

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE
MUTACIONES NUEVAS EN EL GEN DE FIBROSIS
QUISTICA Y DETECCION DE PORTADORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
EN BIOLOGIA CELULAR

P R E S E N T A

BIOL. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA

286754

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA SOFIA OROZCO OROZCO

2000



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana en el Instituto Nacional de Pediatría SSA, bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco Orozco y la asesoría del Dr. Carlos Cruz y la Dra. Ariadna Estela González Del Angel.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca Nacional de Estudios de Maestría (Biología Celular) No. 124763.

**Uno es algo que vive,
Algo que busca pero encuentra
Algo como hombre o como Dios o yerba
Que en el duro saber lo de este mundo
Halla el milagro en actitud primera.**

Jaime Sabines



A mi hijo Moisés Sebastián, mi tesoro, que es mi gran impulso para seguir adelante.

A Ti quién ahora formas parte de mí, y eres uno de mis más grandes anhelos.

A Moy, quien es un pilar fundamental en mi vida, por su gran amor y apoyo.

A mis Padres, que con amor siempre me han brindado su apoyo incondicional.

A mis hermanos Juan Ramón, Mario Alberto y Laura Rosa, por su entusiasmo y superación constante.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Lorena Orozco, Directora de este trabajo, quien me brindó su apoyo para llevar a cabo este logro más. Así como por su orientación y enseñanzas.

A todos los que han formado parte de la línea de investigación de fibrosis quística, que gracias a su trabajo y persistencia se ha logrado integrar grandes avances.

A los miembros del jurado de esta Tesis: a la Dra. Alessandra Carnevale, Dra. Sara Frías, Dra. Ariadna González, Dr. Carlos Cruz, Dr. Miguel Angel Alcántara, Dra. Lucía Taja y a la Dra. Lorena Orozco, por su tiempo, interés y valiosos comentarios.

A la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística, que por medio del Dr. José Luis Lezana, hemos recibido un gran apoyo.

A todos los pacientes y sus familiares quienes depositan en nosotros una parte de su fe y esperanza, lo cual nos alienta todos los días para seguir.

A la Dra. Carnevale por su gran apoyo y confianza.

A Mónica Domínguez y Bety Blanco, gracias.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular y en general a todos los que de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	20
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
APÉNDICE.....	70

LISTA DE FIGURAS.

- Fig.1. Representación esquemática de la producción de sudor y del transporte de electrolitos en una glándula sudorípara normal.
- Fig. 2. Localización del gen FQ en el cromosoma 7.
- Fig. 3. Representación hipotética del gen FQ y de la proteína CFTR.
- Fig. 4. Distribución de las mutaciones en el gen FQ.
- Fig. 5. Distribución geográfica de las mutaciones FQ.
- Fig. 6. Consecuencias Moleculares de las mutaciones FQ.
- Fig. 7. DNA Extraído de linfocitos de sangre periférica
- Fig. 8. Análisis por PSM de la mutación $\Delta F508$
- Fig. 9. Análisis por PSM de la mutación G542X.
- Fig.10. Análisis por PSM de la mutación N1303K.
- Fig. 11. Análisis por PSM de la mutación $\Delta I507$.
- Fig. 12. Análisis del exón 13 del gen FQ por SSCP
- Fig. 13. Identificación de la mutación S549N.
- Fig. 14. Búsqueda dirigida de la mutación S549N
- Fig. 15. Caracterización de la mutación W1098C
- Fig. 16. Caracterización de la mutación P750L.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones CFTR con mayor frecuencia a nivel mundial

Tabla 2. Mutaciones CFTR con menor frecuencia a nivel mundial

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para PSM.

Tabla 4. Programa de PCR para PSM para el análisis de las 4 mutaciones más frecuentes.

Tabla 5. Exones del gen CFTR analizados por SSCP

Tabla 6. Mutaciones identificadas por SSCP

Tabla 7. Frecuencia de las mutaciones en pacientes mexicanos.

Tabla 8. Distribución geográfica de las mutaciones FQ en poblaciones hispanas.

Tabla 9. Clasificación de pacientes según su genotipo.

Tabla 10. Correlación genotipo-fenotipo.

