

37
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO MOLECULAR DE LA FIBROSIS
QUISTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
EMILIO JOAQUIN CORDOVA ALARCON

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LORENA SOFIA OROZCO OROZCO.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1998

25 9507



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

ESTUDIO MOLECULAR DE LA FIBROSIS QUISTICA

realizado por EMILIO JOAQUIN CORDOVA ALARCON

con número de cuenta 88 15594-2 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. LORENA OROZCO OROZCO. *Lorena Orozco*

Propietario BIOL. BERTHA MOLINA ALVAREZ.

Bertha Molina Alvarez

Propietario M. EN IBB. BENITO ESTRADA MENA.

Benito Estrada Mena

Suplente M. EN C. ARIADNA ESTELA GONZALEZ DEL ANGEL.

Ariadna Estela Gonzalez del Angel

Suplente DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ

Sara Frias Vazquez

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. ALBAANDRO MARTINEZ MENA

Albaandro Martinez Mena

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
HUMANA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

Agradecimientos

A mi madre, por todo el esfuerzo realizado en mi formación académica y a quien debo en gran parte lo que soy

A mi padre, por su ejemplo y cariño

A Fabian y Rosel, por su compañía y todas nuestras anécdotas

A mis abuelos (los cuatro), por sus enseñanzas

A mi padrino, por su apoyo económico y por supuesto el estar siempre para ayudarme

Al capitán, por su ayuda silenciosa

A la Dra Lorena Orozco, por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación, así como por su apoyo durante y después de mi estancia en su laboratorio

A la Dra Sara Frias, por ser más que una maestra, una amiga

A mis asesores Ariadna Gonzales, Bertha Molina, Ma. Teresa Villareal y Benito Estrada, por su ayuda en la realización de esta tesis

A mis compañeros del laboratorio, Manuel, Guillermo, Gabriela, Miguel M, Miguel Angel A, Miguel Angel R, David, Margarita, Yolanda, Ariadna, Araceli

A todo el elenco del laboratorio de citogenética, en especial a Angelica, Consuelo y Silvia

A mis compañeros de generación, Rogelio, Rene, Oscar, Magda, Patricia, Alejandro, Marcia, Belem, Rosario, Jose Juan, Roberto y Roberto, Miguel y Renata, Humberto, Libertad, Elia, Alejandra S, Verónica, Silvia, Beatriz, Erika S, Maru, Lucía, Laura Sarti, Erika P, Salomón.

Quisiera agradecer en especial a Fabiola sin quien esta tesis no hubiera sido posible, por su apoyo incondicional durante la realización del trabajo y toda mi vida académica, por ser mi mejor crítico y mi principal apoyo, por los momentos excepcionales que hemos vivido, pero sobre todo por su cariño.

A Fabiola

ABREVIACIONES

- A.** Adenina
- aa.** aminoácido
- AMPc.** Adenosín monofosfato cíclico.
- AP.** Persulfato de amonio.
- Asn.** Asparagina.
- ATP.** Adenosín trifosfato.
- b.** base (s).
- BLCB.** Buffer de lisis para células blancas.
- BLCR.** Buffer de lisis para células rojas.
- C.** citocina.
- CVABD.** (Congenital bilateral absence of the vas deferens). Ausencia bilateral de los vasos deferentes.
- CFTR.**(cystic fibrosis transmembrane regulator) Proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ. Producto del gen de la FQ.
- DNA.** ácido desoxirribonucleico.
- D.O.** Densidad óptica.
- DTT.** Ditionitrito.
- EDTA.**Etilen-diamino tetraacetato de sodio.
- F.** Forward.
- FQ.** fibrosis quística
- G.** Guanina.
- GCATmix.** mezcla de guanina, citocina, adenina y timina.
- Gly.** Glicina.
- HCl.** ácido clorhídrico.
- H₂O_{dd}.** Agua bidestilada.
- Ile.** Isoleucina.
- IP.** Insuficiencia pancreática.

Kb. Kilobases.

KCl. Cloruro de Potasio.

L. Litros.

Lys. Lisina.

M. Molar.

Meq. Miliequivalentes.

MgCl₂. Cloruro de Magnesio.

mg. Miligramos.

min. Minutos.

ml. Mililitros.

mM. milimoles.

NaCl. Cloruro de sodio.

NaOH. Hidróxido de sodio.

NBD. (Nucleotide binding domain) Dominio de unión a nucleótidos.

ng. Nanogramos.

nm. Nanómetros.

pb. Par (es) de bases.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

PSM. (PCR, Site-Directed, Mutagenesis) Mutagénesis dirigida mediada por PCR.

R. Reverse.

RE. Reticulo endoplásmico.

RNA. Ácido ribonucleico.

RNA_m. Ácido ribonucleico mensajero (ver glosario).

RT-PCR. PCR reversa (ver glosario).

SDS. Duodecil sulfato sódico.

Ser. Serina.

SP. Suficiencia pancreática.

SSCP. (Single stranded conformational polymorphisms). Análisis de polimorfismos conformacionales de cadenas sencillas.

T. Timina.

TBE. Tris-borato-EDTA.

TE. Tris- EDTA.

TEMED. N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamino

UV. Ultravioleta.

V. Volts.

X². Prueba estadística de chi²

µg. microgramos.

µl. microlitros.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Historia	1
Patología	4
Estructura del gen	7
Proteína CFTR	10
Dominios de la proteína CFTR	13
Mutaciones en el gen FQ	15
Análisis de haplotipos y mutaciones recurrentes	23
Bases moleculares de la disfunción del canal de cloro CFTR	24
Correlación genotipo-fenotipo	28
Alta frecuencia de FQ en la población caucásica	29
Justificación	31
OBJETIVOS	32
MATERIAL Y MÉTODOS	33
Población objetivo	33
Extracción de DNA	33
Estrategia	34
Purificación de DNA	35
Precipitación de DNA	35
Cuantificación del DNA	36
Reacción en Cadena de la polimerasa	37

Mutagénesis dirigida	41
Digestión de los productos de PCR	45
Análisis estadístico	46
RESULTADOS	47
Análisis de las mutaciones FQ	47
$\Delta F508$	47
G542X	49
N1303K	49
$\Delta I507$	52
S549N	54
1924del7	54
2055del9→A	54
Frecuencia de las mutaciones del gen FQ en la población mexicana	58
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	79
APÉNDICE	80
GLOSARIO	85
BIBLIOGRAFÍA	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organos afectados en la FQ.....	2
Figura 2. Bases moleculares de la afección respiratoria en pacientes FQ.....	3
Figura 3. Representación esquemática de la producción de sudor y del transporte de electrolitos en una glándula sudorípara normal	6
Figura 4. Localización del gen FQ en el cromosoma 7	8
Figura 5. Estructura del gen FQ y su producto proteico	9
Figura 6. Productos proteicos de algunos genes de la superfamilia ABC	11
Figura 7. Estructura de la proteína CFTR	12
Figura 8. Conformación de la proteína CFTR en la membrana celular	14
Figura 9. Esquema de la mutación $\Delta F508$	16
Figura 10. Distribución geográfica de las mutaciones FQ	18
Figura 11 Tipos de mutaciones que afectan al gen FQ	21
Figura 12. Distribución de las mutaciones en el gen FQ	22
Figura 13. Clasificación de las mutaciones causantes de la FQ	25
Figura 14. Integridad de las muestras de DNA	38
Figura 15. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por PSM	48
Figura 16. Análisis de la mutación G542X por PSM	50
Figura 17. Análisis de la mutación N1303K por PSM	51
Figura 18. Análisis de la mutación $\Delta I507$ por PSM	53
Figura 19. Análisis de la mutación S549N por PSM	55
Figura 20. Análisis de la mutación 1924del7 por PSM	56
Figura 21. Análisis de la mutación 2055del9→A por PSM	57
Figura 22. Detección de mutaciones FQ en tres diferentes poblaciones	63
Figura 23. Algoritmo diagnóstico para la detección de mutaciones FQ	64
Figura 24. Frecuencia de la $\Delta F508$ en países europeos	69

Figura 25. Frecuencia de la $\Delta F508$ en países americanos	70
Figura 26. Frecuencia de la G542X en países europeos	71
Figura 27. Frecuencia de la G542X en países americanos	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones que afectan al gen FQ de alta frecuencia a nivel mundial	20
Tabla 2. Clases de mutaciones que causan FQ	26
Tabla 3. Características de las mutaciones analizadas en este trabajo	39
Tabla 4. Condiciones de PCR	40
Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el estudio	42
Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el estudio	43
Tabla 7. Detección de la mutación $\Delta F508$ por PSM	44
Tabla 8. Frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, N1303K, $\Delta I507$, S549N, 1924del17, 2055 del9→A	59
Tabla 9. Comparación de la frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, N1303K, $\Delta I507$ y S549N encontradas en este trabajo con las reportadas a nivel mundial y en siete grandes regiones del mundo	67
Tabla 10. Comparación de la frecuencia de la mutación N1303K encontrada en este trabajo con la reportada en otros países	73

RESUMEN.

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica, afecta a 1 de cada 2,000-3,000 nacidos vivos. Los pacientes con FQ presentan una afección generalizada de las células epiteliales, cuyas secreciones se vuelven anormalmente viscosas, lo cual altera la función de algunos órganos, principalmente pulmón, páncreas e intestino.

El gen asociado a la FQ fue clonado en 1989 y codifica para una proteína denominada reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ (CFTR), por su papel como canal de cloro en la membrana apical de las células epiteliales. A la fecha se han caracterizado más de 750 mutaciones en el gen FQ; sin embargo, alrededor del 70% de los cromosomas FQ tienen una delección de tres pb que codifican para una fenilalanina en la posición 508 de la proteína CFTR ($\Delta F508$). El resto de las mutaciones caracterizadas hasta el momento, presentan frecuencias muy bajas en la población mundial. Por otro lado, se ha encontrado que la frecuencia de las diferentes mutaciones del gen FQ varía ampliamente entre los diferentes grupos étnicos.

Actualmente se desconoce la frecuencia de la FQ en México, así como las mutaciones que la causan. En este trabajo se realizó un tamizaje de las mutaciones $\Delta F508$, $\Delta I507$, G542X, N1303K, S549N, 1924del7 y 2055del9→A en 101 pacientes mexicanos con FQ y sus familiares de primer grado. Estas mutaciones se buscaron por mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM), o PCR simple y restricción enzimática. La mutación más frecuente fue la $\Delta F508$ (36.6%), seguida por la G542X (6.56%) y la $\Delta I507$ (1.66%). Las mutaciones detectadas con menor frecuencia fueron: la S549N (0.62%), y la 1924del7 (0.84%). No se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$ y G542X en México y algunos países de Europa del Sur como España. Estos hallazgos parecen sugerir que la invasión española a México pudo haber sido la puerta de entrada de las mutaciones $\Delta F508$ y G542X a la población Mexicana.

Este trabajo permitió establecer una estrategia para el diagnóstico molecular de la FQ en la población mexicana.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica, y se presenta con una incidencia de 1 en 2,000 a 3,000 nacidos vivos (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994). Esta enfermedad se caracteriza por una afección generalizada de las células epiteliales que conduce a una secreción exócrina anormalmente viscosa. La gran viscosidad de estas secreciones altera la función de los sistemas respiratorio, digestivo y genitourinario, así como de las glándulas sudoríparas (Fig. 1). El cuadro clínico es progresivo y la afección respiratoria es la principal causa de morbilidad y mortalidad.

Existen reportes sobre casos de ileo meconial y de la asociación de cuadros pancreáticos y respiratorios desde el siglo XVII. Sin embargo, fue hasta 1938 cuando Anderson describió formalmente el cuadro denominado "fibrosis quística del páncreas" (Anderson, 1938). En 1945 Farber describió la afección generalizada de las glándulas exócrinas, y dadas las características de las secreciones, denominó al cuadro "Mucoviscidosis" (Farber, 1945). En esta misma década, Anderson y Hodges describieron el patrón autosómico recesivo en varios árboles genealógicos (Anderson *et al*, 1946). di Sant' Agnese sugirió que esta enfermedad cursa con una pérdida excesiva de sal a través del sudor, al basarse en el caso de un niño afectado que presentó depleción salina durante el verano. Posteriormente, demostró la existencia de niveles altos de cloro y sodio en el sudor de los pacientes (di Sant' Agnese *et al*, 1953). Oppenheimer reportó en 1975 que ciertos pacientes con FQ presentan función pancreática normal (Oppenheimer *et al*, 1975), lo cual sirvió de base para el análisis de la variabilidad fenotípica de la enfermedad, iniciada en 1982 por Sing (Sing *et al*, 1982).

En 1983 se describió que la FQ se debe a una impermeabilidad de la membrana apical de las células epiteliales al ion cloro. Este defecto es el responsable de la acumulación de moco espeso y deshidratado en las vías respiratorias y en los conductos de las glándulas exócrinas (Fig. 2) (Cheng *et al*, 1990; Welsh *et al*, 1995a; Welsh *et al*, 1995b).

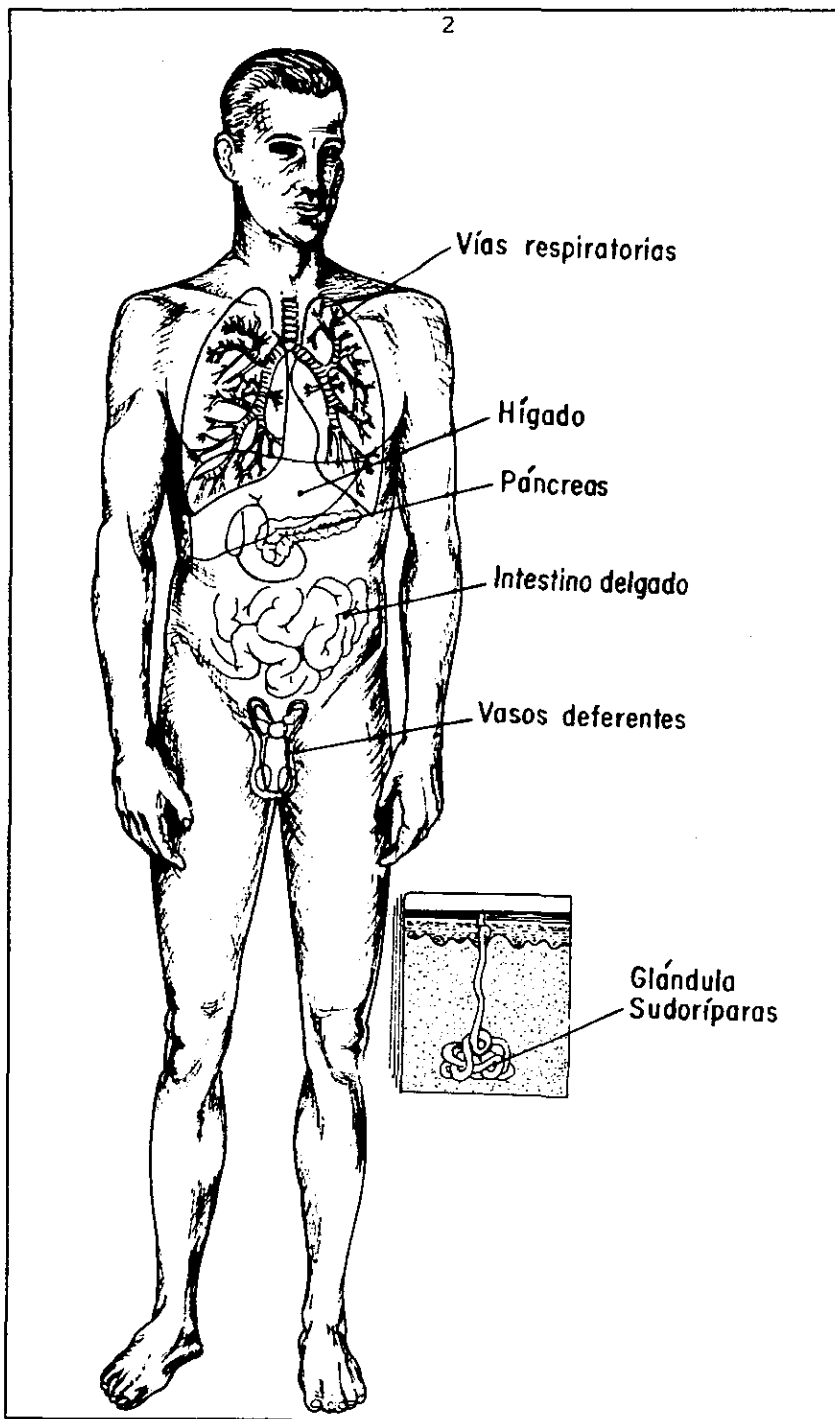


Figura 1. Organos afectados en la FQ. (Welsh *et al*, 1995b)

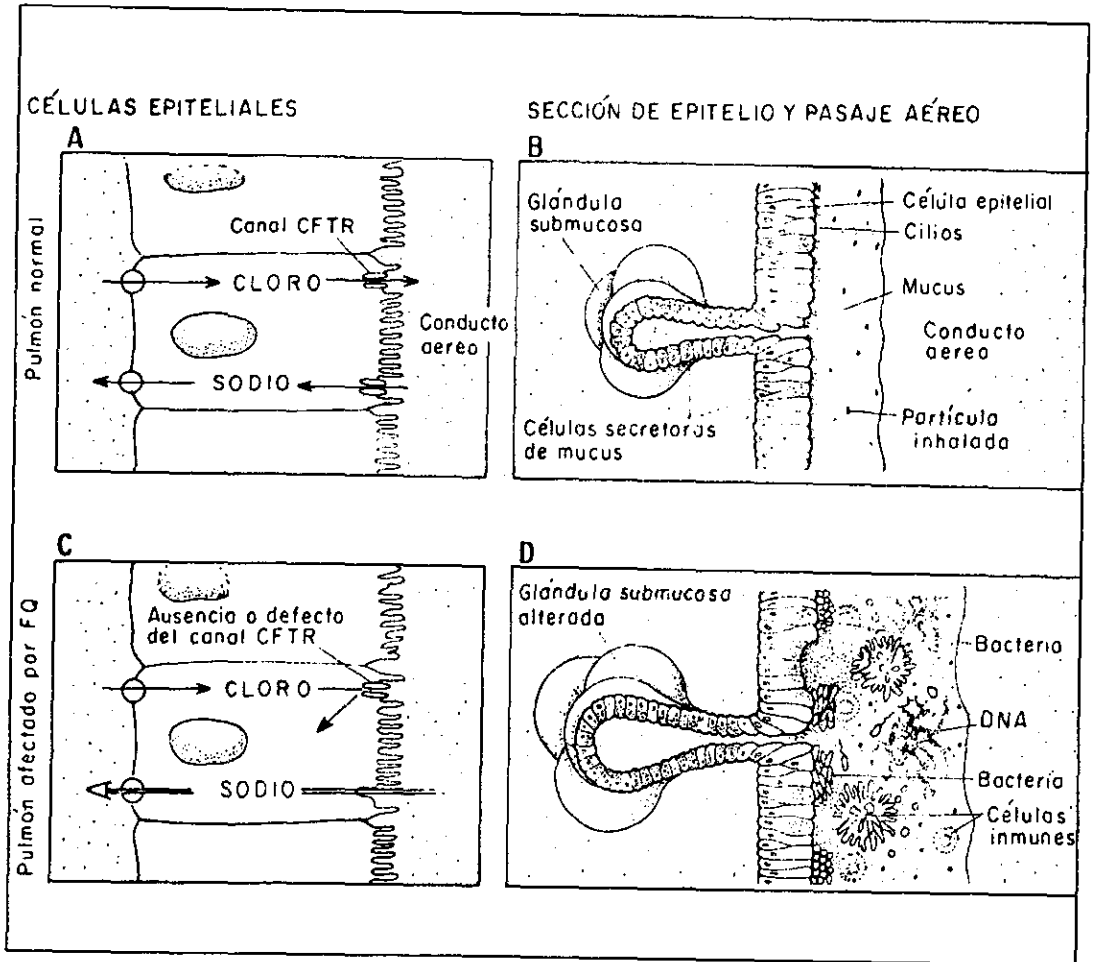


Figura 2. Bases moleculares de la afección pulmonar en pacientes FQ. A) Células epiteliales pulmonares de individuos sanos. B) Epitelio pulmonar sano. La presencia del canal CFTR permite una mucosidad poco viscosa, la cual es fácilmente eliminada de las vías respiratorias, junto con partículas inhaladas. C) Células epiteliales de pacientes con FQ. D) Epitelio pulmonar FQ. La ausencia del canal CFTR produce un moco muy viscoso, el cual es difícil de eliminar de las vías respiratorias, congestionándolas. (Welsh *et al*, 1995b)

El cuadro clínico más usual es tos persistente, infecciones respiratorias crónicas, mal absorción intestinal, esteatorrea, desnutrición y elevación de cloruros en sudor. Los síntomas pueden aparecer desde el nacimiento. Las alteraciones patológicas y las manifestaciones más importantes son las siguientes:

1. Sistema respiratorio.

El factor desencadenante de las alteraciones de las vías respiratorias es la secreción de un moco viscoso con mayor capacidad de adherencia, que se acumula repetidamente en el lumen de estas vías y propicia un proceso inflamatorio localizado. Posteriormente, se presenta infección con cepas mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Staphylococcus aureus*. No se han documentado alteraciones de la respuesta inmunológica en los pacientes con FQ que expliquen una mayor predisposición a los cuadros infecciosos. Los procesos inflamatorios infecciosos y destructivos están localizados en las vías de conducción (Tomashefski *et al*, 1985).

2. Sistema digestivo.

Las alteraciones en este sistema comprometen al tracto gastrointestinal y las glándulas anexas. Aunque son frecuentes, generalmente no amenazan la vida del paciente, puesto que el compromiso del tracto digestivo no es muy grave. En contraste, el páncreas y el hígado muestran alteraciones importantes.

El 85% de los pacientes presentan insuficiencia pancreática causada por obstrucción progresiva de los ductos, lo cual dilata a los acinos y produce una destrucción de la porción exócrina y finalmente de todo el órgano, con extensas áreas de reemplazo por tejido fibroso y graso, con quistes pequeños y leves alteraciones inflamatorias (di Sant' Agnese *et al*, 1984). La insuficiencia pancreática es la causa de la mala absorción intestinal, la desnutrición y los cuadros carenciales de vitaminas A y D (Mischler *et al*, 1979; Friedman *et al*, 1985), K (Tortenson *et al*, 1970), así como de otras moléculas esenciales como el zinc (Hansen *et al*, 1983). Estas deficiencias pueden corregirse con la administración de enzimas pancreáticas o con la administración directa

del nutriente requerido (Hansen *et al*, 1983). Se ha visto también una mayor afección en la función endócrina del páncreas a partir de la segunda década de la vida en el 27 al 42% de los pacientes por alteraciones en los islotes de Langerhans (Handwerger *et al*, 1969).

El ileo meconial se observa en 5 al 10% de los recién nacidos con FQ, y es causado por una obstrucción intestinal distal de material muco-fecaloides viscoso, que se acumula probablemente por insuficiencia enzimática temprana (di Sant'Agnes *et al*, 1984).

