Las frecuencias de ésta y otras mutaciones en la población mexicana aún no se conocen, y es importante determinarlas para desarrollar un plan de tamizaje de mutaciones en pacientes mexicanos con FQ.

## **OBJETIVOS**

Determinar la frecuencia de la mutación G542X en una muestra de 80 pacientes mexicanos.

Detectar a los portadores de esta mutación entre los familiares de primer grado de los pacientes con FQ.

Determinar si existe correlación de genotipo-fenotipo y comparar los resultados con lo descrito previamente en la literatura.

## **POBLACION OBJETIVO**

1. Pacientes con diagnóstico clínico de fibrosis quística que mostraron elevación de los niveles de cloruros en sudor (mayor a 60 mEq/L) y que acudieron a la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística o al Instituto Nacional de Pediatría en el periodo comprendido entre julio de 1991 y septiembre de 1993.

2. Familiares de primer grado de estos pacientes.



## MATERIAL Y METODOS

Se incluyeron 80 pacientes en el estudio, a los cuales se les realizó historia clínica completa (ver anexo) y árbol genealógico. Para el estudio molecular se obtuvo una muestra de sangre periférica y se realizó extracción de DNA de leucocitos por el método convencional.

Para investigar la presencia de la mutación G542X se utilizó el método de mutagénesis dirigida mediada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (15). Los oligonucleótidos iniciadores para amplificar el segmento de DNA sobrelapan el sitio de la mutación, e introducen un cambio de una sola base. Con este cambio se crea un sitio de restricción para una enzima en el alelo normal, pero no en el que presenta la mutación. De esta manera pueden distinguirse ambos alelos en un gel de poliacrilamida.

Para detectar la presencia de la mutación G542X, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores o primers, con los que se obtiene un producto amplificado de 180 pares de bases:

Forward: 5' CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT 3'

Reverso: 5' CACTCAGTGTGATTCCACCTTCAC 3'

El oligonucleótido reverso es el que introduce el cambio de una sola base en el producto amplificado, por el cambio de una A por una T cerca de su extremo 3' (CAC en lugar de CTC) (Tabla 1).

Sin mutagénesis dirigida, la secuencia del amplificado sería:

5'.....CTT GGAGA AGG.....3'

Sin embargo, con mutagénesis dirigida, los alelos normales amplifican con la siguiente secuencia:

5'.....CTT GGIGA AGG.....3'

La enzima HphI reconoce la secuencia GGTTGA, y corta de 7 a 8 pares de bases más allá del sitio de reconocimiento. Así, los alelos que no presentan la mutación G542X serán cortados en 2 fragmentos, uno de 168 y otro de 12 pares de bases.

En cambio el alelo mutante que presenta un cambio de una G por una T al ser amplificado, no tiene la secuencia que es reconocida por la enzima HphI por lo que el producto amplificado permanece intacto (180 bp).

**PCR.** La amplificación se realizó en un aparato de ciclos térmicos (Perkin-Elmer) siguiendo el protocolo descrito por Friedman y cols. (15). Se agregó 1 µg de DNA a 100 µl de mezcla de amplificación que contenía 300 ng de los oligonucleótidos específicos para detectar la mutación G542X y 2.5 U de fragmento Stoffel de Taq polimerasa (Perkin-Elmer), todo en una solución que contenía por litro: 200 nmol de los deoxinucleótidos trifosfato, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 67 mmol de Tris HCl (pH 8.8), 10 mmol de 2-mercaptoetanol, 16.6 mmol de sulfato de amonio y 6.5 µmol de EDTA.

**Restricción.** Se tomaron 10 µl de la mezcla de reacción posterior a la amplificación, y se incubaron durante toda la noche a 37°C con 1 U de enzima HphI y 4 µl de la solución amortiguadora apropiada (New England Biolabs).

**Electroforesis.** Se agregaron 3 µl de colorante (azul de bromofenol/xilen cianol) a la mezcla de restricción y se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida al 12% a 85 volts durante 3 horas. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio, y se fotografió.