Resumen

La fibrosis quística (FQ) se caracteriza por una afección pulmonar crónica, insuficiencia pancreática y elevación de cloruros en sudor, es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la población caucásica; uno de cada 2,000 a 3,000 recién nacidos vivos manifiestan la enfermedad, pues presentan dos copias anormales del gen responsable. Aproximadamente uno de cada 25 de los individuos de poblaciones de Europa del Norte son portadores asintomáticos. En México la incidencia real de este padecimiento no se conoce y en muchas ocasiones se enmascara con otros padecimientos frecuentes tales como desnutrición, enfermedades de vías respiratorias y diarreas. En 1989 se encontró en el 1% de las autopsias realizadas en el INP, por lo que es posible que esta enfermedad esté subdiagnosticada.

El gen responsable de la FQ se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31), consta de 250 Kb y codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembranal (CFTR) que es un canal de cloro. Hasta la fecha se conocen más de 850 mutaciones diferentes que afectan este gen. La gravedad de la enfermedad depende del tipo de mutación y se ha considerado a la función pancreática como el principal criterio para clasificar la enfermedad como leve o grave. Dado que la FQ es una enfermedad letal para la cual no existe un tratamiento definitivo, es necesario conocer las mutaciones que afectan a nuestra población y desarrollar estrategias para detección de portadores, con la finalidad de establecer un diagnóstico temprano, otorgar tratamiento oportuno y desarrollar programas de prevención. En este trabajo nos propusimos 1) identificar las mutaciones presentes en pacientes con diagnóstico clínico de FQ, 2) Correlacionar el genotipo con el fenotipo de los casos índice, 3) Detectar portadores de las 4 mutaciones más frecuentes en la población Mexicana, en los familiares de primer grado y 4) estimar la frecuencia de las mutaciones detectadas en la población mexicana y compararla con otras poblaciones a nivel mundial

Se realizó un análisis molecular para la detección de las mutaciones responsables de la FQ, en 112 familias afectadas no emparentadas. El análisis molecular se inició con una búsqueda preliminar de las 4 mutaciones más frecuentes en la población Mexicana. Este tamizaje inicial permitió la identificación de cerca del 50% de los cromosomas analizados. En aquellos pacientes que después de esta primera búsqueda, presentaron al menos un alelo FQ sin caracterizar, se realizó un análisis de los exones 7, 10, 11, 13, 17, 20 y 21 del gen CFTR, los cuales son considerados como sitios más susceptibles a presentar mutaciones, este análisis se llevó a cabo por la técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP). En este estudio se identificó un total de 15 mutaciones diferentes, en donde se incluyen dos mutaciones nuevas en el gen CFTR: W1098C y P750L, con lo cual se identificó el 60% de los cromosomas FQ. El porcentaje de alelos mutados caracterizados en la población estudiada es todavía bajo, comparado con lo observado en otras poblaciones. Por lo que es necesario contar con otras estrategias moleculares para aumentar la eficiencia del rastreo de las mutaciones presentes en la región codificante del gen CFTR y así caracterizar el total de alelos alterados en la población Mexicana con FQ. El análisis del gen CFTR descrito en este trabajo claramente demuestra la alta heterogeneidad de nuestra población afectada con FQ, lo cual puede explicarse por la compleja composición étnica de la población Mexicana.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva letal, más frecuente en la población caucásica; uno de cada 2,000 a 3,000 recién nacidos vivos manifiesta la enfermedad (1). En este padecimiento los afectados son homocigotos, es decir presentan las dos copias del gen responsable alteradas o mutadas; mientras que uno de cada 25 de los individuos de poblaciones de Europa del Norte son portadores asintomáticos, es decir son heterocigotos, sus células tienen una versión mutada y una normal del gen FQ y por tanto no manifiestan la enfermedad. En México la incidencia real de este padecimiento no se conoce y en muchas ocasiones se enmascara con otros padecimientos comunes en nuestro país como desnutrición, problemas gastrointestinales y problemas respiratorios crónicos (2).

El defecto básico es afección generalizada de las células epiteliales por impermeabilidad de la membrana apical al ión cloro, lo que conduce a la presencia de secreciones exocrinas viscosas que alteran la función de las glándulas sudoríparas y los sistemas respiratorio, digestivo y genitourinario (3).