3. Tracto genitourinario

Se ha encontrado que el 95% de los varones con FQ, presentan alteraciones de las estructuras wolffianas, como atrofia de conductos deferentes, epidídimo y vesículas seminales, o ausencia bilateral de los vasos deferentes, probablemente debido a cambios degenerativos ocasionados por obstrucción de estos conductos desde la vida intrauterina (Landing *et al*, 1969; Taussing *et al*, 1972; Kaplan *et al*, 1968; Valman *et al*, 1969). En las mujeres, la infertilidad es menos frecuente y generalmente se atribuye a alteraciones en el moco cervical (Shwachman *et al*, 1977).

4. Glándulas sudoríparas

El signo más consistente de la FQ son las elevadas concentraciones de cloro, sodio y potasio en la secreción de las glándulas sudoríparas, que pueden ser medidas por el iontoforómetro después de la estimulación con pilocarpina. Como se mencionó previamente, esta particularidad se utiliza primordialmente para el diagnóstico de la enfermedad. Esta alteración se debe a una falla en la reabsorción de cloro en los ductos de las glándulas sudoríparas (Fig. 3) (Munger *et al*, 1961) y puede ser riesgosa en casos de pérdida excesiva de sales, al ocasionar alcalosis hipoclorémica e hiponatémica, debido por ejemplo, a pérdida excesiva de sal, por vómito o diarrea, o por exposición prolongada al sol (Nussbaum *et al*, 1979).

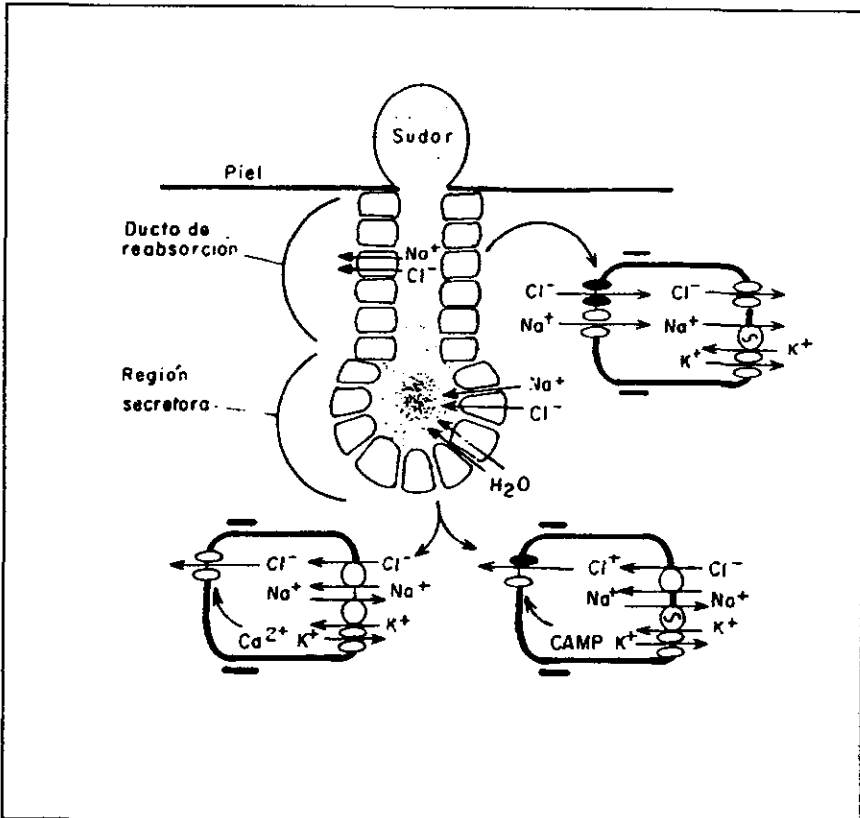


Figura 3. Representación esquemática de la producción de sudor y del transporte de electrolitos en una glándula sudorípara normal. Se muestra el mecanismo celular del transporte de electrolitos en las células epiteliales del ducto y del tallo de la glándula sudorípara. Note que el transporte de cloro dependiente de AMPc y de calcio, parece ocurrir por dos tipos diferentes de células del tallo. El canal de cloro defectuoso en FQ se encuentra señalado. (Welsh *et al.*, 1995a)

Estructura del gen

El gen asociado a la FQ se clonó mediante las estrategias de caminata y salto cromosómico, a partir de marcadores genómicos ligados al gen (Kerem *et al*, 1989; Riordan *et al*, 1989; Rommens *et al*, 1989). Después de la clonación del gen FQ se analizó la secuencia completa, se dedujo la secuencia de la estructura de su producto y se caracterizaron algunas mutaciones responsables de la enfermedad (Zielinsky *et al*, 1991).

El gen FQ, localizado en la banda q31 del cromosoma 7 (Fig. 4), mide aproximadamente 250 Kb y consta de 27 exones (Fig. 5) (Zielinsky *et al* 1991; Rommens *et al*, 1989). El gen codifica para un RNAm de 6.5 Kb detectable por Northern blot en una gran variedad de tejidos, especialmente en los afectados en la FQ como pulmón, páncreas, glándulas sudoríparas, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales y colon (Riordan *et al*, 1989). El transcrito del gen también se ha detectado por RT-PCR en células no epiteliales, incluyendo linfoblastos transformados por el virus de Epstein-Barr (Yoshimura *et al*, 1990; McDonald *et al*, 1992). El polipéptido codificado es una proteína de 1,480 aminoácidos que contiene varios dominios estructurales y funcionales, y dos sitios de glicosilación (Hyde *et al*, 1990; Welsh *et al*, 1995a). Esta proteína se denomina reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ (CFTR), dado su papel fisiológico (Cliff *et al*, 1992).

Aunque aún no está completamente definida la función de la CFTR, se ha demostrado en líneas celulares eucarióticas, que es un canal de cloro dependiente de AMPc, y que directa o indirectamente es un regulador de canales endógenos crípticos para el cloro (Cliff *et al*, 1992; Gregory *et al*, 1990).

Se han descrito sitios de iniciación de la transcripción adicionales, y diferentes patrones de "splicing" para la región 5' del gen FQ (Chou *et al*, 1991). En el análisis de células CACO-2 se detectaron transcritos alternativos que contenían dos exones adicionales (1a y 1b), cuyo sitio de iniciación se encontró hacia la región 5' del exón 1 (Koh *et al*, 1993; Tsui L-C, 1991). Se ha encontrado CFTR funcional en células transfectadas con DNA del gen FQ sin el extremo 5' de la región codificadora (Flotte *et*

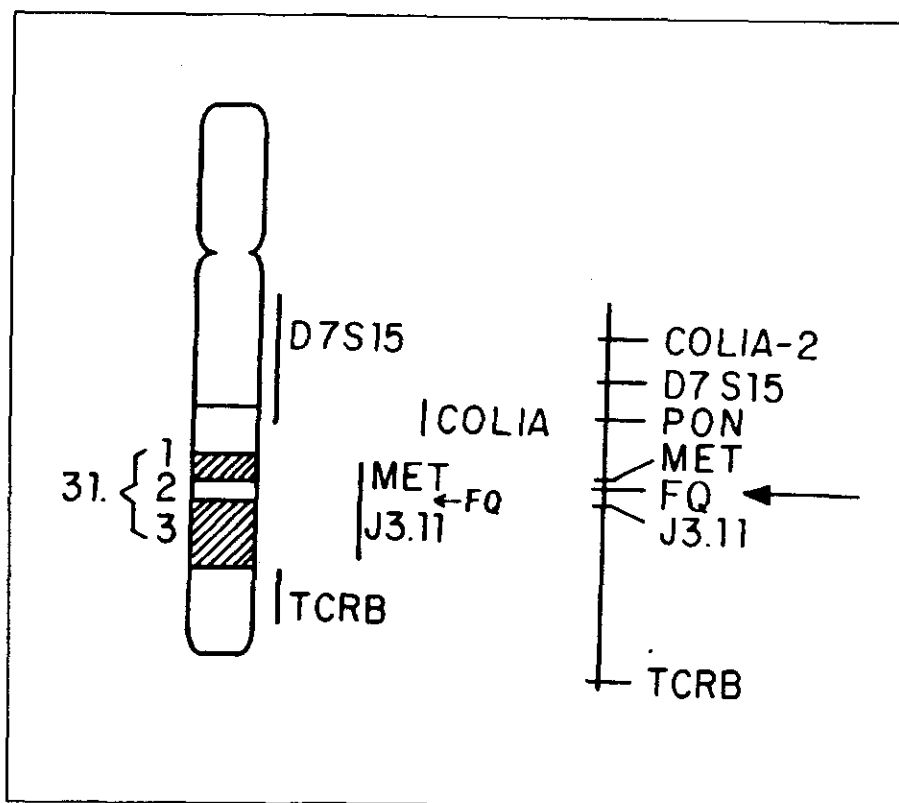


Figura 4. Localización del gen de la FQ en el cromosoma 7.

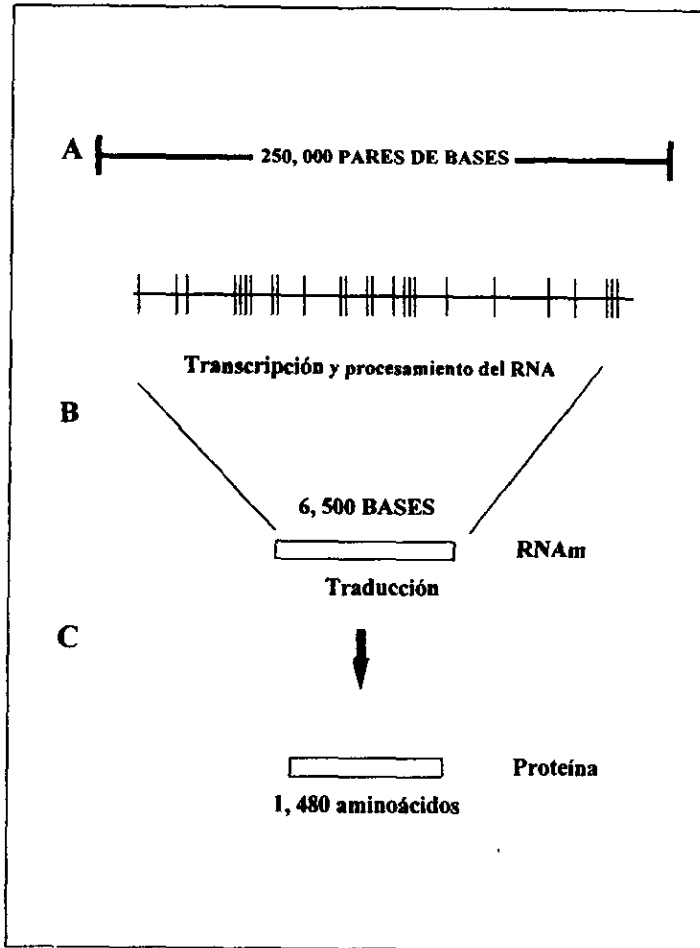


Figura 5. Gen FQ. A) Tamaño del gen FQ. Las barras verticales señalan cada uno de los exones. B) RNAm del gen FQ. C) Proteína CFTR.

al, 1993). Sin embargo, está claro que mutaciones en cualquiera de estos exones alternativos pueden ser las responsables de la enfermedad, como ha sido comprobado en varios pacientes.

Análisis del promotor CFTR.

Existen escasos reportes sobre el mecanismo de regulación del gen FQ y la caracterización de su promotor (Riordan *et al*, 1989; Koh *et al*, 1993; Chou *et al*, 1991), sin embargo, se ha demostrado que tiene una secuencia promotora tipo "housekeeping". Esta región promotora es muy rica en GC y carece de caja TATA (Yoshimura *et al*, 1991).

Splicing alternativo de transcritos del gen CFTR.

Se han observado varios sitios de splicing alternativo en transcritos del gen FQ, tanto en individuos normales como en pacientes con FQ, que involucra principalmente a los exones 4, 9 y 12. La transcripción de estos sitios de splicing alternativos, generan transcritos más cortos, pero que conservan el marco de lectura. Los productos obtenidos por splicing alternativo son escasos y su significado biológico no está claro (Hull *et al*, 1994; Bremer *et al*, 1992; Strong *et al*, 1990; Chu *et al*, 1992; Chu *et al*, 1991).

Proteína CFTR

La proteína CFTR pertenece a la superfamilia de las proteínas ABC (ATP Binding Casette; Módulos de unión a ATP), ya que contiene dominios de unión a nucleótidos como las proteínas de este grupo (Riordan *et al*, 1991; Hyde *et al*, 1990) (Fig. 6). Estas proteínas tienen dos dominios de unión a ATP (NBD1 Y NBD2) y dos dominios transmembranales hidrofóbicos, cada uno formado por 12 segmentos transmembranales (TM1-TM12) (Fig. 7). La proteína CFTR tiene un dominio único dentro de las proteínas de este grupo denominado dominio R, que une a las dos mitades del polipéptido (Riordan *et al*, 1989). La proteína CFTR también difiere de otras proteínas clasificadas como ABC, que son principalmente transportadoras, en que

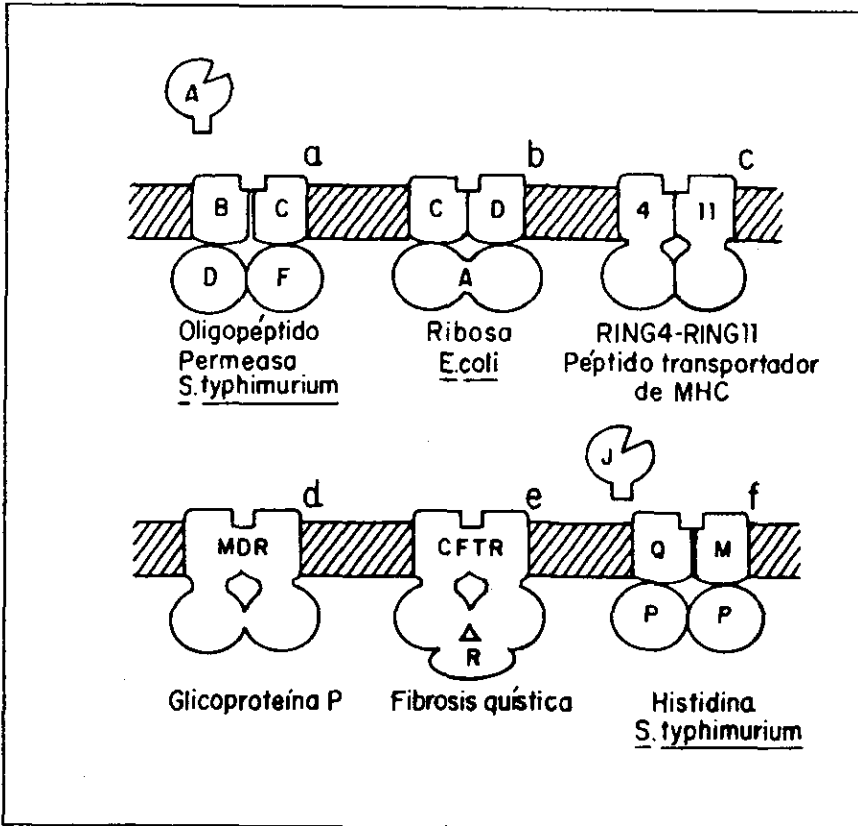


Figura 6. Productos proteicos de algunos genes de la superfamilia ABC.
(Dodge *et al.*, 1993)

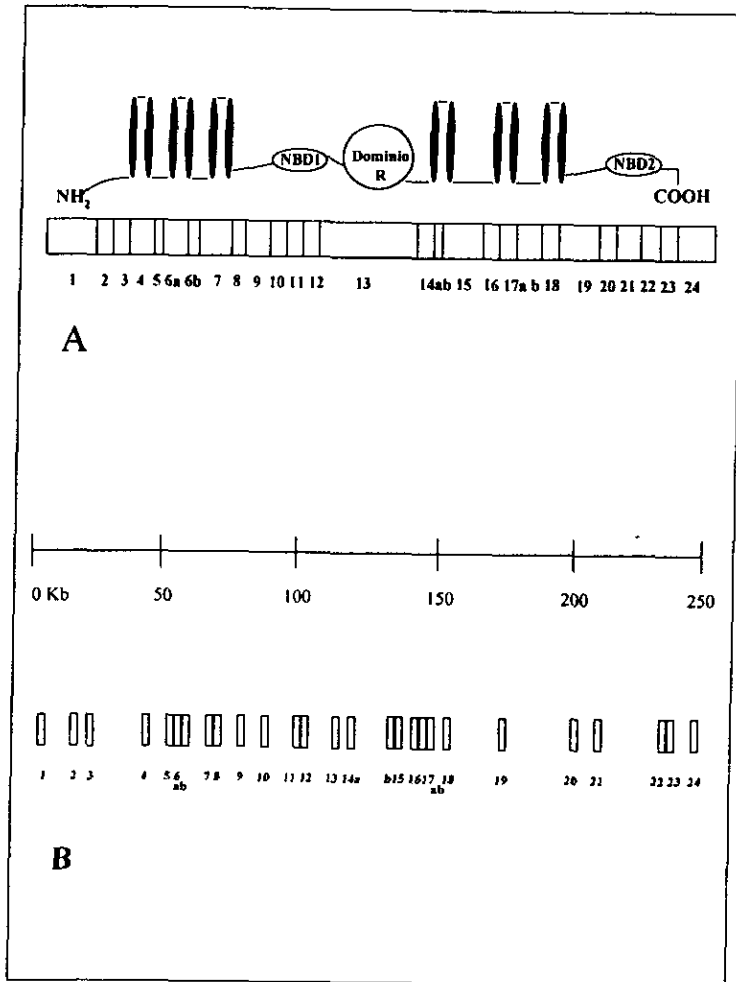


Figura 7. Estructura de la proteína CFTR. A) Dominios proteicos que conforman a la proteína y los exones que codifican a cada uno de ellos. Las barras oscuras señalan a los dominios transmembranales (TM1-TM12). B) Mapa físico del gen FQ.

constituye un canal de cloro de baja conductancia en las membranas apicales de las células epiteliales (Anderson *et al*, 1991; Trezis *et al*, 1991; Gregory *et al*, 1990).

Dominio transmembranal.

Se cree que la proteína CFTR está anclada en la membrana citoplasmática por 12 segmentos hidrofóbicos (TM1-TM12) organizados en dos dominios transmembranales (Oblat-Montal *et al*, 1994) (fig. 7A). Los doce segmentos atraviesan la membrana y forman un poro que constituye el canal de cloro de CFTR (Fig. 8). Los resultados de diferentes estudios han implicado a TM1 (Sheppard *et al*, 1993), TM2 (Oblat-Montal *et al*, 1994), TM6 y TM12 (Madonough *et al*, 1994) como partes importantes en la formación del poro (Oblat-Montal *et al*, 1994). También se ha demostrado que CFTR es un canal multi-iónico con base en los efectos producidos por algunas sustituciones de aminoácidos encontradas en pacientes con FQ (Tabcharini *et al*, 1994). Se ha visto que varios residuos de arginina parecen ser particularmente importantes para la conducción de iones (Sheppard *et al*, 1993). Por otra parte, se ha propuesto la posible interacción del ion cloro con las regiones ricas en treonina y serina de los segmentos TM6 y TM12 de la proteína, a través de grupos hidroxilados (McDonough *et al*, 1994). Los modelos actuales de la proteína predicen la existencia de 6 asas extracelulares y 4 asas citoplasmáticas entre los segmentos transmembranales del polipéptido (Fig. 7). Existen dos sitios de glicosilación en los dos residuos de arginina (N894 y N900) identificados en la cuarta asa extracelular (Cheng *et al*, 1990; Gregory *et al*, 1991).

Dominios NBD.

Los dominios de unión a nucleótidos (NBD) tienen secuencias que se encuentran conservadas en las proteínas de unión a ATP (Riordan *et al*, 1989). La secuencia del gen que codifica para el dominio NBD1 abarca del exón 9 al exón 12 (aa F434-I586) y el que codifica para el NBD2 abarca del exón 19 al 23 (aa Y1219-R1386) (Riordan *et al*, 1989) (Fig. 7). Ambos dominios se unen e hidrolizan el ATP necesario para la fosforilación del dominio R mediada por AMPc (Anderson *et al*, 1991; Carson *et al*,

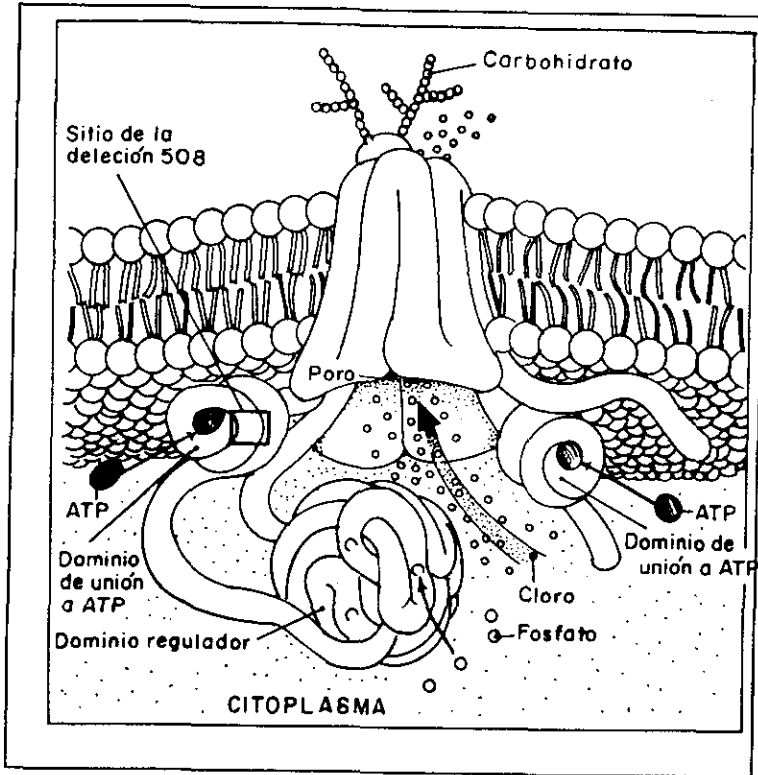


Figura 8. Conformación tridimensional de la proteína CFTR en la membrana celular. (Welsh *et al*, 1995b)

1993; Hartman *et al*, 1992; Levesque *et al*, 1992; Nagel *et al*, 1992). Los aminoácidos del dominio NBD2 que participan en la unión al ATP parecen ser L1260-W1272, N1303-E1321 y posiblemente L1335-S1347 (Hiestad *et al*, 1994). No existe gran similitud entre las estructuras primarias de los dos dominios NBD, ya que presentan sólo el 29% de homología entre sus aminoácidos. Así mismo, estudios funcionales han mostrado que NBD1 y NBD2 no contribuyen a la regulación del canal de la misma manera (Carson *et al*, 1995). Se ha propuesto que la fosforilación de NBD1 se realiza después de una fosforilación parcial del dominio R, lo cual permite la apertura del canal, mientras que, la fosforilación completa del dominio R conduce a la fosforilación de NBD2, que provoca el cierre del canal (Rich *et al*, 1993).

El dominio R.