## RESULTADOS

Se estudiaron 80 casos índice con fibrosis quística utilizando la técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR. El producto amplificado es un fragmento de 180 pares de bases. Al ser digerido con la enzima Hph I, los alelos no G542X son cortados en 2 fragmentos, uno de 168 y otro de 12 pares de bases, mientras que los alelos G542X permanecen intactos. Por esto, todos los sujetos normales o que no portan la mutación G542X mostraron solamente la banda de 168 pares de bases; los pacientes homocigotos para la mutación G542X mostraron el fragmento de 180 pares de bases. Los heterocigotos compuestos que presentan la mutación G542X en un alelo y una mutación diferente en el otro, así como los portadores sanos de la mutación G542X mostraron dos bandas, la de 180 y la de 168 pares de bases. (Figura 1).

Se buscó la presencia de la mutación G542X en 160 cromosomas de pacientes con fibrosis quística, y se encontró en el 6.2% de estos cromosomas. Encontramos 2 pacientes homocigotos G542X (uno de ellos era producto de un matrimonio consanguíneo), 2 pacientes heterocigotos compuestos  $\Delta F508/G542X$ , un paciente heterocigoto compuesto G542X/S549N, y 3 pacientes con la mutación G542X en un alelo, y otra mutación aún no caracterizada en el otro. (La presencia de la mutación S549N fue determinada por otras técnicas no mostradas en el presente trabajo). Los datos clínicos de estos pacientes se describen en la tabla II.

De la misma manera se buscó la presencia de esta mutación en los familiares de primer grado de estos pacientes para detectar portadores, y se les brindó el asesoramiento genético adecuado.

## DISCUSION

La frecuencia de la mutación  $\Delta F508$  en pacientes mexicanos con fibrosis quística es más baja que la reportada en otros países hispanos tales como España y Argentina (8). Nosotros encontramos la mutación G542X en el 6.2% de los cromosomas de una muestra de pacientes mexicanos con fibrosis quística: Esta frecuencia es mayor a la reportada por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística (3.4%) (13), pero menor a la reportada en España (8%) (14). El único estudio que reporta la frecuencia de la mutación G542X en mexicanos fue realizado en Chicago y solamente incluía 10 cromosomas, 2 de los cuales presentaban la mutación G542X (16). Esta mutación es la segunda más frecuente ( después de la  $\Delta F508$ ) en todos estos estudios.

El origen étnico de la población mexicana es principalmente mestizo (amerindio-hispano), donde más del 50% de los genes son de origen indígena, alrededor del 40% son de origen blanco (hispano), y el resto son de origen negro (17, 18). Los orígenes indígenas de la población mexicana son diferentes a los de otras poblaciones latinoamericanas. Estos factores étnicos pueden explicar las variaciones en las frecuencias de diferentes mutaciones en el gen de la fibrosis quística. La frecuencia relativamente alta de la mutación G542X en mexicanos puede explicarse por el origen hispano de la población, ya que España es el país que a la fecha ha reportado la frecuencia más alta de cromosomas G542X en pacientes con fibrosis quística.

La mutación G542X es considerada como "grave", puesto que produce un fenotipo con insuficiencia pancreática (19). Ambos pacientes homocigotos para la mutación G542X encontrados en este estudio presentaron enfermedad pulmonar leve, pero insuficiencia pancreática y detención del crecimiento y desarrollo, siendo su cuadro predominantemente digestivo. Estos datos están de acuerdo a lo reportado en

la literatura para pacientes con fibrosis quística con mutaciones que producen codones de terminación en ambos alelos (19, 20, 21). Los pacientes heterocigotos compuestos  $\Delta F508/G542X$  presentan neumopatía moderada a grave e insuficiencia pancreática. Los reportes en la literatura para este genotipo lo describen como muy similar a los homocigotos  $\Delta F508$  pero con mayor frecuencia de ileo meconial (9 de 18 pacientes). Ninguno de los 2 pacientes reportados en este estudio presentó ileo meconial.