ALTERACIONES PATOLÓGICAS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La FQ tiene una expresividad muy variable y es progresiva. La afección del tracto respiratorio se caracteriza por la producción de secreciones mucosas espesas y con mayor capacidad de adherencia que se acumulan en el lumen de las vías respiratorias y propician un proceso inflamatorio localizado e infecciones recurrentes, principalmente por *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Este proceso genera bronquiectasias y enfisema, que conducen a un cuadro restrictivo-obstrutivo en las vías respiratorias con hipertensión arterial pulmonar y posteriormente *cor-pulmonale* crónico (4). Las lesiones inflamatorias crónicas de la mucosa generan pedunculaciones y formación de pólipos nasales (5). La afección respiratoria y las infecciones persistentes y resistentes al tratamiento son las principales causas de muerte entre la primera y la cuarta décadas de la vida (6).

Así, la manifestación respiratoria inicial de la enfermedad es la tos intermitente y productiva, con esputo purulento de color verde cuando hay infección por *P. aeruginosa* y hemoptisis en las fases media y terminal.

Las alteraciones en el sistema digestivo comprometen al tracto gastrointestinal y las glándulas anexas; aunque son frecuentes, generalmente no amenazan la vida del paciente. El 85% de los pacientes presenta insuficiencia pancreática, causada por obstrucción progresiva de los ductos, con dilatación de los acinos y destrucción de la región exocrina. Estas áreas son reemplazadas por tejido fibroso y graso, con formación de pequeños quistes (7). Los hallazgos patológicos descritos en este órgano permiten el diagnóstico postmortem en casos de diagnóstico dudoso (8). La insuficiencia pancreática es la causa de la malabsorción intestinal, la desnutrición y los cuadros carenciales de vitaminas A, D, E, K, zinc, etc. (9-12). También se ha observado que a partir de la segunda década de la vida, la función endócrina del páncreas se altera en el 27 al 42% de los pacientes, pero sólo el 8% de los casos desarrolla diabetes insulino-dependiente (7,13,14). Por otro lado, se ha reportado que existen lesiones hepáticas hasta en el 25% de las autopsias de pacientes con FQ (15), y 2 al 15 % de los casos desarrolla cirrosis biliar (16). Entre el 5 y 10% de los recién nacidos con FQ presentan ileo meconial, causado por obstrucción intestinal distal, por la acumulación de material muco-fecaloide viscoso, probablemente por insuficiencia enzimática temprana (17).

El 95% de los varones con FQ presenta infertilidad por alteración de las estructuras Wolffianas, como son la atrofia de conductos deferentes, epidídimo, vesículas seminales y la ausencia bilateral de los vasos deferentes, debido a cambios degenerativos ocasionados por obstrucción de estos conductos desde la vida intrauterina (18-21). La infertilidad ocasional de las mujeres con FQ se debe a alteraciones en el moco cervical que bloquea la entrada del espermatozoides a la cavidad uterina. En la mayoría de las pacientes fértiles, los embarazos han tenido un curso normal (22).

Gracias a los estudios, de gran valor clínico, realizados en 1953 por Di Sant'Agnese, quien observó que los pacientes con FQ perdían una gran cantidad de sal a través del sudor

(23), se desarrollo una prueba de gran valor clínico para el diagnóstico de la enfermedad: la determinación de cloruros en sudor. Estas concentraciones pueden medirse a través de un iontofofotómetro después de la estimulación con pilocarpina y un valor mayor a los 60mEq/l, es sugestivo de que el paciente presenta fibrosis quística (3).