El dominio R es exclusivo de la proteína CFTR y también es conocido con el nombre de dominio regulador. Está codificado por el exón 13 del gen y se localiza del lado citoplasmático de la membrana apical (Riordan *et al*, 1989) (Fig. 8). Este dominio tiene una alta proporción de aminoácidos polares (30%), y varios sitios de fosforilación que parecen ser importantes para la función del canal (Piccioto *et al*, 1992; Cheng *et al*, 1991). De esta manera, el grado de fosforilación de los diferentes sitios del dominio R puede tener un efecto estimulador o inhibitorio sobre la actividad del canal (Wilkinson *et al*, 1994). Al parecer, el dominio R cambia su conformación al ser fosforilado por la proteína cinasa A, lo que regula la actividad del canal (Dulhanty *et al*, 1994).

Mutaciones en el gen FQ

La mutación más comúnmente encontrada en pacientes con FQ es una deleción de tres pares de bases, que elimina el codón para la fenilalanina en la posición 508 de la proteína CFTR ($\Delta F508$; Fig. 9) (Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium, 1994). Sin embargo, existen cerca de 750 mutaciones diferentes reportadas por el Consorcio Internacional de la Fibrosis Quística (1994).

<u>NORMAL</u>		<u>$\Delta F508$</u>	
<u>Aminoácidos</u>	<u>Secuencia DNA</u>	<u>Aminoácidos</u>	
Ile 507	[A T C]	[A T DELECIÓN T]	Ile 507
Phe 508	[T T T]	[T T T]	
Gly 509	[G G T]	[G G T]	Gly 508

Figura 9. Esquema de la mutación $\Delta F508$. Se presentan un alelo $\Delta F508$. En el alelo normal el codón 508 (CTT) codifica para la fenilalanina, en el alelo mutante este codón se pierde.

$\Delta F508$: la mutación más importante en FQ.

Un estudio mundial que involucró el análisis de 43,849 alelos mutantes de FQ, mostró la presencia de la mutación $\Delta F508$ en 66% de los cromosomas FQ (Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium, 1994). La frecuencia de esta mutación varía ampliamente entre los diferentes grupos étnicos y tiene una distribución geográfica particular (Romeo *et al*, 1990; Tsui L-C, 1992) (Fig. 10). Las frecuencias reportadas de esta mutación varían desde el 30% en los judíos askhenazi (Soshani *et al*, 1992) hasta el 88% en la población danesa (Schwartz *et al*, 1990) (Fig. 10). En Europa, la distribución geográfica de la $\Delta F508$ sigue un gradiente, y su frecuencia aumenta de Sureste a Noroeste (European Working Group in Cystic Fibrosis, 1990). Con base en el análisis de haplotipos se cree que esta mutación apareció en el periodo Paleolítico, al mismo tiempo que ocurrieron las migraciones de los primeros pobladores del Medio Oriente al Noroeste de Europa (Casals *et al*, 1992; De Braekeler *et al*, 1992). Los estudios más recientes de marcadores intragénicos en una amplia muestra de cromosomas FQ europeos condujeron a las siguientes especulaciones acerca de la distribución geográfica, evolución y antigüedad de esta mutación (Morral *et al*, 1994): 1) la mutación $\Delta F508$ se originó hace aproximadamente 10,000 años en un cromosoma con el haplotipo 23-31-13, en una población genéticamente distinta a la población europea actual; 2) Este haplotipo ancestral que portaba la $\Delta F508$ evolucionó a los 4 principales haplotipos encontrados en la población europea, que son: 23-13-13, 17-31-13 y 23-32-13; 3) el gradiente actual de la frecuencia de la $\Delta F508$ en Europa fue generado por una serie de expansiones poblacionales en diferentes periodos históricos desde el Paleolítico; 4) existen dos grupos de poblaciones europeas con la mutación $\Delta F508$ que son genéticamente distintas y que están representadas por dos haplotipos diferentes: el 23-31/32-13 (Islas Británicas y el Mediterraneo) y el 17-31/32-13 (Norte de Europa Central). La expansión de la última población y su interacción con poblaciones asiáticas son probablemente responsables de la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en el Norte de Europa y de su distribución en gradiente en el resto del Continente (Casals *et al*, 1993).

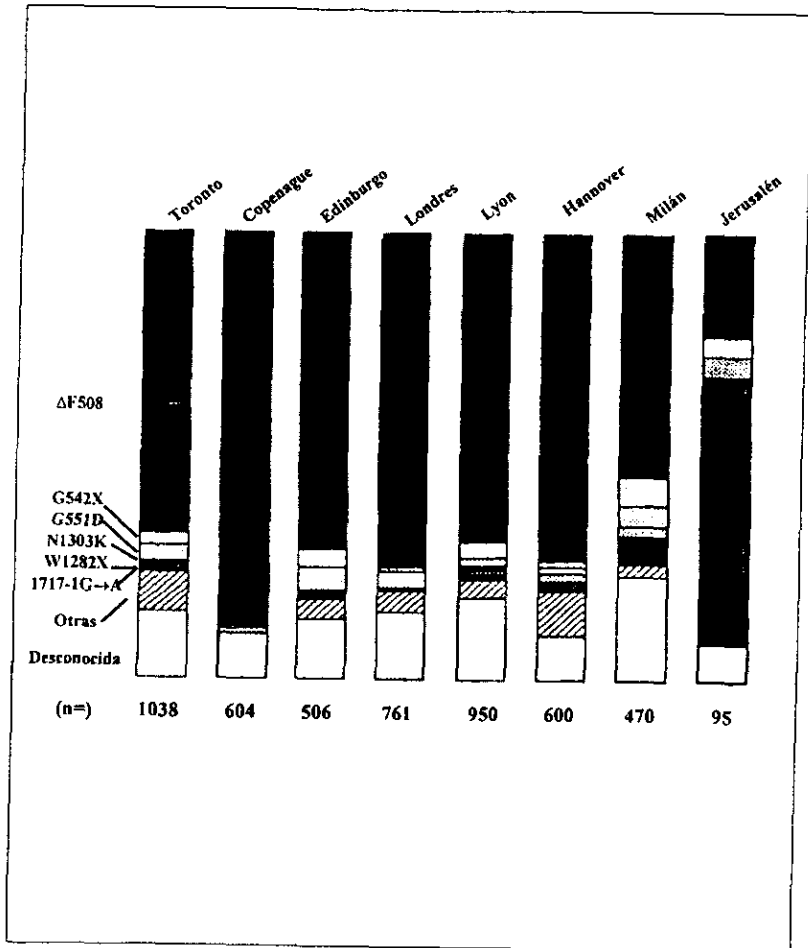


Figura 10. Distribución geográfica de las mutaciones FQ. Se representa la distribución de seis de las mutaciones más frecuentes y las regiones del mundo donde predomina cada una de éstas.

Otras mutaciones del gen FQ.

La mayoría de las casi 750 mutaciones que afectan al gen FQ son poco comunes. Aún la segunda mutación más frecuente a nivel mundial (G542X) se encuentra en tan sólo el 3.4% de los cromosomas FQ. En la Tabla 1 se muestra una lista de mutaciones del gen FQ relativamente frecuentes (Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium, 1994). Por otra parte, cerca de 100 alteraciones en la secuencia del gen FQ han sido definidas como variaciones benignas o polimorfismos (Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium, 1994).

Las mutaciones descritas en el gen FQ son de diferente naturaleza (Fig. 11): cerca del 50% de las mutaciones reportadas son de sentido erróneo, aunque también se encuentran mutaciones sin sentido, deleciones o inserciones pequeñas que alteran el marco de lectura y mutaciones que afectan la maduración normal del RNAm (Tsui L-C, 1992). Además, se han descrito deleciones de un solo aminoácido, dos grandes deleciones que no alteran el marco de lectura (Jarvi *et al*, 1993) y deleciones complejas que abarcan los exones 4-7 y 11-18 (Morrall *et al*, 1993). Se han encontrado otras alteraciones en la región aledaña al extremo 5' del gen (Cutting *et al*, 1992; Zielensky *et al*, 1991), algunas de ellas parecen involucrar secuencias reguladoras importantes para la actividad del promotor (T.C. Suen y L.C. Tsui, comunicación personal).

La distribución de mutaciones en el gen FQ no parece ser al azar (Fig. 12), ya que se han localizado regiones del gen donde la incidencia de mutaciones es mayor, por ejemplo en los exones 10 y 11 (Fig. 12). Se ha detectado una alta densidad de mutaciones, particularmente del tipo de alteraciones de sentido erróneo en ciertos exones como el 4, 7, 11, 20 y 17b (Mercier *et al*, 1994). Entre las mutaciones de sentido erróneo la distribución de alelos "graves" y "leves" (ver sección de correlación genotipo-fenotipo) también parece tener relación con ciertos exones; por ejemplo, existe un grupo de 10 mutaciones leves en el exón 7 en la región que codifica para TM6 y una alta concentración de alelos graves en el exón 11, que codifica parte de NBD1 (Riordan *et al*, 1989). El grado de tolerancia a la substitución de aminoácidos puede depender de la estructura y función de los dominios correspondientes en el canal de cloro CFTR.

Tabla 1. Mutaciones de alta frecuencia a nivel mundial del gen FQ.

Mutaciones	Frecuencia %	Localización (exón)	Cambio de nucleótido	Dominio proteico
ΔF508	66.0	10	Delección de 3 pb entre 1652 y 1655	NBD1
G542X	3.4	11	G→T en la posición 1756	NBD1
G551D	1.6	11	G→A en la posición 1784	NBD1
N1303K	1.3	21	C→En la posición 4041	NBD2
W1282X	1.2	20	G→ en la posición 4005	NBD2

Datos obtenidos en Welsh et al, 1995a.

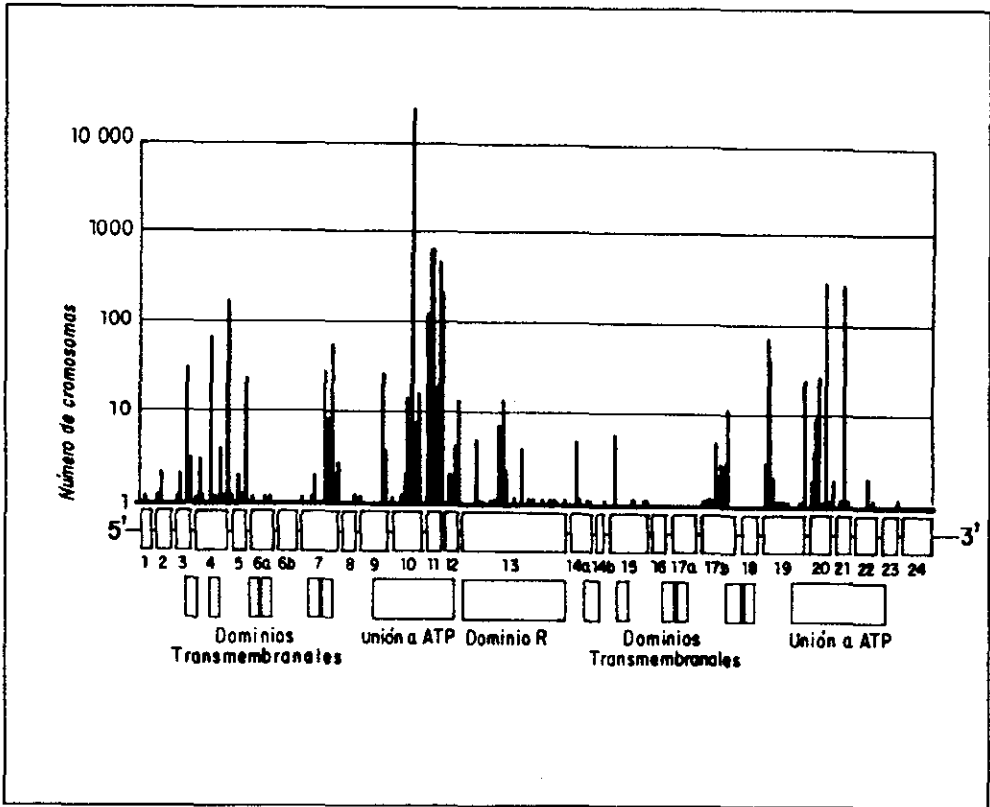


Figura 12. Distribución en las secuencias génica y proteica de los sitios con mayor incidencia de mutaciones en pacientes FQ. (Tsui, 1992)

Más aún, varios codones o nucleótidos del gen FQ parecen ser altamente susceptibles a sufrir mutaciones, como en la posición 347, en el cual se ha descrito cuatro diferentes mutaciones (Kerem et al, 1990). Las mutaciones del codón 347 parecen estar relacionadas con la presencia de dinucleótidos CpG, los cuales son relativamente más susceptibles a sufrir mutación que otras secuencias (Cooper et al, 1995).

Análisis de Haplotipos y mutaciones recurrentes

Estudios extensos de identificación de marcadores dentro y fuera del gen FQ, revelaron que la mayoría de las mutaciones en FQ están asociadas con haplotipos únicos, lo que sugiere que éstas se derivaron de un mismo evento mutacional (Morral et al, 1993;). Sin embargo, algunas mutaciones (R117H, H199Y, R334W, R347P, R553X, L558S, 3272-26A-G, 3849+10kbC y R1162X) se encuentran asociadas con 2 ó 3 haplotipos, incluso algunas de estas se han detectado en diferentes grupos raciales o étnicos (Dork et al, 1994; Morral et al, 1994b), por lo que probablemente representen mutaciones recurrentes que surgieron independientemente. Muchas de éstas, corresponden a sustituciones nucleotídicas que involucran dinucleótidos CpG, de hecho la única mutación *de novo* reportada, ocurrió en el dinucleótido CpG que convierte un codón para arginina en un codón de terminación en la posición 851 (R851X) (White et al, 1991).

Debido a que algunos de los marcadores intragénicos de DNA microsatélite (poliformismos de repeticiones dinucleotídicas) tienden a mutar con una frecuencia relativamente alta, estos pueden ser utilizados para estimar la antigüedad de las mutaciones. Por ejemplo, se ha encontrado que un mismo marcador de DNA microsatélite está asociado con las mutaciones Δ F508, G542X y N1303K. Los análisis de haplotipos marcadores apoyan fuertemente un origen único para cada una de éstas mutaciones (Morral et al, 1993).

Bases moleculares de la disfunción del canal de cloro CFTR

Aunque se considera que cualquier mutación que altera la función de la proteína CFTR por definición causa FQ, no está claro si las mutaciones tienen otra consecuencia primaria además de la falla en la conducción del cloro. Varios estudios han demostrado la posible participación de la CFTR en la regulación de otros canales de cloro (Egan *et al*, 1992), en la reabsorción de sodio (Boucher *et al*, 1986) y en la sulfatación (Boat *et al*, 1978). Desafortunadamente, se conoce poco acerca de otras posibles funciones de la CFTR, ya que la mayoría de los estudios moleculares y electrofisiológicos solamente se han basado en el análisis de la proteína y en la función de la CFTR como un canal de cloro de baja conductancia. Por lo tanto, aunque es posible clasificar a las mutaciones CFTR en cinco clases generales de acuerdo a la manera en que afectan la proteína (Fig. 13) (Tabla 2), no se han podido dilucidar por completo las implicaciones funcionales en todos los casos (Welsh *et al*, 1993). Con base en lo anterior, las clases de mutaciones son las siguientes:

CLASE I: Mutaciones que afectan la biosíntesis de la proteína.

Se puede asumir que cerca de la mitad de las mutaciones en el gen FQ evitan la formación de un polipéptido CFTR de tamaño normal. Entre estas mutaciones se encuentran: mutaciones sin sentido (18%), corrimiento del marco de lectura (22%), o procesamiento aberrante del RNAm (8%). En el caso de varias mutaciones sin sentido y mutaciones que generan un corrimiento en el marco de lectura, se ha observado una disminución en el nivel del transcrito del RNAm correspondiente; sin embargo, aún no está claro si estos transcritos sintetizan polipéptidos (Hamosh *et al*, 1992a; Smith *et al*, 1993; Will *et al*, 1993; Will *et al*, 1995).

CLASE II: Mutaciones que afectan la maduración de la proteína.

Ya que la biosíntesis de la CFTR requiere pasos de maduración complejos (Ward *et al*, 1994), no es difícil imaginar que algunas mutaciones en el gen FQ puedan

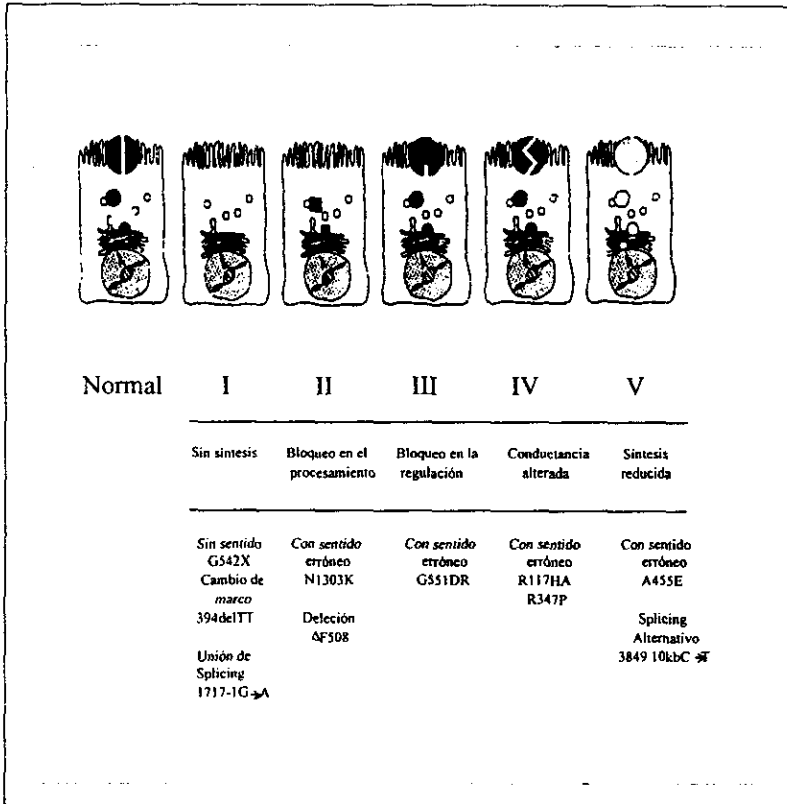


Figura 13. Clasificación de las mutaciones causantes de la FQ, de acuerdo con su efecto en la proteína CFTR

Tabla 2. Clases de mutaciones que causan FQ.

Clase	Defecto	Ejemplos	Dominio proteico	Frecuencia %	Estado pancreático
I	Síntesis proteica	G542X	NBD1	3.4	IP
II	Procesamiento	Δ I507	NBD1	0.5	IP
		Δ F508	NBD1	67.2	IP
		N1303K	NBD2	1.8	IP
III	Regulación	G551D G1244E	NBD1 NBD2	2.4 --	IP IP
		G551S	NBD1	---	SP
		S1255P	NBD2	---	SP
IV	Conducción	R117H R334W	TM1 TM1	0.8 0.4	SP SP
		R347P	TM1	0.5	SP
		V	Reducción de la síntesis proteica	P574H	NBD1
A455E	NBD1			--	SP

Datos obtenidos en Welsh *et al*, 1995a

IP. Insuficiencia pancreática.

SP. Suficiencia pancreática

causar un bloqueo en el procesamiento de la proteína, y por lo tanto la ausencia de un canal CFTR en las membranas apicales de las células epiteliales. Un ejemplo de este mal procesamiento es la mutación $\Delta F508$. La proteína $\Delta F508$ no llega a la membrana de células epiteliales, dada su conformación tridimensional anormal (Cheng *et al*, 1990; Gregory *et al* 1991). Esta falla le impide obtener una conformación madura resistente a proteasas, en un proceso dependiente de ATP en el retículo endoplásmico (RE) por lo que es degradada rápidamente (vida media de 0.5 hrs) en un compartimento previo al aparato de Golgi (Lukacs *et al*, 1994; Thomas *et al*, 1992).

Es interesante el hecho que la retención de la proteína $\Delta F508$ en un compartimento pre-Golgi es reversible a temperaturas subfisiológicas (23°-30°C). Bajo estas condiciones, la proteína $\Delta F508$ puede pasar del RE al aparato de Golgi, ser glicosilada, y alcanzar la membrana citoplasmática (Denning *et al*, 1992). Una vez en la membrana, la proteína mutante funciona adecuadamente como un canal de cloro (Dalemans *et al*, 1991; Denning *et al*, 1992; Drumm *et al*, 1991). Ya que la mutación $\Delta F508$ está presente en el 90% de los pacientes FQ (en forma homocigota o heterocigota), la última observación provee posibles caminos para el tratamiento de pacientes con la $\Delta F508$, intentando corregir la maduración de la proteína.

CLASE III: Mutaciones que afectan la regulación del canal de cloro.

Las proteínas mutantes de esta clase son aquellas que se encuentran completamente procesadas y correctamente localizadas en la membrana apical, pero no funcionan adecuadamente como un canal de cloro. El grado de alteración puede variar desde una pérdida grave de la función (G551D), disminución en la respuesta a la estimulación por ATP (S1255P), hasta leve reducción de la actividad del canal (G551S, G1244E y G1349D) (Anderson *et al*, 1992; Drumm *et al*, 1991). Los aminoácidos involucrados en algunas de las mutaciones de esta clase aparentemente coinciden con los aminoácidos involucrados en la unión de ATP (Hiestad *et al*, 1994).

CLASE IV: Mutaciones que afectan la conductancia o la apertura del canal de cloro.

Varias mutaciones localizadas en las regiones correspondientes a algunos de los segmentos TM de la proteína alteran la conductancia o la apertura del canal (Highsmith *et al*, 1994). Ejemplos de mutaciones de este grupo son: la R117H en la región TM2, la G314E en TM5, y la R334W y R347P en TM6. El grado de reducción de la conductividad de algunas proteínas mutantes se ha estudiado *in vitro*. La regulación de los canales de cloro mutantes clase IV por fosforilación dependiente de PKA y ATP intracelular parece ser normal.

CLASE V: Mutaciones que causan reducción en la síntesis de la proteína.

Este grupo incluye mutaciones en el promotor que reducen la transcripción y mutaciones puntuales que conducen a un splicing alternativo del transcrito o a sustituciones de aminoácidos que causan una maduración ineficiente de la proteína. El efecto final de todas estas mutaciones sería la disminución de la síntesis y por lo tanto de la función de la proteína. Actualmente la mayoría de las mutaciones en el gen FQ agrupadas en esta clase son aquellas que generan splicing alternativo (Highsmith *et al*, 1994; Strong *et al*, 1993). Ya que estos alelos pueden transcribir una pequeña cantidad de RNAm normal además del RNAm producto de un splicing aberrante, se espera que la consecuencia funcional sea leve. Varias mutaciones en sentido erróneo (como la P574H y A455E), generan productos con función residual puesto que han sido encontradas en pacientes con suficiencia pancreática o con un cuadro clínico leve (Kristidis *et al*, 1992). Estudios bioquímicos recientes muestran que estas proteínas mutantes son canales de cloro con regulación y conducción normal, sin embargo el procesamiento post-traduccional de las proteínas mutantes es ineficiente (Ostergaard *et al*, 1994).