La mutación S549N produce un cambio de una serina por una asparagina en la posición 549 de la proteína, es muy poco frecuente y es considerada como grave. El único reporte en la literatura de un paciente homocigoto para esta mutación es el de una niña de origen pakistani, producto de padres consanguíneos, que presentaba un cuadro muy grave con pobre respuesta al tratamiento a los 5 años de edad (22). Nuestro paciente heterocigoto compuesto G542X/S549N tiene actualmente 18 años, presenta insuficiencia pancreática y neumopatía crónica moderada, con exacerbaciones pulmonares recurrentes. Esto es lo esperado ya que presenta mutaciones graves en ambos alelos.

El cuadro de los pacientes con la mutación G542X en un alelo y una mutación desconocida en el otro fue variable: un paciente presentaba insuficiencia pancreática y neumopatía crónica leve, con infecciones recurrentes por *P. aeruginosa*, mientras que en el otro paciente no se refería neumopatía crónica, su función pulmonar se valoró como buena de acuerdo a la escala de Schwachman-Bransfield, y cursaba con suficiencia pancreática, pero presentaba niveles elevados de cloruros en sudor. Esta diferencia podría explicarse por la presencia de diferentes mutaciones en los otros alelos. Así, el paciente con suficiencia pancreática probablemente tenga una mutación considerada "leve" en el otro alelo.

En poblaciones caucásicas, al hacer la búsqueda dirigida de las mutaciones  $\Delta F508$  y G542X en pacientes con fibrosis quística, se encuentra la mutación presente en casi el 75% de los cromosomas (13). En cambio en nuestra población, estas dos

mutaciones se encuentran en menos del 50% de los cromosomas, por lo que el tamizaje para estas dos mutaciones es insuficiente para asesorar a la mayoría de nuestros pacientes. Es evidente que es necesario implementar nuevas metodologías como la técnica SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms o polimorfismos conformacionales en DNA de una sola hebra) (23) y secuenciación para detectar cuáles son las mutaciones presentes en nuestra población, brindar asesoramiento genético a un mayor número de familias mediante la detección de portadores, determinar las frecuencias de las otras mutaciones caracterizadas, y posiblemente proponer un nuevo esquema de tamizaje para las mutaciones más frecuentes en pacientes mexicanos con FQ.

## BIBLIOGRAFIA

1. Merrit AD, Hanna BL, Todd CL (1962). Incidence and mode of inheritance of cystic fibrosis, abstracted. *J Lab Clin Med* 20:998-999.
2. Steinberg AG, Brown DC (1960). On incidence of cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Hum Genet* 12:416-424.
3. Fanconi G, Uehlinger E, KJnauer C (1936). Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wein Med Wochenschr* 86:753-760.
4. Farber S (1945). Some organic disturbances in early life. *J Michigan Med Soc* 44:587-594.
5. McPherson MA, Goodchild MC (1988) The Biochemical defect in cystic fibrosis. *Clin SC* 74:337-345.
6. Goodchild MC, Dodge JA (1985) Cystic Fibrosis Manual of Diagnosis & Management. 2nd Ed Balliere Tindall Press, Eastbourne.
7. Riordan J, Rommens J, Kerem BS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73.
8. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz DA, Cos TK, Chakravarti A, Buchwald M (1989). *Science* 245:1073-80.
9. Wine J (1993). Ion channels and transmembrane transporters. *Current Biology* 3(2):118-120.
10. Bear CE, Canhui L, Kartner N., Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan J (1992). Purification and Functional Reconstitution of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *Cell* 68:809-818.
11. Tsui LC (1992). The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* 8:392-398.