La elevación de cloro en el sudor de los pacientes con FQ, se debe a la falla en la reabsorción del ión cloro en los ductos de las glándulas sudoríparas (24), lo cual puede ser riesgoso en caso de pérdida salina excesiva, ya que ocasiona alcalosis hipoclorémica e hiponatémica, sobre todo en presencia de vómito, diarrea o exposición prolongada al sol (Fig. 1)

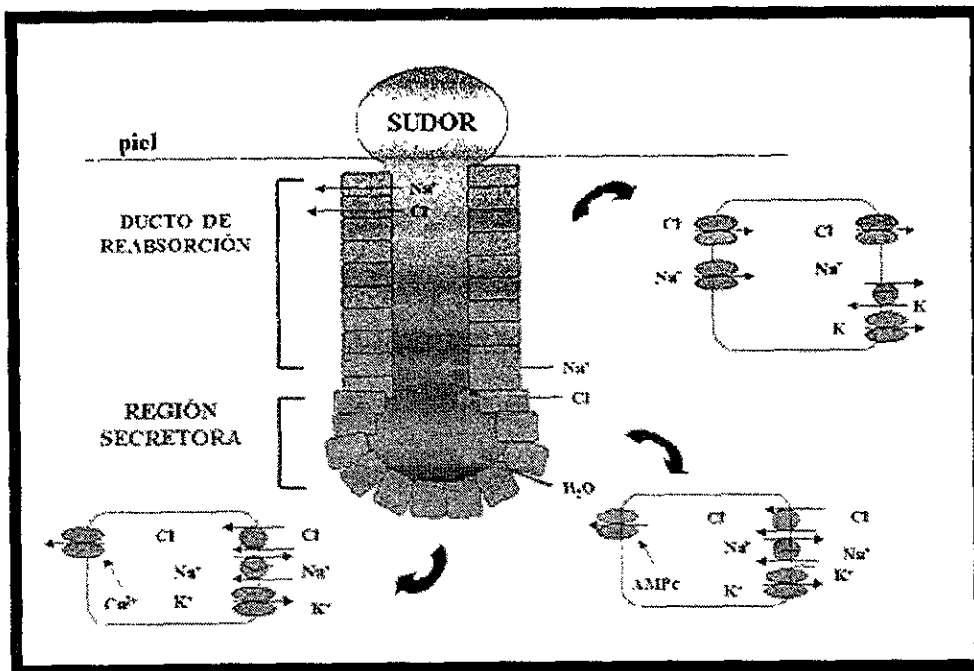


FIGURA 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PRODUCCION DE SUDOR Y DEL TRANSPORTE DE ELECTROLITOS EN UNA GLANDULA SUDORIPARA NORMAL. Se muestra el mecanismo celular del transporte de electrolitos en las células epiteliales del ducto y el tallo de la glándula sudorípara.

EL GEN FQ

En 1989 se clonó el gen responsable de la FQ mediante las estrategias de caminata y salto cromosómico, a partir de marcadores genómicos ligados al gen (clonación posicional) (25-27). Posteriormente se dilucidó su secuencia completa, se caracterizaron algunas mutaciones responsables de la enfermedad y se dedujo la secuencia de su producto proteico (27, 28). Este gen se localiza en la región q31 del cromosoma 7 (Fig. 2), mide 250 Kb y consta de 27 exones (Fig. 3a). La región 5' de este gen se caracteriza por un gran contenido de G-C (aproximadamente un 65%) y no presenta caja TATA, de tal manera que el gen CFTR tienen un promotor similar al de los genes constitutivos, sin embargo su expresión es variable.

El transcrito maduro es de 6.5 Kb que traduce una proteína de 1,480 aminoácidos (Fig. 3b y 3c) detectable en una gran variedad de tejidos, especialmente en pulmón, páncreas, glándulas sudoríparas, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales, tracto reproductivo e intestino (26).