Correlación genotipo-fenotipo

El cuadro clínico de la FQ es muy heterogéneo. Dado el espectro de las consecuencias moleculares de las mutaciones, se ha intentado establecer una correlación entre los diferentes genotipos y fenotipos. Algunos estudios recientes han tratado de definir características clínicas comunes en pacientes con un mismo genotipo (Cystic

Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993; Hamosh *et al*, 1992b; Kerem *et al*, 1990; Kristidis *et al*, 1992; Soshani *et al*, 1992). De todas las variables analizadas, solamente la función pancreática presentó una correlación directa con el genotipo (Kristidis *et al*, 1992). En general, los pacientes con insuficiencia pancreática (IP) son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones graves (clase I, II, o III), mientras que los pacientes con suficiencia pancreática (SP) presentan al menos una mutación con función residual (clases IV o V) (Tabla 2) (Cleghorn *et al*, 1985). Por otro lado, otros datos clínicos de FQ no se encuentran ligados a un genotipo en particular.

El estudio de la correlación genotipo-fenotipo puede abordarse en dirección opuesta, es decir, se pueden identificar pacientes con manifestaciones clínicas específicas y posteriormente examinar su genotipo. El ejemplo más exitoso de este tipo es la ausencia bilateral de los vasos deferentes y la azoospermia obstructiva secundaria, una característica clínica persistente entre pacientes masculinos con FQ (Kaplan *et al*, 1968, Kerem *et al*, 1994). Una condición autosómica recesiva similar, pero sin manifestaciones aparentes de FQ ha sido denominada ausencia bilateral congénita de los vasos deferentes (CBAVD) (Anguiano *et al*, 1992). Utilizando técnicas de biología molecular se ha encontrado en el 50-64% de los pacientes CBAVD al menos una mutación conocida en el gen CFTR; mientras que el 10% son portadores de dos mutaciones conocidas (Mercier *et al*, 1994; Osborne *et al*, 1994; Patrizio *et al*, 1993; Culard *et al*, 1994).

Alta frecuencia de FQ en la población caucásica

La elevada frecuencia de la mutación $\Delta F508$ puede explicar la incidencia de FQ en la población caucásica, ya que si no existiera esta mutación, la FQ no sería significativamente más frecuente que en otros grupos étnicos (Tsui L-C, 1990). Se han propuesto numerosas teorías e hipótesis para explicar este fenómeno. Algunas de estas son: alta tasa de mutación (Goodman, 1952); múltiples loci (Shaap *et al*, 1976) y deriva génica (Wright *et al*, 1968; Conneally *et al*, 1973). Se ha propuesto también, la existencia de alguna ventaja adaptativa en los heterocigotos $\Delta F508$. Hasta la fecha se

han sugerido las siguientes ventajas adaptativas: fertilidad incrementada (Conneally *et al*, 1973; 1965; Knudson *et al*, 1967; Mayo *et al*, 1970; Pritchard *et al*, 1983; Ten Kate, 1977), compensación reproductiva (Burdick, 1977; Edwards, 1977) y resistencia a algunas enfermedades letales (Meindl, 1987; Romeo *et al*, 1989; Shier, 1979; Stuart *et al*, 1974; Super *et al*, 1979; Cassano, 1985; Crawford, 1972; Hollander, 1987). Varias de estas teorías fueron propuestas antes de conocer la función de la proteína CFTR, por lo cual no están cimentadas en una base experimental rigurosa.

Más recientemente, la disponibilidad de modelos animales para el estudio de las enfermedades ha permitido probar la hipótesis de la ventaja selectiva del heterocigoto en FQ. En un estudio reciente se comparó el efecto de la toxina del cólera en la secreción de líquidos y cloro mediada por la proteína CFTR, en las células de ratones heterocigotos y homocigotos para genes CFTR interrumpidos, así como en animales controles (Gabriel, 1994). Los autores encontraron una reducción en los niveles de secreción de agua y cloruros en el intestino delgado de los ratones mutantes, proporcional a la dosis del gen defectuoso. Si el mismo mecanismo opera en los humanos, la ventaja del heterocigoto sería la de tener protección contra la pérdida letal de líquidos por el intestino, como resultado de las infecciones por la bacteria del cólera. De acuerdo a este trabajo, únicamente las mutaciones de los tipos I y II pueden conferir ventajas adaptativas a los individuos heterocigotos.

Una ventaja selectiva del 2% introducida hace 23 generaciones (en el siglo XVI), sería suficiente para explicar la frecuencia actual de la enfermedad (Knudson, 1967). Un punto débil sobre la teoría de protección contra el cólera es la falta de registros de epidemias de esta enfermedad en Europa, hasta antes de su llegada al continente asiático y su posterior dispersión en Rusia e Inglaterra entre los años 1820-1830. Por otra parte, otras bacterias enterotóxicas (por ejemplo *E. coli* enterotóxica) también son capaces de provocar estimulación por AMPc a través de mecanismos similares a la toxina del cólera (Mann *et al*, 1997). Por último, con base en análisis extensos de haplotipos se ha propuesto la posible existencia de algún factor extragénico que confiera esta ventaja selectiva (Cuppens *et al*, 1993; Macek *et al*, 1994; Morral *et al*, 1993).

JUSTIFICACION

La FQ es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica. Por otro lado, en los países en desarrollo, la sintomatología de esta enfermedad puede ser enmascarada con enfermedades frecuentes en nuestro medio (infecciones respiratorias, gastrointestinales y desnutrición), por lo que es posible que la FQ sea sub-diagnosticada en estos países. En México se desconoce la frecuencia real de la FQ, así como las mutaciones que la causan. El diagnóstico molecular permite una detección temprana, tratamiento oportuno, detección de portadores y el diagnóstico prenatal. Por lo tanto, es necesario conocer las mutaciones responsables de la FQ en México y desarrollar una estrategia para el diagnóstico molecular en pacientes mexicanos.

OBJETIVOS

- Determinar la frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, N1303K, $\Delta I507$, S549N, 1924del7 y 2055del9 \rightarrow A en una muestra de pacientes mexicanos con fibrosis quística.
- Comparar las frecuencias obtenidas en este trabajo con las reportadas en otras poblaciones y analizar la distribución geográfica de estas mutaciones.
- Establecer una estrategia para el estudio molecular de los pacientes mexicanos con fibrosis quística.

MATERIAL Y MÉTODO

Población objetivo

Se incluyeron en el estudio 101 casos índice con diagnóstico de fibrosis quística y sus familiares de primer grado. El diagnóstico se estableció con base en la historia clínica y la determinación de cloruros en sudor (mayor a 60 mEq/L). Los pacientes en quienes no se confirmó el diagnóstico de fibrosis quística fueron excluidos del estudio.

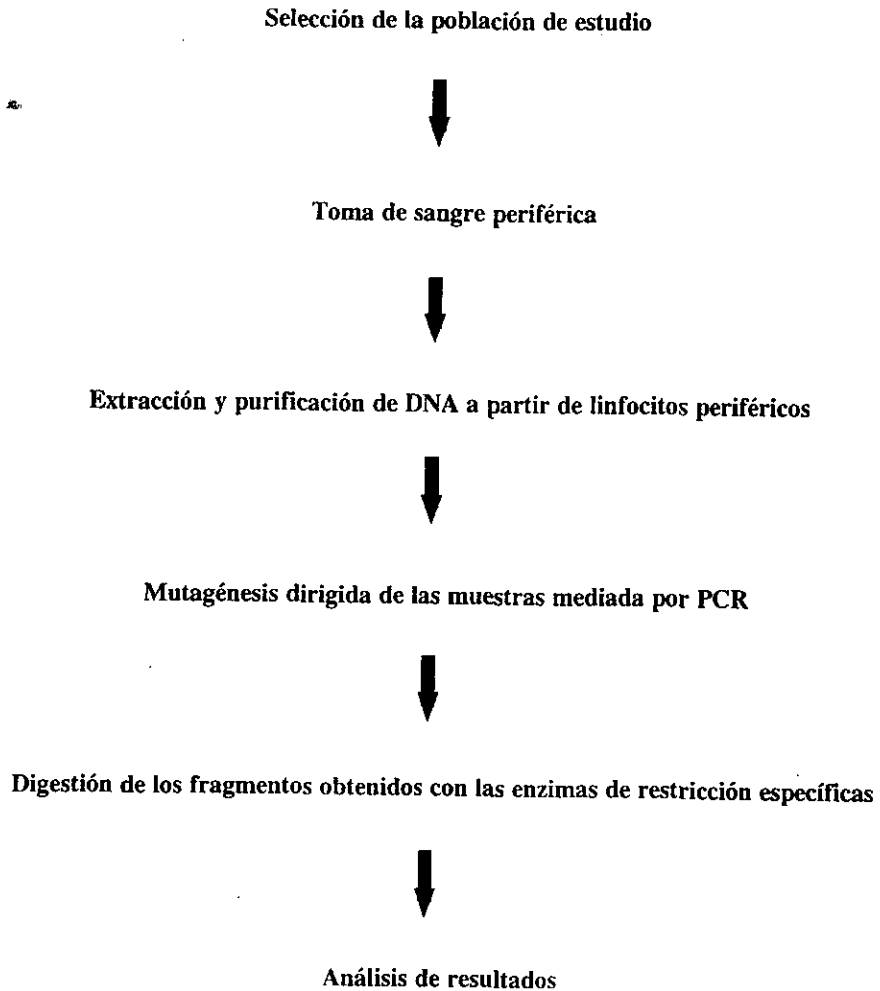
En este trabajo se realizó un tamizaje de las mutaciones: $\Delta F508$, $\Delta I507$, G542X, N1303K, S549N y dos mutaciones descritas por primera vez en la población mexicana como la 1924del7 y 2055del9→A (Orozco et al, 1997). La estrategia empleada fue la búsqueda de dichas mutaciones por mutagénesis dirigida mediada por PCR o PSM (Diagrama de flujo).

Extracción de DNA

El DNA se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica, de acuerdo a los protocolos convencionales (Sombrook et al, 1989).

Inicialmente se recolectó una muestra de 10-15 ml de sangre periférica de los pacientes y de sus familiares de primer grado en tubos de ensaye vacutainer con EDTA al 5%. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3,000 rpm durante 10 min, de donde se obtienen tres fases: la fase inferior compuesta por eritrocitos, la fase intermedia formada por la capa de leucocitos y una fase superior compuesta por el plasma sanguíneo. La capa de leucocitos se recolectó con una pipeta Pasteur y se mezcló con 6.0 ml de amortiguador para la lisis de eritrocitos (BLCR, Apéndice 1) en un tubo de ensaye de 15 ml limpio. La mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se eliminó, permaneciendo en el fondo del

DIAGRAMA DE FLUJO



tubo el botón de leucocitos. Se agregó nuevamente la misma cantidad de BLCR para eliminar los eritrocitos restantes; los tubos se agitaron hasta resuspender el botón, y posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. Este paso se repitió 3 veces, hasta eliminar toda la hemoglobina de las muestras. El botón de leucocitos se resuspendió en 666 μ l de BLCR y posteriormente se le agregó a cada muestra 3 ml de un amortiguador para lisar las células blancas (BLCB, Apéndice 1). Se dejó incubar toda la noche a 42°C para completar la hidrólisis de las células.

Purificación de DNA

El proceso de purificación se realizó en tres pasos: 1) se agregó un volumen de fenol igual al volumen del hidrolizado obtenido en el paso anterior. Las muestras se agitaron durante 10 min, y posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. Después de la centrifugación se forman tres fases, una fase inferior de fenol saturado y amortiguador para lisis de leucocitos, una interfase compuesta por restos celulares (principalmente lípidos y proteínas) y una fase superior, donde se encuentra el DNA en solución acuosa. Esta última fase se pasó a un tubo limpio y el procedimiento se repitió una vez más. 2) Posteriormente se agregó fenol-cloroformo volumen a volumen (1:1), repitiendo este procedimiento dos veces. El cloroformo se utilizó para arrastrar el fenol que pudiese haber quedado en la solución de DNA. 3) En el último paso se utilizó cloroformo-isoamílico 24:1 (Apéndice 1) para arrastrar los restos de fenol que pudieran haber quedado en la solución acuosa.

Precipitación

Para la precipitación del DNA, la fase acuosa obtenida del procedimiento anterior se transfirió a un tubo limpio y se le agregaron 60 μ l de NaCl 1M y dos volúmenes de etanol absoluto a -20 °C. Los tubos se agitaron suavemente hasta que las hebras de DNA se hicieron evidentes. El DNA se extrajo de la solución con una pipeta Pasteur con la punta previamente sellada. Después, el DNA se lavó con etanol

al 70% a -20 °C y se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente ser resuspendido en TE 1X.

Cuantificación del DNA

Después de la extracción del DNA se determinó la concentración de cada muestra y se evaluó su integridad. La concentración del DNA se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 260 nm, y se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ (ng/}\mu\text{l)} = (\text{D.O. a 260 nm}) (\text{dilución}) (\text{factor})$$

En donde:

D.O.: densidad óptica.

Dilución utilizada: 1:250

Factor: 0.05

Posteriormente, se analizó la misma muestra a una D.O. de 240 y 280 nm, para determinar la presencia de contaminantes como fenol y proteínas respectivamente. La relación de contaminantes presentes en las muestras se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{fenol}] = \text{D.O.}_{240}/\text{D.O.}_{260}$$

$$[\text{proteínas}] = \text{D.O.}_{280}/\text{D.O.}_{260}$$

Un resultado mayor de 1.6 significa baja concentración de estos contaminantes, mientras que un resultado menor a 1.6, señala que la cantidad de proteínas y fenol es alta, pudiendo interferir en el procesamiento de las muestras (Sombrook et al, 1989).

Para evaluar la integridad del DNA se corrieron 2 μl de la solución de DNA en un gel de agarosa al 0.7-0.8%, al cual se le agregó bromuro de etidio. La electroforesis

se llevó al cabo durante 45 min a 85 V. Posteriormente, el gel de agarosa se colocó sobre un transiluminador de rayos ultravioleta para observar el DNA. El patrón óptimo de DNA es una banda fluorescente gruesa y bien definida (fig. 14).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se realizó la búsqueda dirigida de cinco mutaciones del gen FQ previamente descritas, así como la de dos mutaciones caracterizadas en nuestro laboratorio (Orozco et al, 1997). De las primeras cinco mutaciones, la $\Delta F508$, G542X y N1303K fueron seleccionadas por ser las mutaciones más frecuentes en la población mundial (Consortio Internacional de Fibrosis Quística, 1994). Las mutaciones $\Delta I507$ y S549N, a pesar de su baja frecuencia en la población mundial, fueron encontradas en por lo menos un paciente mexicano al inicio del trabajo, por lo que se incluyeron en el programa de tamizaje de mutaciones en nuestra población con FQ. Por otro lado las mutaciones 1924del7 y 2055del9→A, fueron caracterizadas en pacientes mexicanos, por lo que se buscaron en todos los pacientes para determinar su frecuencia. Las características de las mutaciones se describen en la tabla 3.

Para amplificar el DNA genómico se mezclaron los reactivos señalados en la tabla 4 en el orden indicado y se sometieron al proceso de amplificación en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp 9600) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 seg, alineación a 55 °C por 20 seg y extensión a 72 °C por 30 seg. Para la extensión final se desnaturalizó a 94 °C por 12 seg, con alineación a 60 °C por 20 seg y extensión por 7 min. Por último, el termociclador se mantuvo a 4 °C en una etapa de almacenamiento.

Las muestras siempre fueron analizadas con un control positivo y un control negativo. El control positivo consistió en una muestra conocida en la que previamente se había identificado la mutación a estudiar. De esta manera, el control positivo fue diferente para cada una de las mutaciones. El control negativo contenía todos los reactivos necesarios para la amplificación, a excepción del templado de DNA. El

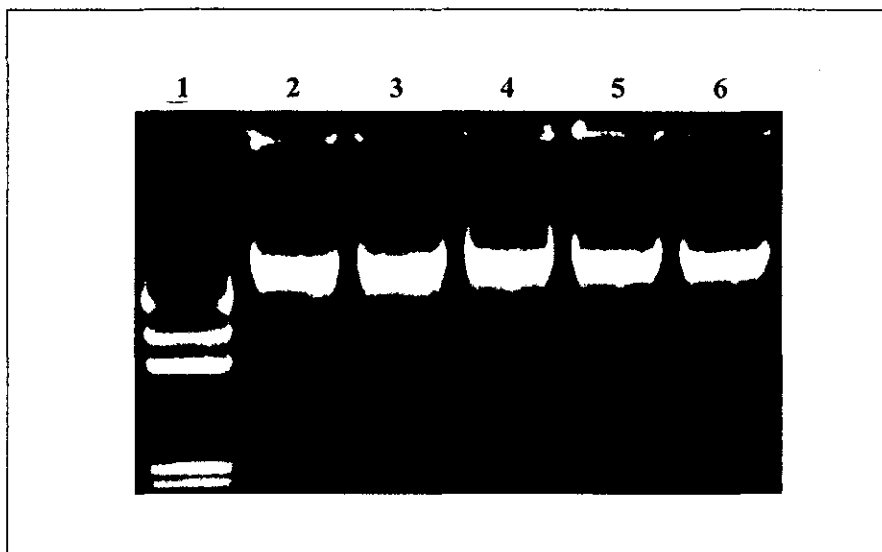


Figura. 14. Integridad de las muestras de DNA analizadas por electroforesis en agarosa al 0.8%. Carril 1: Marcador de pesos moleculares, λ /HindIII; Carriles 2-6: DNA genómico de pacientes FQ.

Tabla 3. Características de las mutaciones analizadas en este trabajo.

Mutación	Localización (exón)	Cambio de Nucleótido	Dominio proteico	Consecuencia
ΔF508	10	Delección de 3 pb entre 1652 y 1655	NBD1	Delección de fenilalanina 508
G542X	11	G→T en la posición 1756	NBD1	Gly →Codón de terminación en el aa 542
N1303K	21	C→G en la posición 4041	NBD2	Asn→Lys en el aa 1303.
ΔI507	10	Delección de 3 pb entre 1648 y 1651	NBD1	Delección de una Ile 506 o Ile 507
S549N	11	G→A en la posición 1778	NBD1	Ser→Asn en el aa 549
1924del7	13	Delección de 7 pb entre la posición 1924 y la 1930	Dominio R	Corrimiento del marco de lectura
2055del9→A	13	Delección de 9 pb en la posición 2055 con la inserción de una A	Dominio R	Corrimiento del marco de lectura

Welsh *et al*, 1995a

Tabla 4. Condiciones de PCR.

Reactivo	Volumen	[Stock]	[Final]
H ₂ O	35.25 μ l		
Buffer Taq	5 μ l	10 X	1 X
ATGC	0.5 μ l	10 mM	1 mM
Primer F	2 μ l	100 ng/ μ l	3.5 ng/ μ l
Primer R	2 μ l	100 ng/ μ l	3.5 ng/ μ l
Taq polimerasa	0.25 μ l	10 U	0.12 U/ μ l
MgCl ₂	4 μ l	2 mM	4 mM
DNA	1 μ g/ml	--	--
Volumen final	50 μ l	--	--

control negativo nos permitió determinar que los productos amplificados por PCR, fueron resultado de la muestra de DNA utilizada, y no de contaminantes en la solución de amplificación.

Una vez concluido el proceso de amplificación por PCR, se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa. Se corrieron 5 μ l del amplificado más 2 μ l de amortiguador de corrida en un gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio a 85 V durante 45 min. Se utilizaron como marcadores de pesos moleculares el "Ladder", ϕ X174 y λ -Hind III. Posteriormente, las bandas de DNA de los amplificados se visualizaron en un transiluminador de rayos ultravioleta. Con ayuda del marcador de pesos se determinó el tamaño de los productos amplificados.

Mutagénesis dirigida mediada por PCR

La técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR se utilizó para detectar las mutaciones Δ F508, G542X, N1303K y Δ I507.

Se introdujo una mutación puntual en la secuencia amplificada a través de un oligonucleótido iniciador, en el cual se generó un cambio de una sola base, que crea o elimina un sitio de restricción en las secuencias amplificadas ya sea en el alelo mutado o en el silvestre. De esta manera, las mutaciones se distinguen en un gel de poliacrilamida después de haber digerido los amplificados con las enzimas de restricción específicas. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación, la mutación introducida y el tamaño de los fragmentos resultantes se ilustran en la tabla 5. Las enzimas de restricción para cada mutación, así como los fragmentos obtenidos de los cortes se muestran en la tabla 6. En la tabla 7 se ilustra la manera en que se detectó la mutación Δ F508 utilizando esta técnica.

Se buscaron estas mutaciones en todos los casos índice, y en los familiares de primer grado de los pacientes en los que se encontró alguna de ellas.

Para la detección de la mutación S549N que destruye un sitio de restricción natural para la enzima DdeI en el exón 11, no fue necesario realizar la técnica de

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la búsqueda de las diferentes mutaciones analizadas.

Mutación	Exón	Fragmentos amplificados (pb)	Oligonucleótidos
Δ F508	10	219	*F: GCACCATTAAGAAAAATATGAT R: CATTACAGTAGCTTACCCA
G542X	11	180	F:GCAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT *R: CACTCAGTGTGATTCACCTTCAC
N1303K	21	144	F:GAAATATTTTACAATACAATAAGGG *R: CTCCACTGTTTCATAGGGATCTAA
Δ I507	10	181	*F:GCCTGGCACCATTAAGAAAAAGATC R: CTAACCGATTGAATATGGAGCC
S549N	11	425	F:CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT R:GCACAGATTCTGAGTAACATAAT
1924del9 y 2055del9→A	13	528	F: TCGTAAAAACGAGACATATTGCA R: ATCTGGTACTAAGGACAG

* oligonucleótido que introduce cambio de base. La base cambiada se encuentra subrayada.

Tabla 6. Búsqueda dirigida de mutaciones del gen FQ por PSM y PCR simple.

Mutaciones	Enzimas	Alelo cortado	Fragmentos restringidos (pb)
$\Delta F508^*$	MboI	Silvestre	202 + 17
G542X*	HphI	Silvestre	168 + 12
N1303K*	DdeI	Silvestre	123 + 21
$\Delta I507^*$	BglII	Mutado	157 + 24
S549N	DdeI	Silvestre	238, 174 + 13
1924del7	MaeI	Silvestre	276 + 233
2055del9→A	AluI	Silvestre	359 + 101

* mutaciones buscadas por PSM. Las tres restantes se analizaron por PCR simple.

Tabla 7. Detección de la mutación $\Delta F508$ por mutagénesis dirigida mediada por PCR.

	Normal	$\Delta F508$
Alelo	TATCAT(CTT)TG ↑	TATCATTG ↑
Mutagénesis dirigida	TATGAT(CTT)TG ↑	TATGATTG ↑
Sitio de restricción	<u>GATC</u> (MboI)	GATT
Tamaño de los fragmentos (pb)	202 + 17	219

La flecha señala el sitio donde se introduce la mutación puntual por medio de mutagénesis dirigida. Los paréntesis denotan el triplete de bases deletado en esta mutación. Las cuatro bases subrayadas señalan el sitio de restricción de la enzima MboI.

mutagénesis dirigida, por lo que sólo se amplificó el fragmento donde se encuentra localizada esta mutación, y se cortó con la enzima específica (tabla 6).

Digestión de los fragmentos amplificados

Una vez obtenidos los amplificados, estos fueron digeridos con la enzima apropiada durante toda la noche a 37 °C, junto con un control positivo bajo las siguientes condiciones:

Buffer	1 X
Enzima	4 U
Amplificado	10 µl
volumen final	25 µl

Posteriormente, el volumen completo de la solución de restricción de cada muestra se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (apéndice 1), utilizando el marcador ladder, o el ϕ X174 y el λ Hind III como marcadores de pesos moleculares. El gel se corrió a 85 V durante 2.5 hrs. En el caso de la mutación G542X, cuya diferencia en el número de pares de bases entre los fragmentos cortados y los no cortados es de sólo 12 pb, las muestras se corrieron en un gel al 15% para obtener una mayor definición y separación de los fragmentos.