12. Orozco L, Salcedo M, Lezana JL, Chávez M, Valdez H, Moreno M, Carnevale A (1993). Frequency of Delta-F508 in a Mexican sample of cystic fibrosis patients. *J Med Genet* 30:501-502.
13. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1990), Worldwide survey of the Delta-F508 mutation. Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 47:354-359.
14. Casals T, Nunes V, Palacio A, Giménez J, Gaona A, Ibáñez N, Morral N, Estivill X (1993). Cystic fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum Genet* 91:66-70.
15. Friedman KJ, Highsmith WE, Silverman LM (1991). Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 37:1-6.
16. Ober C, Lester LA, Mott C, Billstrand C, Lemke A, van der Ven K, Marcus S, Kraut J, Lloyd-Still J and Booth C. (1992). Ethnic heterogeneity and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) mutation frequencies in Chicago-area CF families. *Am J Hum Genet* 51:1344-1348.
17. Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, et al. (1986). Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 71:203-207.
18. Lisker R, Ramírez E, Pérez Briceño R, Granados J, BVabinsky V (1990). Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 62:791-801.
19. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC and Durie P (199 ) *Am J Hum Genet* 50:1178-1184.
20. Bondelle M, Lissens W, Malfroot A (1991). Mild cystic fibrosis in a child homozygous for G542 nonsense mutation in CF gene. *Lancet* 338:189.



21. Cutting G, Kasch LM, Rosenstein BJ, Tsui LC, Kazazian HH, Antonarakis SE (1990). Two patients with cystic fibrosis nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease. *New Engl J Med* 323:1685-1688.
22. Curtis A, Richardson RJ, Boohene J, Jackson A, Nelson R, Bhattacharya SS (1993). Absence of cystic fibrosis mutations in a large Asian population sample and occurrence of a homozygous S549N mutation in an inbred Pakistani family. *J Med Genet* 30:164-166.
23. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.

**TABLA 1**

	ALELO NORMAL	ALELO G542X
Sin mutagénesis dirigida	5'...CTT <u>GG</u> AGA AAG...3'	5'...CTT <u>TG</u> AGA AAG...3'
Mutagénesis dirigida	3'...CTT <u>GGTGA</u> AAG...3' HphI	5'...CTT <u>TGTGA</u> AAG...3' No HphI
Digestión con HphI	1 Fragmento de 168 bp 1 Fragmento de 12 bp	1 Fragmento de 180 bp (intacto)

**TABLA II**

GENOTIPO	G542X/G542X (n = 2)	ΔF508/G542X (n = 2)	G542X/S549N (n = 1)	G542X/OTRA (n = 2*)
Edad actual (x)	4 años	8 años	18 años	11 años
Edad de inicio (x)	8 meses	8 meses	3 años	5 meses
Edad al diagnóstico (x)	18 meses	24 meses	9 años	6 años
Función pancreática	Insuficiente (2/2)	Insuficiente (2/2)	Insuficiente	Insuficiente (1) Suficiente (1)
Neumopatía	Leve	Moderada	Moderada	Leve
Cloruros en sudor (x)	112 mEq/L	105 mEq/L	85 mEq/L	107.5 mEq/L
Bacteriología del tracto respiratorio	del P. aeruginosa (1) P. aeruginosa + S. marcescens (1)	P. aeruginosa (1) P. aeruginosa + C. albicans (1)	P. aeruginosa + S. aureus	P. aeruginosa (1) S. aureus (1)

\* No se encontró el expediente clínico de uno de estos pacientes.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### PIE DE FIGURA

Figura 1. Análisis de la mutación G542X por mutagénesis dirigida mediada por PCR. En la parte superior se observa el árbol genealógico de uno de los casos índice. Carril 1: Marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 digerido con Hae-III. Carril 2: Caso índice, homocigoto para la mutación G542X, se observa una sola banda de 181 pares de bases. Carriles 3 y 4: padre y madre del caso índice, portadores de la mutación G542X. Se observa el alelo normal de 168 pares de bases y el alelo G542X de 181 pares de bases. Carril 5: Hermana del paciente, homocigota normal. Carril 6: Control normal.