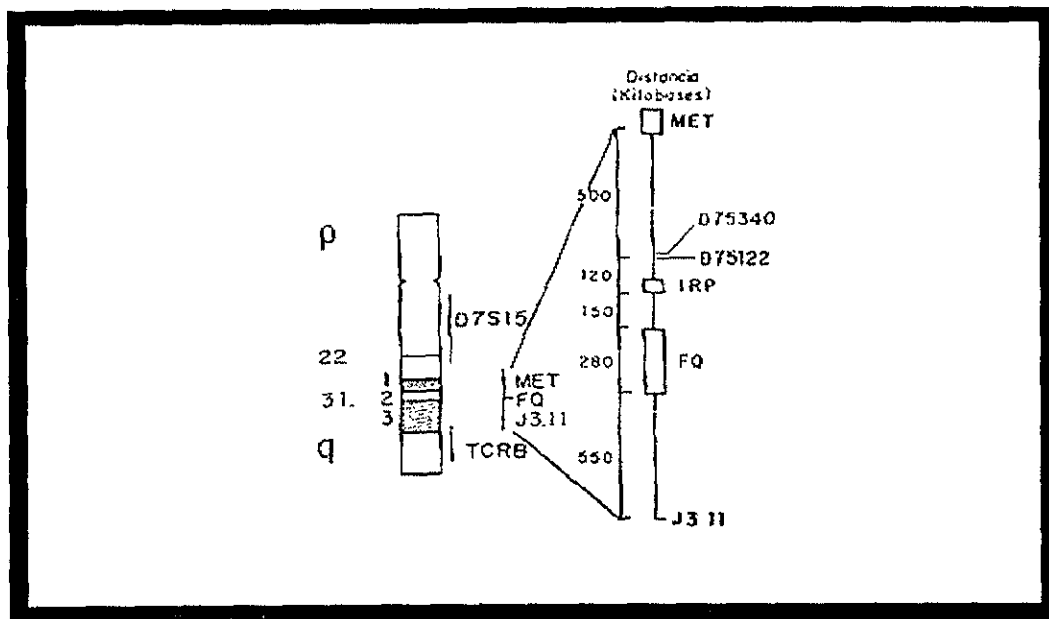


FIG 2. LOCALIZACIÓN DEL GEN *FQ* EN EL CROMOSOMA 7. A la izquierda se muestra un diagrama del cromosoma 7 y a la derecha la región q31-33 donde se localiza el gen *FQ* y los marcadores genéticos aledaños (Rommens JM *et al.* 1989).

LA PROTEINA CFTR

El gen FQ codifica para una proteína transmembranal que es un canal de cloro y por su papel fisiológico se denomina proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ (CFTR, del inglés cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (28). Esta proteína tiene homología estructural con la superfamilia de las proteínas ABC (cassette de unión a ATP) (28, 29). Estas son proteínas integrales de membrana que contienen varios dominios funcionales: dos dominios de unión a nucleótidos y dos sitios de glicosilación (Fig. 3c). La proteína CFTR pesa 170 kd y está constituida por dos porciones repetidas, cada una con un dominio transmembranal (TMD) y un dominio que interacciona con ATP (NBD). El dominio R (regulador) es característico de esta proteína y divide a las dos porciones repetidas; su nombre se debe a que presenta varios sitios de fosforilación que regulan la función del peptido. Se ha demostrado en líneas celulares eucariontes que la proteína CFTR forma y funciona como un canal de cloro dependiente de AMPc y que directa o indirectamente regula otros canales endógenos para el cloro, estimulados por AMPc (29, 30).