El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio, y se observó en un transiluminador de rayos ultravioleta donde fue fotografiado.

Para el análisis de las mutaciones 1924del7 y 2055del9→A se amplificó el exón 13 a partir del DNA genómico de pacientes con al menos un alelo sin identificar, utilizando los primers mostrados en la tabla 5 y bajo las condiciones ya descritas. Los productos amplificados se corrieron en geles de poliacrilamida al 7.5% a 100 V durante 60 min, para la identificación de heterodúplex en los pacientes heterocigotos compuestos y en los familiares portadores.

Análisis estadístico

Se calculó la frecuencia de las mutaciones en los cromosomas de los pacientes incluidos en este estudio y se compararon con las reportadas en otras poblaciones, utilizando la prueba de X^2 .

RESULTADOS.

Análisis de las mutaciones del gen FQ

El análisis incluyó a los casos índice y a sus familiares de primer grado. En todos los casos las mutaciones encontradas en los pacientes fueron corroboradas al encontrarlas en sus padres, y se buscaron dirigidamente en sus hermanos para detectar portadores y brindar asesoramiento genético.

$\Delta F508$

Se detectaron 19 pacientes homocigotos $\Delta F508$ y 36 heterocigotos compuestos $\Delta F508$. En la figura 15 se muestra el análisis molecular por PSM para la mutación $\Delta F508$ en una familia donde el caso índice es un homocigoto $\Delta F508$. El fragmento amplificado es de 219 pb. En el amplificado del alelo normal se forma un sitio de restricción para la enzima MboI y al ser digerido es cortado en dos fragmentos de 202 y 17 pb. De esta manera, un homocigoto normal o un paciente con mutaciones diferentes a la $\Delta F508$ muestran una sola banda de 202 pb, ya que el segundo fragmento es demasiado pequeño para ser retenido por el gel (Fig.15, carril 5). En cambio, los pacientes homocigotos $\Delta F508$ muestran una sola banda de 219 pb (Fig.15, carril 2); y los heterocigotos (portadores $\Delta F508$ clínicamente sanos o pacientes heterocigotos compuestos) presentan tres bandas: la de 202 y 219 pb correspondientes al alelo normal y al mutado, más una tercer banda resultante de la formación de un heterodúplex, que es un tercer indicador de heterocigocidad (Fig.15, carriles 3 y 4).

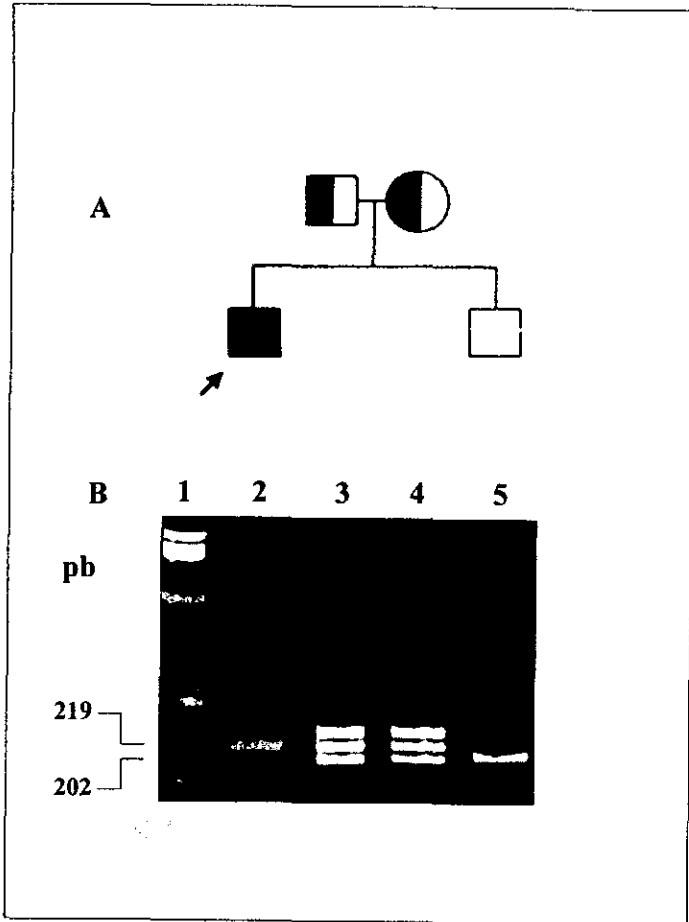


Figura 15. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por PSM. A) Árbol genealógico de un paciente homocigoto $\Delta F508$. La flecha señala el caso índice. B) Electroforesis de la digestión de los fragmentos amplificados para el análisis de la mutación $\Delta F508$. Carril 1: marcador de pesos moleculares $\phi X174$; carril 2: caso índice $\Delta F508/\Delta F508$; carril 3: padre portador $\Delta F508/n$; carril 4: madre portadora $\Delta F508/n$; carril 5: hermano normal n/n . n = alelo normal.

G542X

En la figura 16 se presenta el análisis molecular de una familia en donde el caso índice es un homocigoto G542X. El fragmento amplificado con los iniciadores específicos para el análisis de esta mutación es de 180 pb. En el alelo normal se forma un sitio de restricción para la enzima HphI, que al ser digerido da lugar a dos fragmentos, uno largo de 168 pb y otro corto de 12 pb. Por consiguiente, los homocigotos normales muestran una sola banda de 168 pb (el fragmento corto no puede ser retenido por el gel) (Fig.16, carril 7); mientras que los pacientes homocigotos G542X presentan la banda de 180 pb del producto amplificado (Fig.16 carriles 2 y 6). En los portadores sanos se observa el alelo mutado (180 pb) y el alelo normal (168 pb) (Fig.16, carriles 3-5). Se encontraron únicamente dos pacientes homocigotos y nueve heterocigotos compuestos: cuatro pacientes fueron G542X/ Δ F508, uno G542X/S549N y cuatro más G542X/X.

N1303K

El tamaño del fragmento amplificado con los primers específicos para esta mutación es de 144 pb. También en este caso el alelo normal es el blanco de una enzima de restricción específica (DdeI), siendo cortado en fragmentos de 123 y 21 pb. Por lo tanto, el alelo mutado permanece intacto después de la digestión con DdeI. En la figura 17 se muestran dos pacientes con mutaciones diferentes a la N1303K, los cuales únicamente presentan una banda de 123 pb (carriles 3 y 5), y dos pacientes heterocigotos compuestos que presentan dos bandas, una de 144 pb y otra de 123 pb, los cuales representan a los alelos mutado y normal respectivamente (carriles 2 y 4). En las muestras de pacientes analizadas, no se detectaron pacientes homocigotos para esta mutación. Sin embargo, se encontraron tres heterocigotos compuestos: dos pacientes N1303K/ Δ F508 y uno con una mutación aún no caracterizada en el otro alelo.

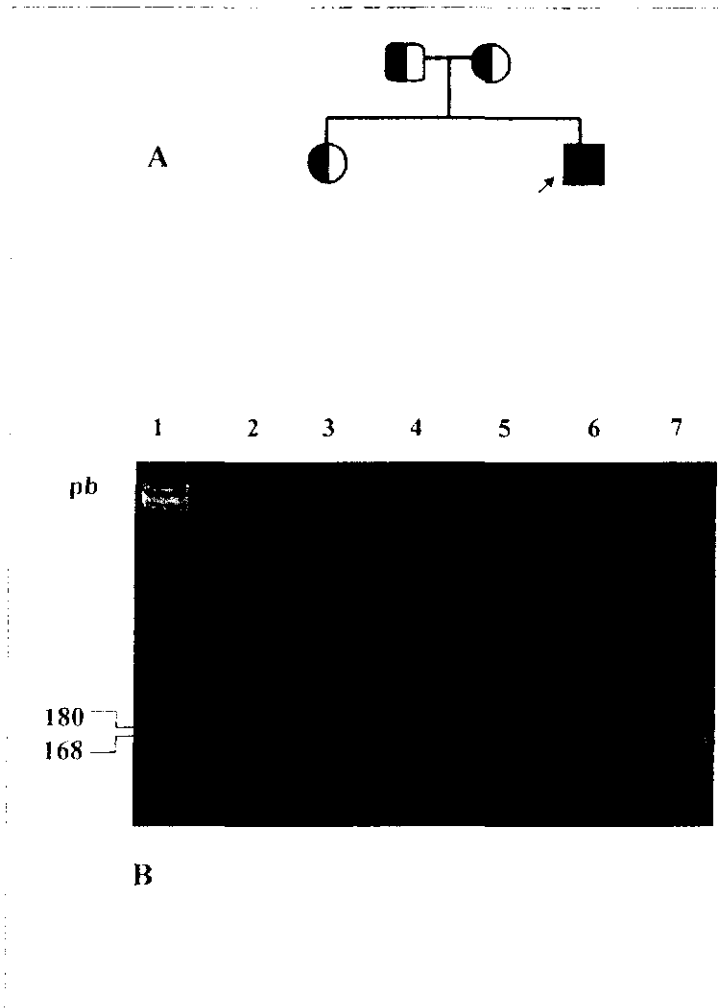


Figura 16. Análisis de la mutación G542X por PSM. A) Árbol genealógico de un paciente homocigoto G542X. La flecha señala el caso índice. B) Electroforesis de la digestión de los fragmentos amplificados para el análisis de la mutación G542X. Carril 1: marcador de pesos moleculares ϕ X174; carril 2: control homocigoto G542X/G542X; carril 3: hermana portadora sana G542X/n; carril 4: padre portador G542X/n; carril 5: madre portadora G542X/n; carril 6: caso índice G542X/G542X; carril 7: control normal n alelo normal

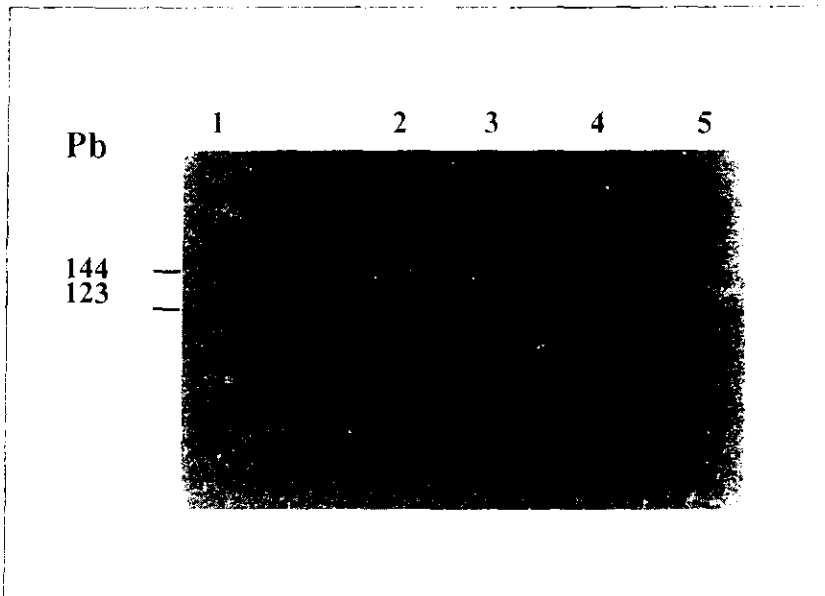


Figura 17. Análisis de la mutación N1303K por PSM. Carril 1: marcador de pesos moleculares *Ladder*; carril 2: control heterocigoto conocido N1303K/X; carriles 3 y 5: pacientes con mutaciones diferentes a la N1303K; carril 4: paciente heterocigoto compuesto N1303K/ Δ F508.

$\Delta I507$

La figura 18 muestra el análisis de la mutación $\Delta I507$ en la familia de un paciente heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$. El análisis de esta mutación representa un problema de diagnóstico especial. El alelo $\Delta I507$ no puede ser amplificado cuando se utilizan los oligonucleótidos específicos para la $\Delta F508$, debido a que la delección de 3 pb del alelo $\Delta I507$ es aledaña al sitio donde dicho oligonucleótido cambia de base. Por lo tanto, el oligonucleótido $\Delta F508$ y el alelo $\Delta I507$ no se aparean. De esta manera, un heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$ aparece con un patrón electroforético idéntico al homocigoto $\Delta F508$ (Fig. 18B, carril II-1), y los individuos $\Delta I507/X$ y $\Delta I507/N$ (portador) aparecen como normales (Fig. 18B, carriles II-2 y I-2). Por esta razón, se buscó dirigidamente la mutación $\Delta I507$ en todos los pacientes con patrón electroforético normal para $\Delta F508$ y en aquellos enfermos con un patrón electroforético de homocigotos para $\Delta F508$ pero normal en alguno de sus padres.

Al amplificar la mutación $\Delta I507$ por PSM, se forma un sitio de restricción para la enzima BglII en el alelo mutado. El producto amplificado es un fragmento de 181 pb que es cortado por BglII en dos fragmentos, uno de 157 pb y otro de 24 pb que no se observa en el gel. Por lo tanto, un homocigoto normal muestra una banda de 181 pb correspondiente al amplificado sin cortar (Fig.18C, carriles CN y II-2); mientras que un paciente homocigoto $\Delta I507$ presentaría una banda de 157 pb, como consecuencia del corte de la enzima. Los portadores sanos para esta mutación también mostraron la formación de heterodúplex (Fig.18C, carriles I-2 y CP). Por otro lado, en los heterocigotos compuestos $\Delta I507/\Delta F508$ no se formó el heterodúplex debido a que las cadenas sencillas de los alelos $\Delta I507$ y $\Delta F508$ no se aparean a consecuencia de la presencia de 6 pb no complementarias entre sí, como resultado de las delecciones de tres pb aledañas que presenta cada alelo (Fig.18C, carriles 2 y 6). Los portadores sanos de la mutación $\Delta F508$ y los pacientes heterocigotos compuestos con un alelo $\Delta F508$ y otro alelo no- $\Delta I507$, presentan una banda de 181 pb y la formación de un heterodúplex (Fig.

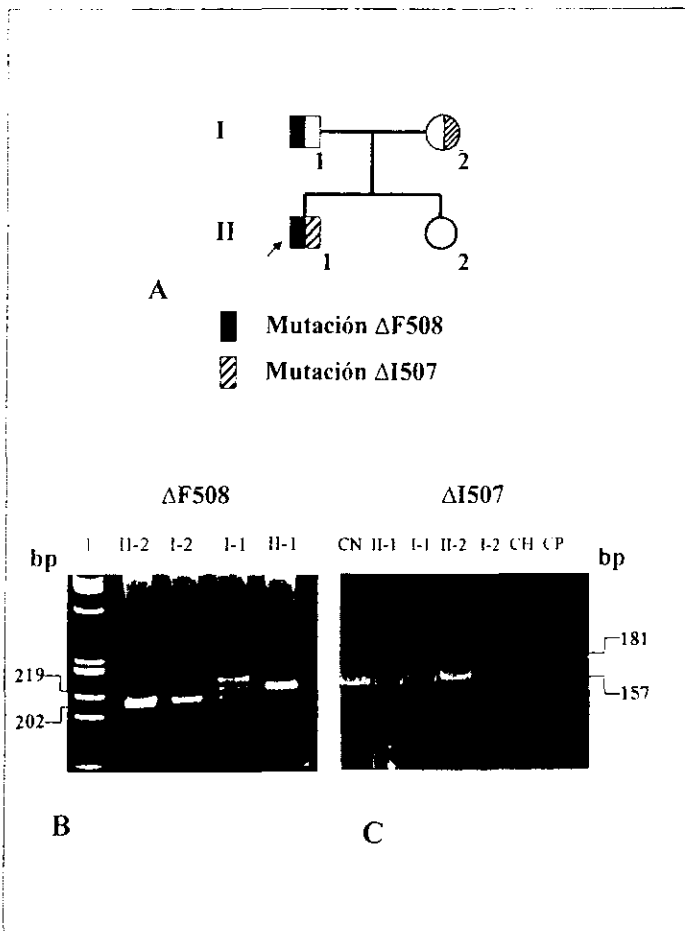


Figura 18. Análisis de la mutación $\Delta I507$ por PSM. A) Árbol genealógico de un paciente heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$. La flecha señala el caso índice. B) Electroforesis de la digestión de los fragmentos amplificados para el análisis de la mutación $\Delta F508$. I: marcador de pesos moleculares $\phi X174$; II-2: hermana sana n/n; I-2: madre portadora $\Delta I507/n$; I-1: padre portador $\Delta F508/n$; II-1: caso índice $\Delta F508/\Delta I507$. C) Electroforesis de la digestión de los fragmentos amplificados para el análisis de la mutación $\Delta I507$. CN: control normal; II-1: caso índice $\Delta F508/\Delta I507$; I-1: padre portador $\Delta F508/n$; II-2: hermana sana n/n; I-2: madre portadora $\Delta I507/n$; CH: control heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$; CP: control portador $\Delta I507/n$. n=alelo normal)

18C, carril 1-1). Esta mutación se detectó en 3 pacientes heterocigotos compuestos $\Delta I507/\Delta F508$, y un paciente $\Delta I507/X$, no se encontraron homocigotos $\Delta I507/\Delta I507$.

S549N

Para el análisis de esta mutación se obtuvo un amplificado de 425 pb, que corresponde al exón 11 completo. En este exón se encuentran dos sitios de restricción naturales para la enzima DdeI. Uno de estos sitios es destruido por la presencia de la mutación S549N. De esta forma, la digestión de un alelo normal con la enzima DdeI produce 3 fragmentos de los siguientes tamaños: 238 pb, 174 pb y 13 pb. De estos fragmentos, sólo los dos primeros fueron visibles en geles de poliacrilamida (Fig.19, carriles 5, 9 y 10). Por otro lado, los alelos S549N digeridos con la enzima específica producen sólo dos fragmentos de 412 y de 13 pb, observándose en un gel de poliacrilamida únicamente la banda de 412 pb. En los pacientes heterocigotos compuestos y portadores sanos para esta mutación se observaron 3 bandas; una de 412 pb correspondiente al alelo mutado, y dos más de 238 y 174 pb correspondientes al corte del alelo normal (Fig.19 carriles 2-4 y 6-8). Esta mutación se encontró en sólo un paciente con el genotipo S549N/G542X y en su prima hermana con el genotipo S549N/X.

1924del7 y 2055del9→A

La búsqueda de estas mutaciones se realizó a través de análisis por heterodúplex, para lo cual se amplificó la totalidad del exón donde se encuentran codificadas, el exón 13. La amplificación de esta secuencia de DNA, produjo un fragmento de 510 pb. Puesto que estas mutaciones son deleciones de 7 y 9 pb, la amplificación del exón 13 en pacientes heterocigotos compuestos, provocó la formación de estructuras heterodúplex que fueron visibles en un gel de poliacrilamida. Como se puede apreciar en las figuras 20 y 21, los heterodúplex formados por cada una de estas mutaciones mostraron un patrón

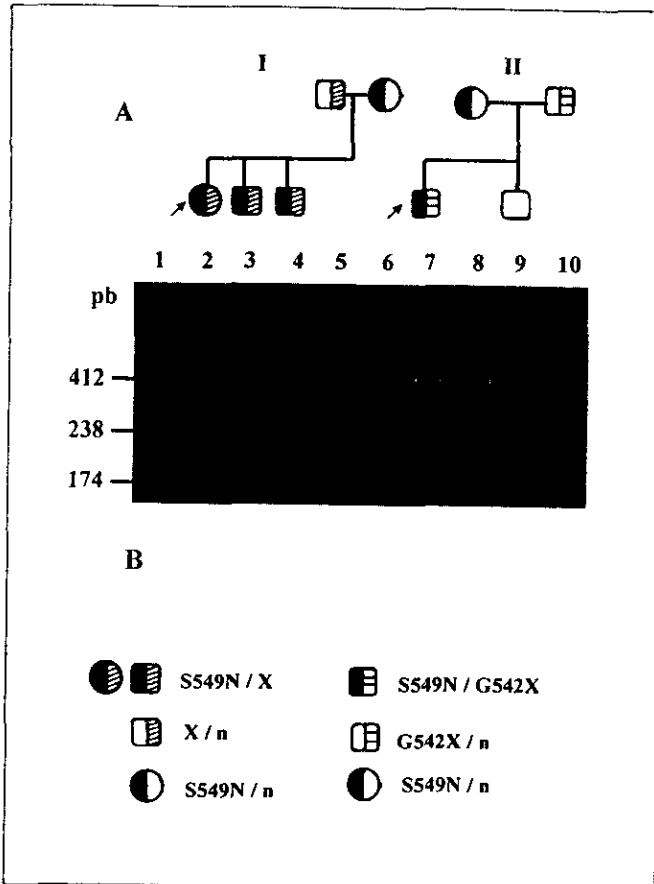


Figura 19. Análisis de la mutación S549N por PCR simple y digestión. A) Árbol genealógico de dos pacientes compuestos S549N/G542X. Las flechas señalan el caso índice. B) Electroforesis de la digestión de los fragmentos amplificados para el análisis de la mutación S549N. Familia I, carriles 2-6; familia 2, carriles 7-10. Carril 1: marcador de pesos moleculares ϕ X174. Familia I, carril 2: caso índice heterocigoto compuesto S549N/X; carriles 3 y 4: hermanos afectados del paciente S549N/X; carril 5: padre del paciente X/n; carril 6: madre del paciente S549N/n. Familia II, carril 7: caso índice heterocigoto compuesto S549N/G542X; carril 8: madre del paciente S549N/n; carril 9: hermano sano n/n; carril 10: padre del paciente G542X/n. n= alelo normal. X= cualquier mutación diferente a la S549N. El patrón electroforético de las dos familias son idénticos debido a que solo se buscó a la mutación S549N.

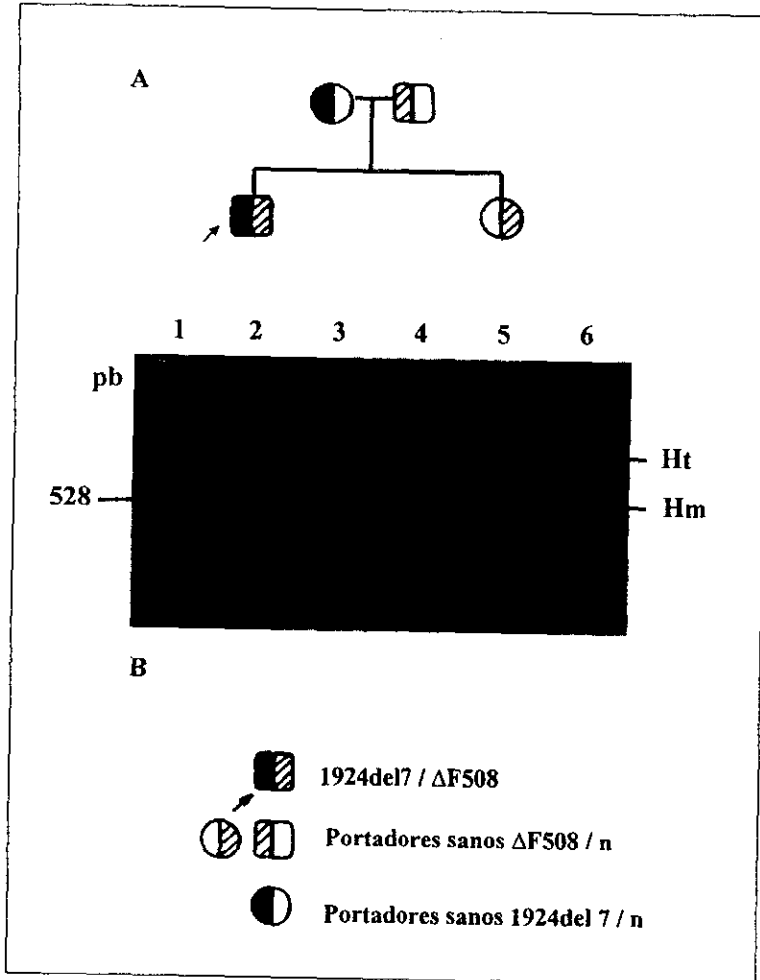


Figura 20. Análisis de la mutación 1924del7 por heterodúplex. A) Árbol genealógico de un paciente heterocigoto compuesto 1924del7/ Δ F508. La flecha señala el caso índice. B) Electroforesis de los fragmentos amplificados para el análisis de la mutación 1924del7. Carril 1: marcador de pesos moleculares λ /HindIII; carril 2: caso índice 1924del7/ Δ F508; carril 3: madre portadora 1924del7/n; carril 4: padre portador Δ F508/n; carril 5: hermana portadora Δ F508/n; carril 6: control normal. n= alelo normal; Ht= heterodúplex; Hm= homodúplex

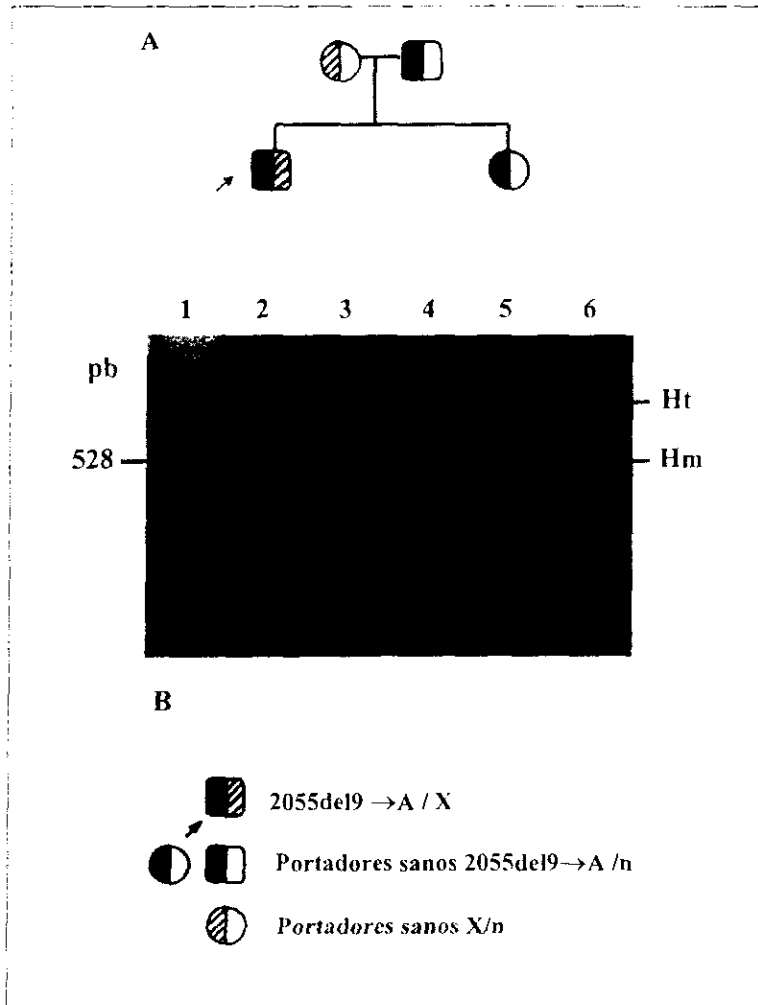


Figura 21. Análisis por heterodúplex de la mutación 2055del 9 \rightarrow A . A) Árbol genealógico de un paciente heterocigoto compuesto 2055del9 \rightarrow A. La flecha señala el caso índice. B) Carril 1: marcador de pesos moleculares λ /HindIII; carril 2: caso índice 2055del9 \rightarrow A/X; carril 3: madre portadora X/n; carril 4: padre portador 2055del9 \rightarrow A/n; carril 5: hermana sana 2055del9 \rightarrow A/n; carril 6: control normal. n= alelo normal; X= cualquier otra mutación diferente a la 2055del9 \rightarrow A

diferente y característico en el corrimiento electroforético. La mutación 1924del7 fue detectada en un paciente heterocigoto compuesto 1924del7/ Δ F508, mientras que la mutación 2055del9 \rightarrow A se encontró en dos pacientes heterocigotos compuestos no emparentados: uno Δ F508/2055del9 \rightarrow A y otra 2055del9 \rightarrow A/X.

Frecuencias de las mutaciones del gen FQ en la población Mexicana

En la tabla 8 se puede observar la frecuencia de cada una de las mutaciones analizadas. La mutación más frecuente fue la Δ F508, que se encontró en el 36.63% de los cromosomas analizados, seguida por la G542X encontrada en el 6.56% de los cromosomas FQ. La Δ I507 y la N1303K fueron detectadas en cerca del 2% de los cromosomas analizados y la S549N en sólo el 0.62%. La detección de la mutación Δ F508 como la más frecuente en la población mexicana y de la G542X como la segunda más frecuente, concuerda con lo reportado por el Consorcio Internacional de la Fibrosis Quística a nivel mundial (1994). Sin embargo, el haber encontrado a la mutación Δ I507 como la tercera más frecuente en nuestra población, no concuerda con lo encontrado en trabajos realizados a nivel mundial (Consorcio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994), donde se reporta a la N1303K, G551D y R553X entre las más frecuentes, y se considera a la Δ I507 como una mutación rara. Finalmente, la S549N fue menos frecuente que las mutaciones mencionadas anteriormente, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, en donde está situada entre las mutaciones con menor frecuencia en el mundo.

Las mutaciones 2055del9 \rightarrow A y 1924del7 se presentaron en 2 y 1 cromosomas respectivamente de 118 analizados, encontrándose una frecuencia de 1.69% para la primera y 0.85% para la segunda.

En la tabla 9 se comparan las frecuencias encontradas en este trabajo con las reportadas a nivel mundial. En México, la frecuencia de la mutación Δ F508 es significativamente menor (36.63%) que la reportada a nivel mundial (67.1%), mientras

Tabla 8. Frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, N1303K, $\Delta I507$, S549N, 1924del7 y 2055del9 \rightarrow A en pacientes mexicanos con FQ.

Mutación	Total de cromosomas analizados	No. cromosomas afectados	Frecuencia
$\Delta F508$	202	74	36.63 %
G542X	202	13	6.56 %
N1303K	202	3	1.48%
$\Delta I507$	180	3	1.66%
S549N	160	1	0.62 %
1924del7	118	1	0.85%
2055del9 \rightarrow A	118	2	1.69%

que las mutaciones G542X y Δ I507 (6.56% y 2% respectivamente), fueron significativamente más frecuentes que en otras poblaciones (3.44% y 0.6% respectivamente) (Consorcio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994). Por otro lado, la frecuencia de las otras mutaciones no presentaron diferencias significativas con las reportadas a nivel mundial.

DISCUSIÓN

La frecuencia de la fibrosis quística en la población caucásica es alta, 1 en 2,000-3,000 nacidos vivos (Dodge *et al*, 1993). En México se desconoce la frecuencia real de la enfermedad. La prueba de cloruros en sudor es hasta el momento la mejor prueba diagnóstica para la FQ, sin embargo, existen pacientes que presentan cloruros en sudor en el límite entre lo normal y lo anormal. Además, si la prueba se realiza antes de los seis meses de edad no es confiable (Welsh *et al*, 1995a) y no es útil para la detección de portadores.

El diagnóstico molecular permite detectar con certeza las mutaciones del gen FQ, ratifica el diagnóstico de FQ inicial y permite a través de la detección de mutaciones graves o leves, establecer un pronóstico de la enfermedad. Además, el conocimiento de las mutaciones responsables de la FQ en una familia permite realizar un diagnóstico prenatal certero, o bien un diagnóstico temprano de la enfermedad, con lo cual se puede ofrecer un tratamiento oportuno. Una de las ventajas más importantes de este método es la detección de portadores sanos. Esto es de vital importancia para proporcionar un asesoramiento genético adecuado a los familiares de un paciente con FQ, de tal forma que un portador conozca las probabilidades de tener un niño enfermo.

Actualmente se han descrito más de 750 mutaciones en el gen de la FQ en todo el mundo (Consortio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994). La mayoría de estas mutaciones son raras, muchas de ellas tienen una frecuencia menor al 1% (Dodge *et al*, 1993). La frecuencia de las distintas mutaciones del gen FQ varía ampliamente en diferentes grupos étnicos. En poblaciones con alto grado de mestizaje la diversidad de mutaciones es muy alta, mientras que en aquellas poblaciones con poco mestizaje o de carácter endogámico la diversidad de mutaciones es menor (Tsiu L-C, 1992).

Así por ejemplo, en poblaciones de judíos ashkenazi de Israel y en caucásicos en Estados Unidos, al buscar dirigidamente un panel de cinco a nueve mutaciones en pacientes con FQ, se puede caracterizar el 96% y el 80% de los cromosomas FQ respectivamente (Welsh *et al*, 1995a). Por el contrario, en México donde ha ocurrido un gran mestizaje entre diferentes razas, al usar un panel de siete mutaciones, fue posible caracterizar tan sólo el 47% de los cromosomas analizados. En contraste, en la población Hutterita en Canadá, al buscar dirigidamente solo dos mutaciones ($\Delta F508$ y M1101K) se pueden caracterizar el 100% de los cromosomas FQ (Zielinsky *et al*, 1993), mientras que en un caso extremo de homogeneidad genética, como es el presentado en las Islas Faroe todos los pacientes diagnosticados con FQ han sido homocigotos $\Delta F508$ (Schwartz *et al*, 1995).

Pareciera que el paso lógico a seguir para poder caracterizar un mayor número de cromosomas FQ, fuera el aumentar el número de mutaciones buscadas dirigidamente. Sin embargo, esto no mejora la eficiencia del tamizaje, debido a que se necesita un gran número de mutaciones para poder caracterizar únicamente unos cuantos cromosomas más (fig. 22), ya que la mayoría de las mutaciones del gen FQ son raras y presentan una frecuencia menor al 1% (Welsh *et al*, 1995a). Por otro lado, probablemente muchas de las mutaciones presentes en México no han sido identificadas todavía. Esta situación se demuestra claramente con la caracterización de dos mutaciones nuevas en la población mexicana por Orozco y colaboradores (1997).

A raíz de la elaboración de este trabajo se desprende una estrategia para la detección y análisis de las mutaciones de esta enfermedad presentes en nuestra población (Fig. 23). Esta estrategia consiste en la utilización de manera combinada de las técnicas de mutagénesis dirigida y restricción de muestras amplificadas por PCR para buscar dirigidamente las mutaciones más frecuentes en nuestra población, y posteriormente la utilización de SSCP y secuenciación para la caracterización de nuevas mutaciones. Inicialmente, todas las muestras de pacientes con FQ son analizadas ya sea por mutagénesis dirigida o por restricción de fragmentos amplificadas por PCR según sea el caso, para buscar las mutaciones más frecuentes en

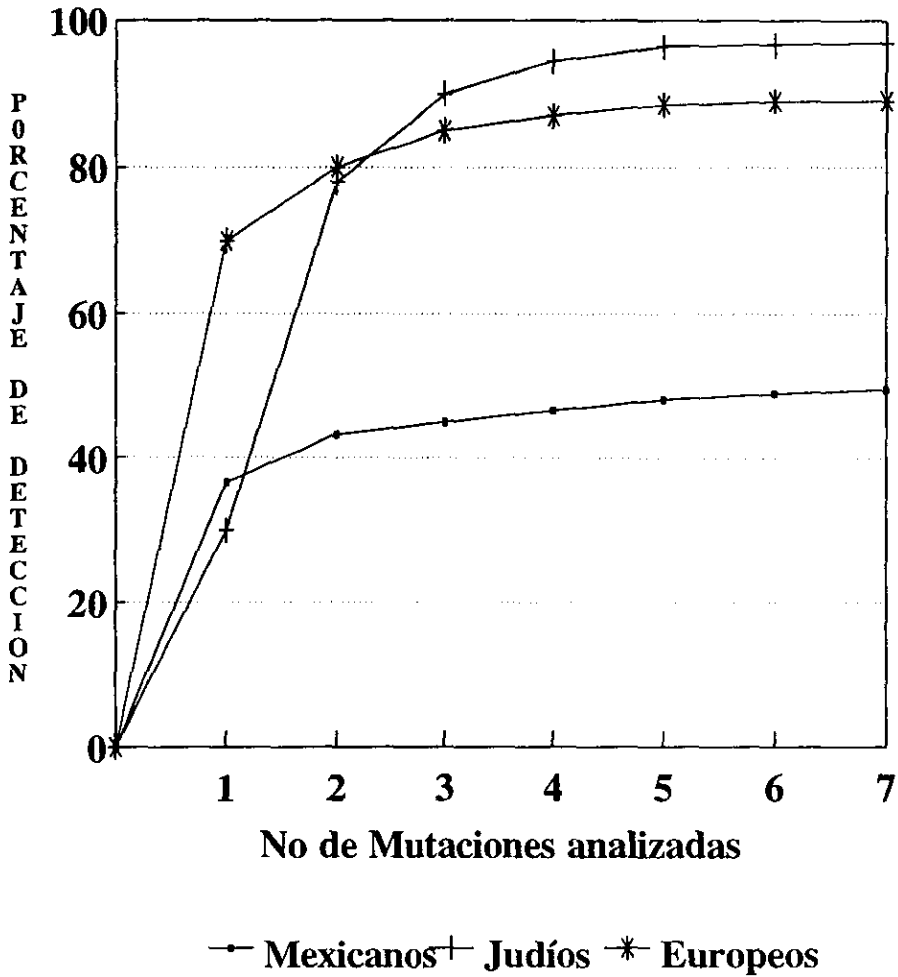


Figura 22. Porcentaje acumulativo de cromosomas FQ buscando 24 diferentes mutaciones en la población europea y en judíos Ashkenazi. También se muestra el porcentaje de los cromosomas analizados en este trabajo.

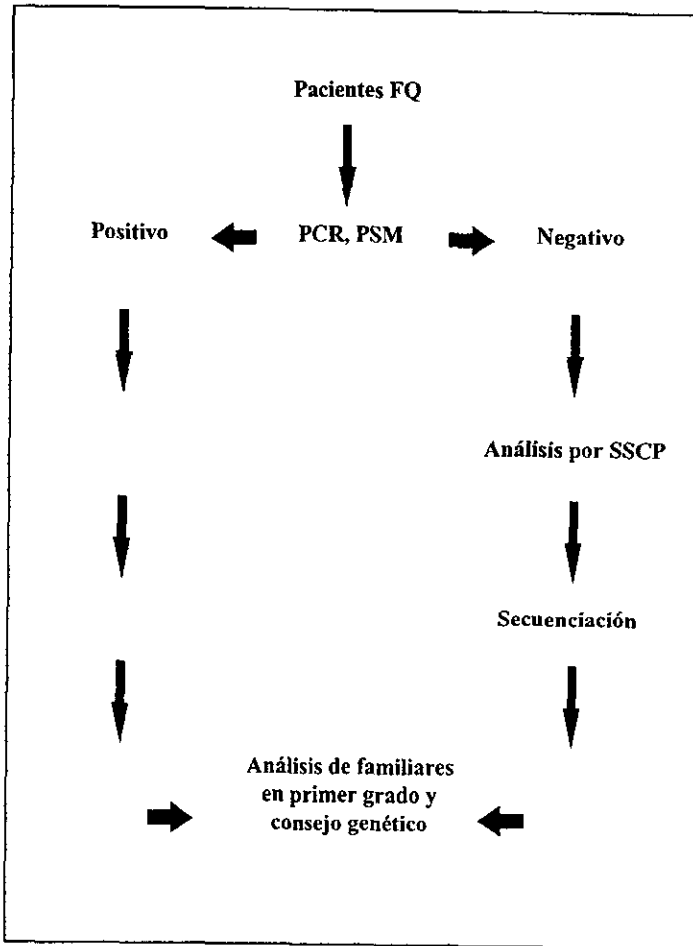


Figura 23. Algoritmo diagnóstico propuesto para detectar el 100% de las mutaciones del gen FQ en la población mexicana.

la población mexicana ($\Delta F508$, G542X, $\Delta I507$ y N1303K) con base en lo encontrado en este trabajo. Este paso funcionaría como un filtro, en el cual se resolverían casi el 50% de los cromosomas FQ. Posteriormente, los cromosomas FQ en donde no se hubiese caracterizado la mutación, serían analizados por SSCP. Esta técnica, nos permite detectar cambios en la secuencia de un gen al observar alteraciones en la conformación de hebras sencillas de DNA. Se deberán analizar primero aquellos exones donde se ha reportado mayor frecuencia de mutaciones (exón 11, 7, 4, 21, 19, 17, 13) (Tsui L-C, 1992). En caso de no encontrar una mutación en estos exones, se deben examinar uno por uno los exones restantes, para finalmente, secuenciar únicamente el exón problema, a fin de caracterizar la mutación. Esta metodología nos evitará secuenciar todo el gen de la FQ de cada paciente. De esta manera, se aspira a detectar cerca del 100% de las mutaciones presentes en la población mexicana.

La mutación más frecuente en nuestra población fue la $\Delta F508$, que se presentó en una proporción mucho mayor que el resto de las mutaciones. La segunda más frecuente fue la G542X, seguida de la $\Delta I507$, la N1303K y la S549N. Las mutaciones $\Delta F508$, G542X y N1303K se encuentran también entre las cinco primeras mutaciones más frecuentes a nivel mundial, no así la $\Delta I507$ y la S549N. Cabe mencionar que los resultados encontrados en nuestra población muestran semejanza a lo reportado en países del sur de Europa en donde la mutación $\Delta F508$ presenta una baja frecuencia comparada con poblaciones caucásicas y la frecuencia de la G542X es más alta.

La mutación $\Delta I507$ fue la tercera más frecuente en pacientes mexicanos. Esto contrasta con lo reportado a nivel mundial, donde es considerada como una mutación rara (Consortio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994), como se puede apreciar en la tabla 9. Cabe la posibilidad de que esta mutación sea frecuente entre pacientes mexicanos o que su frecuencia haya sido subestimada en otros estudios, dado el problema de diagnóstico que representa por ser aldeaña a la mutación $\Delta F508$. De hecho, se ha descrito que con la utilización de técnicas como ASO y análisis de heterodúplex, es posible confundir un alelo $\Delta I507$ con un alelo $\Delta F508$ (Ober *et al*, 1992; Kerem *et al*, 1990). Incluso algunos autores han descrito como injustificada la

búsqueda dirigida de la mutación $\Delta I507$ debido a su baja frecuencia y se le incluye muy poco entre los protocolos de detección de mutaciones.

Nosotros encontramos que es necesario diferenciar intencionadamente la mutación $\Delta I507$ de la $\Delta F508$, lo cual hicimos al corroborar los resultados con el estudio de los padres y con mutagénesis dirigida con oligonucleótidos específicos para buscar la $\Delta I507$. En México en especial, la búsqueda de esta mutación se debe realizar de manera rutinaria por ser la tercera mutación más frecuente en nuestra población.

La $\Delta F508$, que es la mutación más frecuente del gen FQ a nivel mundial, también lo es en México (tabla 9). Sin embargo, su distribución varía significativamente en diversos países, encontrándose desde el 88% y el 100% de los cromosomas FQ en Dinamarca (Schwartz *et al*, 1990) y en las Islas Faroe (Schwartz *et al*, 1995) respectivamente, hasta el 23% y 26% en Judíos Ashkenazi y Yugoslavia (Cystic Fibrosis Analysis Consortium, 1994). En la figura 24 se puede observar la existencia de un gradiente en la frecuencia de esta mutación en Europa, que presenta una mayor incidencia en los países de Europa del Norte como Inglaterra, Dinamarca y Francia, que en los países de Europa del sur como España, Italia y Portugal entre otros, donde su frecuencia varía entre un 58% y 26% de los cromosomas FQ (European Working Group of Cystic Fibrosis, 1990; De braekeler *et al*, 1992).

Aunque la frecuencia de esta mutación en el Sur de Europa (55%) (Welsh *et al*, 1995a) y Sudamérica (45.1%) (Welsh *et al*, 1995a) es considerada baja, la encontrada en México fue significativamente más baja (fig. 25). Sin embargo, existen otros países como Italia (54%) (Dodge *et al*, 1993) y Yugoslavia (26%) (Cystic Fibrosis Analysis Consortium, 1994) donde la frecuencia de esta mutación no fue significativamente distinta a la de México.

Asia es la única región continental en donde la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ (28.54%) (Welsh *et al*, 1995a) es significativamente menor a la encontrada en pacientes mexicanos.

Un resultado interesante fue el no haber encontrado diferencias significativas en la frecuencia de esta mutación en países ligados genéticamente por un flujo

Tabla 9. Comparación de la frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, N1303K, $\Delta I507$ y S549N encontradas en este trabajo con las reportadas a nivel mundial y en siete grandes regiones del mundo.

	$\Delta F508$	G542X	N1303K	$\Delta I507$	S549N
México	37.63 %	6.43 %	1.48 %	1.66 %	0.62 %
Mundial (1)	67.1 % *	3.44 % *	1.8 %	0.6 % *	0.20 %
Europa del norte (2)	70.2 % *	2.07 % *	0.98 %	0.26 % *	0.08 % *
Europa del sur(2)	55 % *	3.55 % *	2.45 %	0.06 % *	0.02 % *
América del norte (2)	66.1 % *	2.24 % *	1.45 %	0.19 % *	0.047 % *
América del sur (2)	45.1 % *	5.01 %	1.45 %	0.26 % *	0.13 %
Australia (2)	74.6 % *	1.8 % *	0.74 %	0.29 % *	0.096 % *
Asia (2)	28.45 % *	4.44 %	4.76 % *	0 % *	0 % *
Africa (2)	68.15 % *	1.74 % *	1.55 %	-----	0.19 % *

El * indica las frecuencias con diferencias significativas a las encontradas en este trabajo mediante el análisis de X^2 ($p < 0.005$)

(1) Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994.

(2) Welsh et al, 1995a

poblacional (Fig. 24 y 25). Un ejemplo de lo anterior es el de Estados Unidos y Canadá, que presentan una frecuencia de la mutación $\Delta F508$ muy semejante a la encontrada en los países que los dominaron por espacio de varios siglos, Inglaterra y Francia. De la misma forma, la frecuencia de esta mutación en Argentina es muy parecida a la reportada en España y en general en el sur de Europa.

La frecuencia de la mutación G542X en nuestra población, fue más alta que la reportada para otras poblaciones (tabla 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la reportada en este trabajo y la de América del Sur (5.01%) (Welsh *et al*, 1995a) y Asia (4.44%) (Welsh *et al*, 1995a). A diferencia de la $\Delta F508$ esta mutación es más frecuente en Europa del Sur que en Europa del Norte (Fig. 26).

Por otro lado como se puede observar en las figuras 26 y 27, la frecuencia de la mutación G542X en nuestra población no presentó diferencias significativas con la reportada en países de Europa del Sur como Italia (4.3%) (Dodge *et al*, 1993), España (8%) (Casals *et al*, 1993) y Bulgaria (4.8%) (Consortio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994), pero sí con países de Europa del Norte donde su frecuencia es más baja, como Alemania (1.2%), Inglaterra (1.44%) y Dinamarca (0.7%) (Consortio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994; Dodge *et al*, 1993).

La frecuencia de la mutación N1303K en nuestra población, a diferencia de las mutaciones anteriores, fue semejante a las encontradas en poblaciones de Europa, América y África difiriendo únicamente con la frecuencia reportada en Asia, que es más alta (tabla 9). También se encontraron diferencias significativas con Suecia y Australia, donde no se ha detectado todavía esta mutación (Osborne *et al*, 1992; Grebe *et al*, 1994), y algunas regiones de Italia, en donde la frecuencia de esta mutación es muy alta (5.1%) (Osborne *et al*, 1992) (tabla 10).

La mutación S549N es una mutación muy rara a nivel mundial (0.20%) (Consortio Internacional de la Fibrosis Quística, 1994), siendo pocos los estudios donde su búsqueda se realiza de manera rutinaria. Por esta razón, no se cuenta con datos de su frecuencia en muchos de los países del mundo, existiendo únicamente reportes aislados de pacientes en los que se describen casos clínicos (Curtis *et al*,

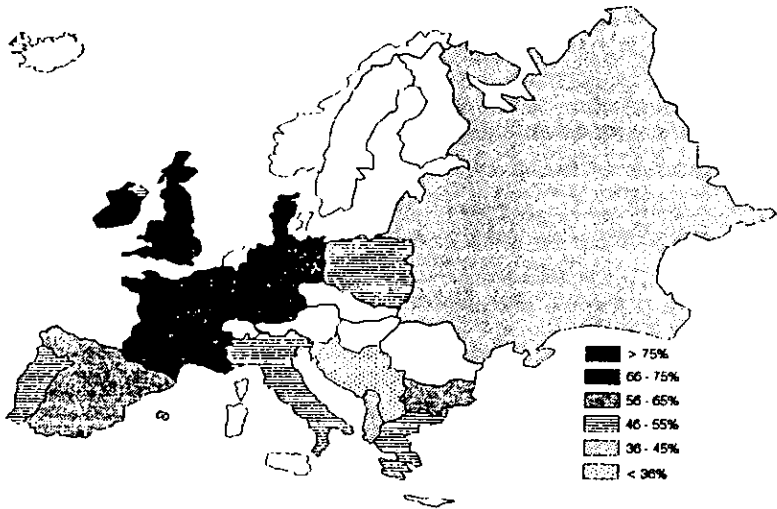


Figura 24. Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en países europeos (CIFQ, 1994).

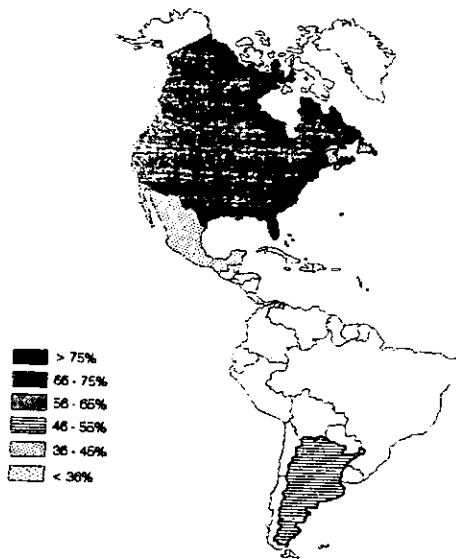


Figura 25. Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en países americanos (CIFQ, 1994).

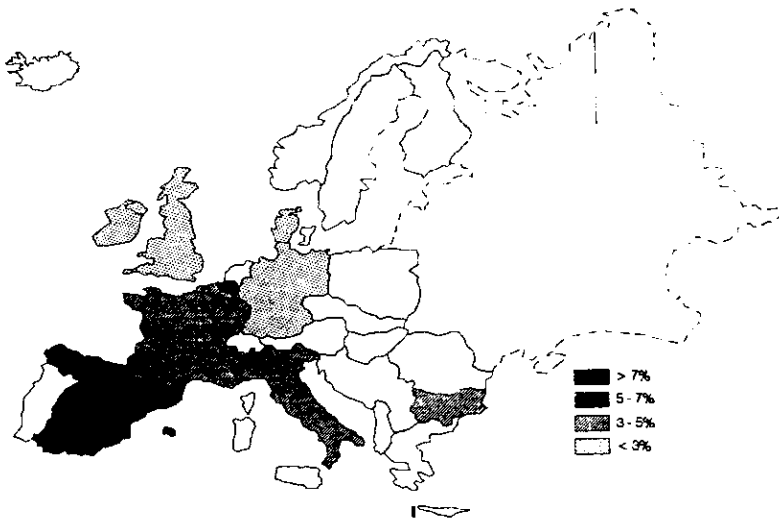


Figura 26. Frecuencia de la mutación G542X en países europeos (CIFQ, 1994).

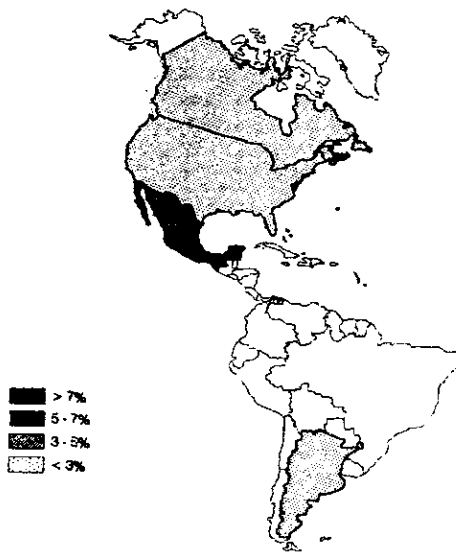


Figura 27. Frecuencia de la mutación G542X en países americanos (CIFQ, 1994).

Tabla 10. Comparación de la frecuencia de la mutación N1303K encontrada en este trabajo con la reportada en otros países.

Población	Cromosomas N1303K	Total de cromosomas analizados	Frecuencia
México	3	196	1.48%
Dinamarca	5	625	0.8 %
Francia	18	947	1.9 %
Alemania	10	588	1.7 %
Polonia	3	200	1.5 %
Suecia	0	290	0.0 % *
Bulgaria	6	150	4.0 %
Grecia	6	179	3.4 %
Italia	32	625	5.1 % *
España	15	728	2.0 %
Israel	4	95	4.2 %
Canadá	8	1000	0.8 %
Brasil	5	174	2.9 %
E.U. Caucásicos	27	1,924	1.4%

El * señala las frecuencias significativamente diferentes a la encontrada en este trabajo ($p < 0.05$).

Osborne et al, 1992

1993). Debido a esto, no se pudo obtener un patrón de distribución como en el caso de la $\Delta F508$ y la $G542X$. Sin embargo, sí se cuentan con reportes de su frecuencia en grandes regiones del mundo (tabla 9).

Por otra parte, las mutaciones más frecuentes a nivel mundial mantienen de *manera general el mismo orden de frecuencia en la mayoría de las poblaciones estudiadas hasta el momento* (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994; Dodge *et al*, 1993; Welsh *et al*, 1995a), en especial las mutaciones $\Delta F508$ y $G542X$ que son la primera y segunda mutaciones más frecuentes a nivel mundial respectivamente, y en diversos países como: Inglaterra (Dodge *et al*, 1993), Dinamarca (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994; Dodge *et al*, 1993), España (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994; Casals *et al*, 1993), y México entre otros. Esto podría sugerirnos un origen muy temprano de estas dos mutaciones en la evolución del hombre, acompañándolo en muchas de sus migraciones, participando de esta manera en la formación de nuevas etnias. La dispersión de estas mutaciones se pudo haber dado por flujo génico, presentándose en *las poblaciones así formadas, una frecuencia muy similar a la de la población de origen*, como podría ejemplificar el caso de Estados Unidos e Inglaterra, en donde las frecuencias de las mutaciones $\Delta F508$ y $G542X$, son muy semejantes (Dodge *et al*, 1993; Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994). Otro mecanismo que parece haber influido en la dispersión de estas mutaciones es el efecto de fundador, en especial en algunas poblaciones de origen judío como la Ashkenazi en donde la frecuencia de la mutación $W1282X$ es muy alta (Tsiu L-C, 1992; Sereth *et al*, 1993); y en la población de las Islas Faroe en donde se reporta a la mutación $\Delta F508$ en el 100% de los cromosomas FQ (Schwartz *et al*, 1995). Sin embargo, tomando en consideración la gran cantidad de países en donde las mutaciones $\Delta F508$ y $G542X$ son las más frecuentes, su dispersión probablemente fue debida a un flujo génico *acompañado por una ventaja selectiva sobre el heterocigoto, y al efecto de fundador en algunas poblaciones aisladas.*

Con base en estudios de haplotipos realizados en una gran cantidad de poblaciones se ha logrado determinar que el evento de origen de la mutación $\Delta F508$ ocurrió una sola vez en la historia evolutiva del hombre (Pritchard, 1991; Serre *et al*, 1990; Casals *et al*, 1992; Casals *et al*, 1993; Sereth *et al*, 1993; Debraekeler *et al*, 1992). Sin embargo, aún existe una fuerte controversia acerca del lugar de origen de esta mutación. Algunos autores (Pritchard, 1991; Serre *et al*, 1990) han marcado su origen en el Oriente medio hace 5,000-10,000 años, y su posterior dispersión en Europa en dirección sureste a noroeste durante el Neolítico. Por otro lado, Casals y cols (1992) han propuesto que esta mutación se originó en la población Vasca hace más de 10,000 años donde se diseminó a toda Europa (Casals *et al*, 1993; Debraekeler *et al*, 1992). La diseminación de la mutación también se habría llevado al cabo del sureste de Europa hacia el noroeste (Morral *et al*, 1994; De Braekeleer *et al*, 1992).

Existen evidencias de que una vez establecida esta mutación en las diferentes poblaciones europeas, su frecuencia fue diluida por la llegada de nuevas mutaciones del gen FQ traídas por las poblaciones indo-europeas al invadir parte de Europa (Casals *et al*, 1992). Debido a que estas invasiones se presentaron principalmente en el sur y centro de Europa, en los países localizados en estas regiones la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en la actualidad es más baja. Por el contrario, los países situados en el norte de Europa tuvieron poco o ningún contacto con las poblaciones indo-europeas, razón por la cual la mutación $\Delta F508$ ha conservado una mayor frecuencia (Debraekeler *et al*, 1992; Casals *et al*, 1992).

Ahora bien, la alta incidencia de la mutación $\Delta F508$ en poblaciones caucásicas, no puede ser explicada únicamente en términos de azar y flujo génico, debido a la baja probabilidad de que una mutación tan deletérea alcance frecuencias tan elevadas en tantas poblaciones. Por lo tanto, se ha postulado la existencia de una ventaja selectiva de los portadores sanos de esta mutación, respecto a lo cual se han propuesto muchas hipótesis que no han podido ser comprobadas (Welsh *et al*, 1995a). Sin embargo, recientemente se demostró que células heterocigotas para diversas

mutaciones del gen FQ son más resistentes a la deshidratación por la toxina del cólera *in vitro* (Gabriel *et al*, 1994). Esto pudo haber proporcionado a los portadores de mutaciones tales como la $\Delta F508$ y G542X una esperanza de vida mayor, aumentando paulatinamente la frecuencia de estos alelos en la población.

Debido a la colonización de casi tres siglos a la cual fue sometida la población mexicana por parte de los españoles, cabría esperar cierta semejanza entre la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ encontrada en México y la reportada para España, como sucede en el caso de Estados Unidos e Inglaterra (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994). Sin embargo, como se puede ver en las figuras 24 y 25, la frecuencia de esta mutación en México es significativamente menor a la reportada en España. Estos resultados tienen su fundamento en los eventos ocurridos en México durante la colonia. A diferencia de la colonización en Estados Unidos, en México no ocurrió una eliminación sistemática de los grupos indígenas autóctonos de la región, por el contrario, se dio una mezcla principalmente entre las razas española e indígena y en menor grado la africana (Lisker *et al*, 1990). Debido a lo anterior, la frecuencia de esta mutación pudo haberse diluído como consecuencia de la presencia de alelos diferentes al $\Delta F508$ en la población indígena y entre los esclavos africanos.

Esta hipótesis puede apoyarse en los estudios realizados en pacientes indígenas americanos con FQ, donde no se ha encontrado la mutación $\Delta F508$ (Grebe *et al*, 1994). Esto hace suponer la ausencia de esta mutación en las civilizaciones precolombinas. Lamentablemente, no se cuenta con estudios extensos sobre la incidencia de esta mutación en poblaciones indígenas autóctonas del continente americano para poder respaldar esta aseveración. Tampoco se cuenta con estudios sobre la frecuencia de las mutaciones responsables de la fibrosis quística en países americanos con la misma historia colonial que México, excepto en Argentina, donde la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ es similar a la de España. Esto podría ser consecuencia de la fuerte migración de europeos hacia Argentina en la época moderna.

Por otra parte, los alelos FQ de origen africano también pudieron haber diluido la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en México, aunque con una contribución menor que los indígenas, a causa del bajo porcentaje de genes africanos presentes en nuestra población (Lisker et al, 1990). La mutación $\Delta F508$ es poco frecuente en los individuos de raza negra, como se puede apreciar en un estudio realizado en americanos de origen africano, donde se encontró en sólo el 37% de los cromosomas analizados (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994).

Así como la $\Delta F508$, la mutación G542X presenta un origen único. Se ha reportado que se originó durante el periodo Neolítico en una población de ascendencia Semita a partir de la cual se originaron los judíos y los fenicios (Casals et al, 1993). Fueron probablemente estos últimos los que introdujeron esta mutación vía el Mediterráneo a España y a otros países que limitan con el mar Mediterráneo hace aproximadamente 2,500-3,000 años (Casals et al, 1993). La frecuencia de esta mutación también presenta un gradiente en Europa siendo más frecuente en el sur, especialmente en los países cercanos al Mediterráneo (fig. 26). Posiblemente, esto se explique por la mayor antigüedad de la mutación G542X en esta región. De esta forma, el alelo ha tenido mayor tiempo para diseminarse en estas poblaciones a través de deriva génica (Nunes et al, 1991). De la misma manera, la menor frecuencia de la G542X en países del norte de Europa parece deberse a su origen posterior a las invasiones indo-europeas, lo cual impidió su temprana dispersión por todos los países de Europa a través de estas poblaciones (Casals et al, 1993).

Cuando se comparó la frecuencia de esta mutación en nuestra población (6.56%) con la reportada para España (8%), no se encontraron diferencias significativas (fig. 26 y 27). Esto podría sugerir, que aunque sí disminuyó la frecuencia de esta mutación a consecuencia de la presencia de otras mutaciones en las poblaciones indígenas y en la de esclavos negros traídos por los colonizadores, este cambio no fue tan evidente.

Las mutaciones 2055del9→A y 1924del7 se buscaron dirigidamente en una muestra de 118 cromosomas, y se encontró solamente un paciente con la mutación

1924del7 en forma heterocigota y dos pacientes no emparentados con la mutación 2055del9→A en uno de sus cromosomas, presentando una baja frecuencia en nuestra población (0.84% y 1.69% respectivamente). Estas mutaciones no habían sido descritas previamente (Orozco et al, 1997), lo cual podría sugerir que sean de origen americano o que su frecuencia en el mundo es menor a la encontrada en este trabajo, dificultando su detección en otros países. Debido a esto, sería conveniente que en un estudio posterior además de aumentar el tamaño de la muestra analizada para obtener una frecuencia más certera de cada una de estas mutaciones, se realice un estudio de haplotipos para poder inferir el origen de estas mutaciones. Al mismo tiempo, se deberá buscar la presencia de estas mutaciones en otras poblaciones.

Conclusiones.

1. La mutación más frecuentemente detectada en este trabajo fue la $\Delta F508$ (36.63%), seguida de la G542X (6.56%), $\Delta I507$ (2%), N1303K (2%), S549N (0.62%). La frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$ y G542X en nuestro país, parecen ser resultado de una mezcla entre las poblaciones española, indígena y negra durante la etapa colonial en México. Las dos mutaciones encontradas en pacientes mexicanos (1924del7 y 2055del9 \rightarrow A), tuvieron una frecuencia baja (0.48% y 1.69% respectivamente).
2. El perfil de mutaciones que causan FQ en la población mexicana es diferente al que se presenta en el resto del mundo. La frecuencia de la $\Delta F508$ es significativamente menor en nuestro país; mientras la G542X presenta una frecuencia significativamente mayor que en otras poblaciones. Por otro lado, a diferencia de lo reportado en la literatura, la $\Delta I507$ presenta una frecuencia elevada en nuestra población, además de la presencia de dos mutaciones (1924del7 y 2055del9 \rightarrow A) que no se han detectado en otros países.
3. La heterogeneidad de la población mexicana y la diversidad de mutaciones causantes de la FQ, hacen difícil la detección de portadores en la población general, y el diagnóstico molecular de la enfermedad. Por esto se propone como estrategia para el diagnóstico molecular de FQ en pacientes mexicanos la utilización combinada de las técnicas de mutagénesis dirigida mediada por PCR, SSCP y secuenciación.

APÉNDICE**Reactivos****Acrilamida/bisacrilamida 30%**

- 29 ml de acrilamida
- 1 ml de bisacrilamida
- aforar a 100 ml con H₂O destilada

Agarosa 2% y 0.7%

- Aforar con TBE 1X

Bromuro de etidio

- 5 mg/100 ml

Cloroformo/isoamílico 24:1

- 24 partes de cloroformo
- 1 parte de alcohol isoamílico

Enzimas utilizadas en la amplificación.

Enzima	Concentración	Buffer 10X
Ultma DNA polimerasa	6 U/ μ l	100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM KCl 0.02%

Amplitaq DNA polimerasa	10 U/ μ l	100 mM tris HCl,
Fragmento Stoffel	5 U/ μ l	100 mM KCl, pH 8.3

Condiciones de restricción

Enzima	Incubación	Buffer de reacción.
MboI	37 °C	NEBuffer 3 100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM dithiotreitol (pH 7.9)
HphI	37 °C	NEBuffer 4 50 mM acetato de potasio, 20 mM Tris acetato, 10 mM acetato de Magnesio, 1 mM dithiotreitol (pH 7.9)
DdeI	37 °C	NEBuffer 3 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1mM dithiotreitol (pH 7.9)
Bgl II	37 °C	NEBuffer 3 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM dithiotreitol (pH 7.9).

Mael 37 °C NEBuffer 4

50 mM Acetato de potasio,
20 mM Tris acetato,
10 mM acetato de Magnesio,
1 mM ditioneitol (pH 7.9)

Alul 37 °C NEBuffer 1

10 mM Bis Tris Propano-HCl,
10 mM MgCl₂,
1 mM ditioneitol (pH 7.0)

Las enzimas de restricci3n utilizadas son de la casa comercial New England Biolabs.

Fenol saturado (Carlo Erba o BRL o destilado)

- Disolver 300 ml de Fenol 100% a 68 °C
- Poner en una botella est3ril de 500 ml:
 - 200 ml de H₂O destilada est3ril
 - 2 ml de β-2 mercaptoetanol puro
 - 4 ml de tris-HCl 1 M, pH 8.0
 - 292.5 μl de NaOH 1 N

Combinar esta mezcla con los 300 ml del fenol fundido

Cubrir con papel aluminio la botella y dejar el fenol a 4 °C toda la noche antes de usarlo.

Buffer de corrida.

- Azul de bromofenol 0.25 %
- Xilencianol 0.25 %
- Ficoll 400 (H₂O dd) 15 %

Marcadores de pesos moleculares.

DNA Ladder.

Este marcador de pesos se encuentra formado por fragmentos de una longitud de 100 a 1,500 pb, con un incremento de 100 pb en cada fragmento.

Φ X174 RF DNA/Hae III.

Este marcador de pesos moleculares se prepara a partir de DNA purificado de Φ 174RF digerido por completo con Hae III. Puede ser utilizado para medir fragmentos de 72 a 1,353 pb.

λ /Hind III.

La digestión del DNA del fago lambda con la enzima de restricción Hind III, produce ocho fragmentos que pueden ser utilizados como marcadores de pb para electroforesis en geles de agarosa y acrilamida. El tamaño de los fragmentos resultantes es: 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 y 23,130

Preparación de geles de poliacrilamida.

	7.5%	10%	15%
TBE 5%	1.50 ml	2.00 ml	3.26 ml
Acril /bisacrilamida 30%	2.50 ml	3.06 ml	5.00 ml
H ₂ O	5.90 ml	4.83 ml	1.56 ml
AP 10%	81.50 μ l	100 μ l	163 μ l
TEMED	8.10 μ l	10 μ l	16.3 μ l
Vol. final.	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml

Regulador para lisis de células rojas (BLCR).

- Tris (pH 7.6) 10 mM
- MgCl₂ 5 mM
- NaCl 10 mM

Regulador para lisis de células blancas (BLCB).

- Tris (pH 7.6) 10 mM
- EDTA (pH 8) 10 mM
- NaCl 50 mM
- SDS 0.2 %
- Proteasa (proteínasa K) 200 µg/ml

TBE 10X (TRIS-BORATO-EDTA).

- Tris-Borato 0.9 M
- EDTA 0.02 M

TE (TRIS-EDTA).

- Tris (pH 8) 1.0 mM
- EDTA (pH 8) 0.1 mM

GLOSARIO.

Alelo. Formas alternativas de un mismo gen.

Alineamiento. Unión de una cadena sencilla con su secuencia complementaria. ej. un oligonucleótido iniciador o primer con su secuencia complementaria.

Amplificación. Obtención de miles de copias de DNA a partir de una sola molécula.

ATP. (Adenosín trifosfato). Es la molécula energética de la célula, sintetizada principalmente en mitocondrias y cloroplastos. La energía liberada por el rompimiento de los enlaces de alta energía del ATP realiza reacciones importantes en la célula.

Caso índice. El primer individuo afectado que acude a consulta y es estudiado por el médico y/o el investigador.

Caja GC. Secuencia rica en guaninas localizada en la posición -90 de algunos genes. Es un elemento común de las regiones promotoras eucarióticas y se encuentra involucrada en la regulación génica.

Caja TATA. (TATA box). Septámero rico en A-T altamente conservado. Se encuentra aproximadamente 25 pb antes del sitio de inicio de la transcripción en todos los genes transcritos por la RNA polimerasa II.

Cromosomas homólogos. Cromosomas de contenido génico igual o similar que se unen en pares durante la meiosis.

Desoxirribonucleótidos. Son compuestos formados por un grupo fosfato, un azúcar desoxirribosa y una base nitrogenada, ya sea púrica o pirimídica.

Deriva génica. Fluctuaciones en la frecuencia de un alelo en una población debidas al azar.

Exón. Segmento codificante de un gen interrumpido, que se encuentra presente en el RNA mensajero.

Gen. Secuencia nucleotídica. Segmento de DNA involucrado en la producción de cadenas polipeptídicas. Incluye regiones río arriba y río abajo de la secuencia

codificante, así como secuencias interventoras (intrones) entre regiones codificantes (exones).

Heterocigoto. Paciente que presenta alelos diferentes para un locus en particular de un par de cromosomas homólogos.

Heterocigoto compuesto. Paciente que presenta una mutación diferente en cada alelo. por ej. G542X/N1303K.

Heterodúplex. Es una molécula de DNA, formada por el apareamiento de cadenas sencillas complementarias entre sí, de diferente origen.

Homocigoto. Paciente con el mismo alelo en los loci correspondientes de un par de cromosomas homólogos.

Homodúplex. Doble cadena de DNA formada por la alineación de cadenas sencillas del mismo origen.

Hot-spot. Región del DNA en la cual la frecuencia de mutación es mucho mayor que en otras zonas de la misma molécula.

Loci. Plural de locus.

Locus. Localización física de un gen en un cromosoma.

Oligonucleótidos o Primer. Polímero de DNA o RNA pequeño, que es generalmente sintetizado y utilizado para la realización de distintas técnicas en biología molecular. Se une a una cadena sencilla de DNA y aporta un extremo 3' hidroxilo libre, a partir del cual una DNA polimerasa puede comenzar la síntesis de una nueva cadena de deoxirribonucleótidos.

Primer F. Primer que flanquea la secuencia complementaria al extremo 5' de la región a amplificar en la cadena sentido de la doble hélice de DNA.

Primer R. Primer que flanquea la secuencia complementaria al extremo 5' de la región a amplificar en la cadena antisentido de la doble hélice de DNA.

Promotor. Región del DNA involucrada en la unión de la RNA polimerasa en el inicio de la transcripción.

RNA mensajero. Secuencia de ribonucleótidos producto de la transcripción de los genes estructurales. Es un intermediario en la síntesis proteica.

RT-PCR. Amplificación de DNA a través de la PCR (ver apéndice I) a partir de secuencias de RNA, mediante el uso de la transcriptasa reversa.

Splicing. Procesamiento del transcrito primario de DNA para su maduración.

- Anderson DH, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride. *Cell* 67:775, 1991.
- Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 56:344, 1938.
- Anderson DH, Hodges RG. Celiac syndrome. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child*. 72:62, 1946.
- Anderson MP, Welsh MJ. Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* 257:1701, 1992.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, *et al*. Congenital bilateral absence of the vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analysis of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 56:272, 1992.
- Boat TF, Cheng PW. Mucous glycoproteins in cystic fibrosis, In "Glycoproteins and glycolipids" in Disease Processes, de Walborg, 108-21. Washington DC: American Chemical Society, 1978.
- Boucher RC, Stutts Mj, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. *Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation*. *J Clin Invest* 78:1245, 1986.
- Bremer S. Quantitative expression patterns of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) and differentially spliced cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator mRNA transcripts in human epithelia. *Eur J Biochem* 206:137, 1992.
- Burdick AB. Frequency of the gene for cystic fibrosis with a view of replacement and recognition effects and reproduction by homozygotes. *Hum Hered* 27:366, 1977.
- Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. The two nucleotide-binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 270:1711, 1995.
- Carson MR, Welsh MJ. 5'-Adenylylimidodiphosphate does activate CFTR Chloride channels in cell-free patches of membrane. *Am J Physiol* 263:664, 1993.
- Casals T, Nunes V, Palacio A, Giménez J, Gaond A, Ibáñez N, Morral N, Estivill X. Cystic fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum Genet* 91:66, 1993.
- Casals T, Vázquez C, Lázaro C, Girbau E, Giménez FJ, Estivill X. Cystic fibrosis in the Basque country: High frequency of mutation $\Delta F508$ in patients of Basque origin. *Am J Hum Genet* 50:404, 1992.
- Cassano WF. Cystic fibrosis and the plaque. *Med Hypothesis* 18:51, 1985

- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Soza DW, *et al.* Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis cell. *Cell* 63:827, 1990.
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *New Engl J Med* 332:1475, 1991.
- Chou JL, Rozmahel R, Tsui L-C. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 266:24471, 1991.
- Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ Jr, Moss J, Dalemans W, Jallats S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq JP, Cutting GR, Guggino WB, Crystal RG. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts. *EMBO J* 11:379, 1992.
- Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ Jr, Moss J, Dalemans W, Jallats S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq JP, Cutting GR, Guggino WB, Crystal RG. Variable deletion of exon 9 coding sequence in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 10:1355, 1991.
- Cleghorn G, Benjamin L, Corey M, Forstner G, Dati F, Durie P. Age related alterations in immuno-reactive pancreatic lipase and cationic trypsinogen in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 107:371, 1985.
- Cliff WH, Schomacher RA, Frizzell RA. cAMP-activated Cl channels in CFTR-transfected cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *Am J Physiol* 262:1154, 1992.
- Conneally PM, Merrit AD, Yu P. Cystic fibrosis study of fibrocystic disease of the pancreas. *Ann Hum Genet* 19:388, 1973.
- Cooper DN, Krawczak M, Antonarakis SE. The nature and mechanism of human gene mutation. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease", ed. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, 1:259-91. New York: McGraw-Hill Inc., 1995.
- Crawford MD. A genetic study including evidence for heterosis of cystic fibrosis of the pancreas. *Heredity* 29:126, 1972.
- Culard J, Desgeorges H, Costa P, Laussel Razakatzara G, *et al.* Analysis of the whole CFTR regions and splice junctions in azoospermic men with congenital bilateral aplasia of epididymis or vas deferens. *Hum Genet* 93:167, 1994.
- Cuppens H, Marynen P, De Boeck C, Cassiman J. Detection of 98.5% of the mutations in 200 belgian cystic fibrosis alleles by reverse dot-blot and sequencing of the complete coding region and exon/intron junctions of the CFTR gene. *Genomics* 18:693, 1993.
- Curtis A, Richardson RJ, J Boohene, Jackson A, Nelson R, Bhattacharya. Absence of cystic fibrosis mutations in a large Asian population sample and occurrence of a homozygous S549N mutation in a inbred Pakistani family, *J Med Genet* 30:164, 1993.

- Cutting GR, Curristan SM, Nash E, Rosenstein BJ, Lerer Y, Abeliovich D, Hill A, Graham C, Analysis of four diverse population groups indicates that a subset of cystic fibrosis mutation occurs in common among caucasians. *Am J Hum Genet* 50:1185, 1992.
- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variations of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 4:167, 1994.
- Cystic Fibrosis Genotype-phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 329:1308, 1993.
- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, *et al.* Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation (see comments). *Nature* 354:526, 1991.
- De Braekeler M, Daigneault D. Spatial distribution of the DF508 mutation in Cystic Fibrosis: A review. *Hum Biol* 64:167, 1992.
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Wels MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive (see comments). *Nature* 358:761-64, 1992.
- di Sant' Agnese PA, Hubbard VS. The pancreas, in Taussing LM (de): *cystic Fibrosis*. New York, Thieme-Stratton, 1984, p. 230.
- di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics* 12:549, 1953.
- Dodge JA, Brock DJH, Widdicombe JH. *Cystic Fibrosis*. Current Topics, 1:18-210, New York, John Wiley & Sons Ltd 1993.
- Dork T, Mekus F, Schmidt K, Boshammer J, Fislage R, *et al.* Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 94:553, 1994.
- Drumm ML, Wilkinson DJ, Smith LS, Warrell RT, Strong TV, *et al.* Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254:1797, 1991.
- Dulhanty AM, Riordan JR. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 33:4072, 1994.
- Edwards JH, Heterozygote advantage. *Arch Dis Child* 52:343, 1977.

- Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PI, *et al.* Defective regulation of outwardly rectifying Cl-Channel by protein kinase A corrected by insertion of CFTR (see comments). *Nature* 358:581, 1992.
- European Working Group in Cystic Fibrosis Genetics. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotypes. *Hum Genet* 85:436, 1990.
- Farber S. Some organic digestive disturbance in early life. *J Mich Med Soc* 44:587, 1945.
- Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 269:3781, 1993.
- Friedman HZ, Langman CB, Favus MJ. Vitamin D metabolism and osteomalacia in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 38:803, 1985.
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 266:107, 1994.
- Goodman HO, Reed SC. Heredity of fibrosis of the pancreas. *Am J Hum Genet* 4:59, 1952.
- Grebe TA, Seltzer WK, DeMarchi J, Silva DK, Doane WW, Gozal D, Richter SF, Bowman CM, Norman RA, Rhodes SN, Hernried LS, Murphy S, Harwood IR, Accurso FJ, Jain KD. Genetic analysis of hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 54:443, 1994.
- Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S. Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [see comments. *Nature* 347:382, 1990.
- Gregory RJ, Rich DP, Cheng SH, Souza DW, Paul S. Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol Cell Biol* 11:3886, 1991.
- Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, Corey M, Levison M, *et al.* Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly-Asp at codon 551 and the delta F508 mutations are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileum. *Am J Hum Genet* 51:245, 1992b.
- Hamosh A, Rosenstein BJ, Cutting GR. CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cell. *Hum Mol Genet* 1:542, 1992ba

- Handwerger S, Roth J, Gorden P, di Sant' Agnese PA, Carpenter DFR, Peter G. Glucose intolerance in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 281: 451, 1969.
- Hansen RC, Lemen R, Revsin B. Cystic fibrosis manifesting with acrodermatitis enterophatica-like eruption. *Arch Dermatol* 129:51, 1983.
- Hartman J, Huang Z, Rado TA, Peng S, Jilling T, *et al.* Recombinant synthesis, purification and nucleotide binding characteristics of the first nucleotide binding domain of the cystic fibrosis gene product. *J Biol Chem.* 267:6455, 1992.
- Hiestad DM, Sorcher EJ, Huang Z, Wang Y, Haley BE. Use of 2-N3ATP to identify the site of ATP interaction on nucleotide binding domain-2 from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pediatric Pulmonol suppl* 10:42, 1994.
- Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, Gorvoy JD, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Knowles MR. Cystic Fibrosis gene mutation in patients with normal sweat chloridw concentrations. *N Engl J Med* 331: 974, 1994.
- Hollander DH. Etiogenesis of the european cystic fibrosis polymorphism: heterozygote advantage against venereal syphilis? *Med Hypothesis* 8:191, 1987.
- Hull J, Shackletons N, Harris A. Analysis of mutations and alternatice splicing patterns in the CFTR gene using mRNA derived from nasal epithelial cells. *Hum Molec Genet.* 3:1141, 1994.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi V, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362, 1990.
- Jarvi K, Zielenski J, Wilchansky M, Durie P, Buckspan M, *et al.* *Lancet* 345:1578, 1995.
- Kaplan E, Schwochman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw K, Holscaw DS. Reproductive failure in mate with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 279:65, 1968.
- Kerem B, Rave-Harel N, Goshen R, Madgar Y, Rahat A, *et al.* Genetic evidence for heterogenity in the etiology of CAVD: haplotype analysis in families. *Am J Hum Genet* 55:2110 (Abstr.), 1994.
- Kerem B, Rommens Jm Buchanan Ja, Markiewicz D, Cox TK, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetics analysis. *Science* 245:1073, 1989.
- Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis analysis of the most commom mutation (delta F508). *N Engl J Med* 323:1517, 1990.

- Knudson AGJ, Wayne L, Hallet WY. On the selective advantage of cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Hum Genet* 19:388, 1967.
- Koh J, Sferra TJ, Collins FS. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region. *J Biol Chem* 268:15912, 1993.
- Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, *et al.* Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 50:1178, 1992.
- Landing BH, Wells TR, Wong CI. Abnormality of the epididymis and vas deferens in cystic fibrosis. *Arch Pathol* 88:570, 1969.
- Levesque PC, Hart PJ, Hume JR, Kenyon JL, Horowitz B. Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl-channels in heart. *Circ Res* 71:1002, 1992.
- Lisker R, Ramirez E, Perez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban centers. *Hum Biol* 62:791, 1990.
- Lukacs GI, Mohamed A, Kartner N, Chang X-B, Riordan JR, Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart ($\Delta F508$) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 13:6076, 1994.
- Macek M, Mackowa A, Nash E, Cutting GR. Epistatic selection of a sequence 5' of the gene responsible for cystic fibrosis may account for the high frequency of this disease in the caucasian population. *Pediat Pulmonol suppl* 10:903 (Abstr), 1994.
- Mann EA, Jump MI, Wu J, Yee E, Gianella RA. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor or resistant to Sta-induced intestinal secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 239:463, 1997.
- Mayo O. On The maintenance of polymorphisms having an inviable homozygote. *Ann Hum Genet* 33:307, 1970.
- McDonald TV, Nghiem PT, Gardner P, Martens CL. Human Lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CFTR-defective cAMP-regulated chloride current. *J Biol Chem* 267:3242, 1992.
- McDonough S, Davidson N, Lester HA, McCarty NA. Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block. *Neuron* 13:623, 1994.
- Meindl RS. Hypothesis: A selective advantage for cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Phys Anthropol.* 74:39, 1987.
- Mercier B, Lissens W, Novelli G, Kalaydjieva L, de Arce M, *et al.* A cluster of cystic fibrosis mutations in exon 17b of the CFTR gene: a site for rare mutations *J Med Genet* 31:731, 1994.

- Mischler EH, Chesney Pj, Chesney RW, Mazes Rb. Demineralization in cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 133:632, 1979.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, *et al.* The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in european populations. *Nature Genet* 7:169, 1994c.
- Morral N, Dork T, Dziadek V, Llevadot R, Ferec C, *et al.* Patterns of haplotypes for 92 cystic fibrosis mutations: variability, association and recurrence. *Am J Hum Genet* suppl. 55:918 (Abstr.), 1994a.
- Morral N, Llevator R, Casals T, Gasparini P, Macek MJ, *et al.* Independent origins of cystic fibrosis mutations R334W, R347P, R1162X, and 3849+10KbC>T provide evidence of mutation recurrence in the CFTR gene. *Am J Hum Genet* 55:890, 1994b.
- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, *et al.* Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Molec Genet.* 2:1015, 1993.
- Munger B, Brasilow S, Cooke R. An electron microscopic study of eccrine sweat glands in patients with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* 59:497, 1961.
- Nagel G, Huang TC, Nastiuk KL, Nairn AC, Gadsby DC. The protein kinase A regulated cardiac Cl-channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 360:81, 1992.
- Nunes V, Gasparini P, Novelli G, Gaona A, Bonizzato A, Sangiuolo F, Balassopoulou, Giménez FJ, Dognini M, Ravnik-Glavac M, Cikuli M, Mokini V, Komel R, Dallapiccola B, Pignatti PF. Analysis of 14 cystic fibrosis mutations in five south european populations. *Hum Genet* 87:737, 1991.
- Nussbaum E, Boat TF, Wood RE, Doershuk CF. Cystic fibrosis with acute hyponatremia and metabolic acidosis in infancy. *Am J Dis Child* 133:965, 1979.
- Ober C, Lester LA, Mott C, Billstrand C, Lemke A, van der Ven K, Marcus S, Kraut J Lloyd-Still J, Booth C. Ethnic heterogeneity and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) mutation frequencies in Chicago-Area CF families. *Am J Hum Genet* 51:1344, 1992.
- Oblat- Montal M, Reddy GL, Iwamoto T, Tomich JM, Montal M. Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of CFTR, the cystic fibrosis channel. *PNAS* 91:1495-99, 1994.
- Oppenheimer EH, Esterly JR. Pathology of cystic fibrosis: Review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. *Percept Pediatr Pathol* 2:241, 1975.
- Orozco L, Villareal T, Chavez M. Two novel frameshift deletions ($1924\text{del}7$, $2055\text{del}19 \rightarrow A$) in the CFTR gene in Mexican cystic fibrosis patients. *Hum Mut* 10:239, 1997.

- Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dörk T, McIntosh M, Schwartz M, Nunes V, Macek JR. M, *et al.* Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet* 89:653, 1992.
- Osborne L, Alton EFWF, CTL. CFTR intron 9 poly-T tract length in men with congenital bilateral absence of vas deferens. *Pediat. Pulmonol suppl.* 10:125 (Abstr.), 1994.
- Ostedgaard LS, Sheppard DN, Welsh MJ. Analysis of mutations in the first nucleotide-binding domain of CFTR wick one associated with pancreatic sufficiency. *Pediat Pulmonol suppl* 10:8 (Abstr.), 1994.
- Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ. Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod* 8:215, 1993.
- Piccioto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Grengard P, Neirin AC. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 267:12742-52, 1992.
- Pritchard DJ. Cystic fibrosis allele frequency, sex ratio anomalies and fertility: a new theory for the dissemination of mutant alleles. *Hum Genet* 87:671, 1991.
- Pritchard DJ, Hickman GR, Nelson R. Sex ratio and heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 58:290, 1983.
- Rich DP, Gregory RJ, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. Effect of deletion mutation on the function of CFTR chloride channels. *Receptor Channels* 1:221, 1993.
- Riordan JR, Alon N Grzelczak Z, Dubels S, Sun S. The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) superfamily. *Adv Exp Med Biol.* 290:191991.
- Riordan JR, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066, 1989.
- Romeo G, Devoto M. Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. *Hum Genet* 85:391, 1990.
- Romeo G, Devoto M, Gallieta LJV. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Human Genet* 87:1, 1989.
- Rommens JM, Iannuzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059, 1989.
- Schwartz M, Johansen HK, Kock C, Brandt NJ. Frequency of $\Delta F508$ mutation on cystic fibrosis chromosome in Denmark. *Human Genet* 85:427, 1990.

- Schwartz M, Srensen N, Brandt NJ, Hgdall E, Holm T. High incidence of cystic fibrosis on the Faroe Islands: A molecular and geographical study. *Hum Genet* 95:703, 1995.
- Sereth H, Shoshani T, Bashan N, Kerem BS. Extended haplotype analysis of cystic fibrosis mutations and its implications for the selective advantage hypothesis. *Hum Genet* 92:289, 1993.
- Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, Jaume-Roig B, Balassopoulou A, Schwartz M, Taillandier A. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in population genetics. *Hum Genet* 84:449, 1990
- Shaap T, Cohen MM. A proposed model for the inheritance of cystic fibrosis. In *cystic fibrosis: projections into the future*, ed. JA Mangos, RC Talamo, 291-303. New York: Stratton, 1976.
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Wels MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease form channel with altered pore properties. *Nature* 362:160, 1993.
- Shier WT. Increased resistance to influenza as a possible source of heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Med Hypothesis* 5:661, 1979.
- Shwachman H, Kowalski M, Khaw KT. Cystic fibrosis: a new outlook, *Medicine (Baltimore)* 56:129, 1977.
- Sing CF, Risser DR, Howatt WF, Erickson RP. Phenotypic Heterogeneity in cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 13: 179, 1982.
- Smith LS, Nasr SZ, Iannuzzi MC, Collins FS. An African-American cystic fibrosis patient homozygous for a novel frameshift mutation associated with reduced CFTR mRNA levels. *Hum Mutat* 2:148, 1993.
- Sombrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor La. Press, USA 1989.
- Shoshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, *et al.* Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet* 50:222, 1992.
- Strong TV, Koh J, Tsui L-C, Collins FS. Analysis of CFTR transcription. *Pediat. Pulmon (suppl)* 5:1195, 1990.
- Strong TV, Wilkinson DJ, Mansoura MK, Devor DC, Henze K, *et al.* Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with de cAMP-activate chloride conductance. *Hum Mol Genet* 2:225, 1993.

- Stuart AB, Burdon MG. Frequency of the cystic fibrosis gene. *Lancet* 11:1521, 1974.
- Super M, Van Schalkwyk DJ. Heterozygote advantage in cystic fibrosis: mosquito test. *Clin Genet* 16:65, 1979.
- Tabcharini JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, *et al.* Multi-ion pore behavior in the CFTR chloride channel (see comments). *Nature* 366:79, 1994.
- Taussing LM, Lobeck CC, di Sant' Agnese PA, Ackerman DR, Kattwinkel J. Fertility in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 287:586, 1972.
- Ten Kate LP. A method for analysing fertility of heterozygotes for autosomal recessive disorders, with special reference to cystic fibrosis, Tay-Sachs disease and phenylketonuria. *Ann Hum Genet* 10:287, 1977.
- Thomas PJ, Shenbagamurthi P, Sondek J, Hulihan JM, Pedersen PL. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *J Biol Chem* 267:5727, 1992.
- Tomashefski JF Jr, Bruce M, Stern RC, Dearborn DG, Dahms B. The pathology of pulmonary air cysts in cystic fibrosis. Relation to radiologic findings and history of pneumothorax. *Hum Pathol* 16:253, 1985.
- Tortenson OL, Humphrey GB, Edson JR. Cystic fibrosis presenting with severe hemorrhage due to vitamin K malabsorption: A report of three cases. *Pediatrics* 45:857, 1970.
- Trezis AE, Buchwald M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 353:434, 1991.
- Tsui L-C, Buchwald M. Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. *Adv Hum Genet*. 20:153, 1991.
- Tsui L-C. editorial. *Hum Genet*. 85:391, 1990.
- Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations (Reviews). *TIG* 8:392, 1992.
- T.C. Suen y L-C Tsui com. personal.
- Valman HB, France EN. The vas deferens in cystic fibrosis. *Lancet* 2:566, 1969.
- Ward CI, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant protein. *J Biol Chem* 269:25710, 1994.
- Welsh MJ, Smith AE. Cystic Fibrosis. *Scientific American* 273:36, 1995b.

- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanism of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73:1251, 1993.
- Welsh MJ, Tsui LC, Boat FT, Beaudet AI. Cystic Fibrosis. In the metabolic and molecular bases in inherited disease, de, C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle, 3:3799-3876. New York, McGraw-Hill Inc., 1995a.
- White MB, Leppert M, Nielsen D Zielensky J, Gerrard B, *et al.* A de novo cystic fibrosis mutation: CGA (Arg) to TGA (Stop) at codon 851 of the CFTR gene. *Genomics* 11:778, 1991.
- Will K, Dork T, Stuhmann M, Vonder Hardt H, Ellenmutter T *et al.* Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Hum Mutat* 5:210, 1995.
- Will K, Reiss R, Dean M, Schloseer M, Slomsky R, *et al.* CFTR transcripts are undetectable in lymphocytes and respiratory epithelial cells of a CF patient homozygous for the nonsense mutation R553X. *J Med Genet* 30:833, 1993.
- Wilkinson DJ, Strong TV, Collins FS, Dawson DC. CFTR activation: stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Pediat Pulmonol suppl* 10:3 (abst.), 1994.
- Wright SW, Morton EN. Genetics Studies on cystic fibrosis in Hawaii. *Am J Hum Genet* 20:157, 1968.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell M, Chu CS, Dalemans W, Pavirani A. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res.* 19:5417, 1990.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu CS, Dalemans W, Pavirani A. The cystic fibrosis gene has a "house-keeping"-type promoter and is expressed at low levels in cell at epithelial origin. *J Biol Chem* 226:9140, 1991.
- Zielenski J, Markiewicz D, Paradis N, Anacleto AI. Identification of the M1101K mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet* 52:609, 1993.
- Zielensky J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, *et al.* Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10:214, 1991.
- Zielensky J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelezaik Z, *et al.* Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res.* 19:5417, 1991.