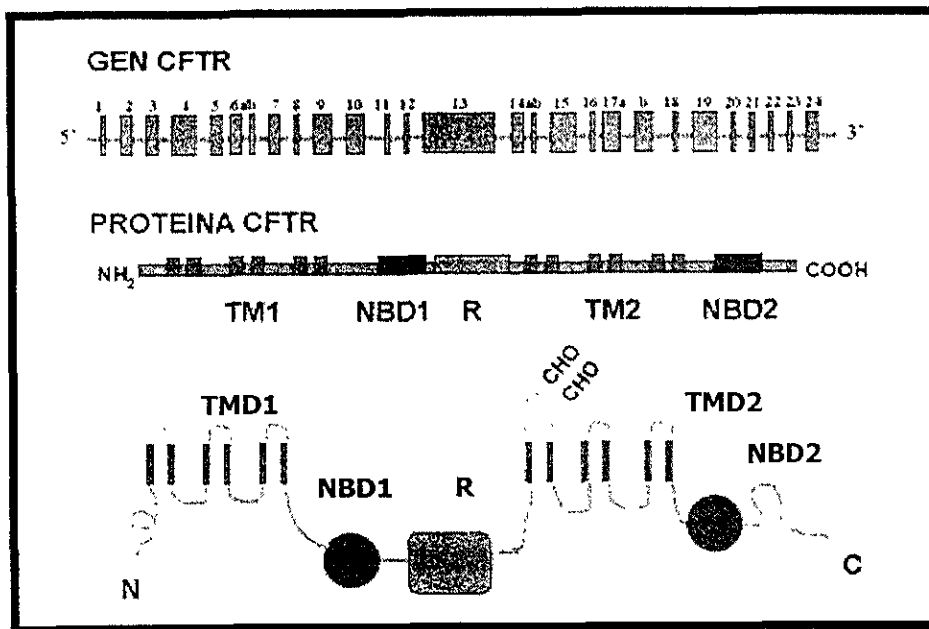


FIG 3. REPRESENTACIÓN HIPOTÉTICA DEL GEN FQ Y DE LA PROTEÍNA CFTR. a) Estructura del gen FQ; los rectángulos verticales representan los 27 exones del gen CFTR. b) estructura primaria de la proteína CFTR y sus dominios principales. c) Modelo de la estructura secundaria de la proteína (Chang X, *et al.* 1994).

La proteína CFTR está anclada a la membrana citoplasmica por 12 segmentos hidrofóbicos (TM1-TM12) organizados en dos dominios transmembranales (TMD1 y TMD2) (31). Los 12 segmentos que atraviesan la membrana forman un poro que constituye el canal de cloro. Se ha demostrado que TM1 (1, 32), TM2 (33, 34), TM6 (34, 35) y TM12 (35) son fundamentales en la formación del poro (36). Los modelos actuales de la proteína CFTR predicen que entre los segmentos que atraviesan la membrana se encuentran 6 asas extracelulares y 4 asas citoplasmáticas. Existen dos sitios de glicosilación en los dos residuos de asparagina (N894 y N900) identificados en la cuarta asa extracelular (37, 38).

Los dominios de unión a nucleótidos (NBD) tienen secuencias que se encuentran conservadas en las proteínas de unión a ATP (26). No existe gran similitud entre las estructuras primarias de los dos dominios NBD, ya que sólo contienen el 29% de homología entre sus aminoácidos. Así mismo, estudios funcionales demostraron que NBD1 y NBD2 no contribuyen a la regulación del canal de la misma manera (39). Se ha propuesto que NBD1 se fosforila después de una fosforilación parcial del dominio R y permite la apertura del canal, mientras que la fosforilación completa del dominio R conduce a la fosforilación de NBD2 causando el cierre del canal (40).

De las proteínas ABC, el dominio R es exclusivo de la proteína CFTR, está codificado por el exón 13 y se localiza en la parte citoplasmática de la membrana apical (41). Este dominio tiene una alta proporción de aminoácidos polares (30%) y varios sitios de fosforilación que son importantes para el funcionamiento del canal (42, 43). Así, el grado de fosforilación de los diferentes sitios del dominio R puede tener un efecto sobre la actividad del canal (44). Parece ser que el dominio R al fosforilarse por la proteína cinasa A cambia su conformación y de esta forma se regula la actividad del canal (45).

MUTACIONES EN EL GEN FQ

Hasta la fecha se han descrito más de 800 mutaciones diferentes en el gen CFTR, reportadas por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística (46); la mayoría de estas mutaciones se localizan en la región codificante, así como en regiones unión exón-intrón. Además se han descrito cerca de 100 cambios en la secuencia del gen, definidos como variaciones benignas o polimorfismos. En la tabla 1 se muestra la lista de las mutaciones FQ más frecuentes en la población mundial.

En general, la naturaleza de las mutaciones es diversa: cerca del 50% son de sentido erróneo y el resto son sin sentido, pequeñas deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura y mutaciones que alteran la maduración normal del mRNA. También se han descrito deleciones de un solo aminoácido, dos grandes deleciones que no alteran el marco de lectura (47) y deleciones complejas como la 2055del9→A y la 1924del7 reportadas en la población Mexicana (48).

La distribución de las mutaciones en el gen FQ no parece ser al azar. Se ha detectado una alta frecuencia de mutaciones, particularmente del tipo de sentido erróneo, que cambian un aminoácido por otro, en sitios específicos (hotspots) dentro de los exones 4, 7, 11, 17b y 20 (Fig. 4) (49).

La alta heterogeneidad del espectro de las mutaciones en el gen CFTR ha sido observada en varios países, particularmente en el Sur de Europa y América Latina (50-54) (Fig. 5).

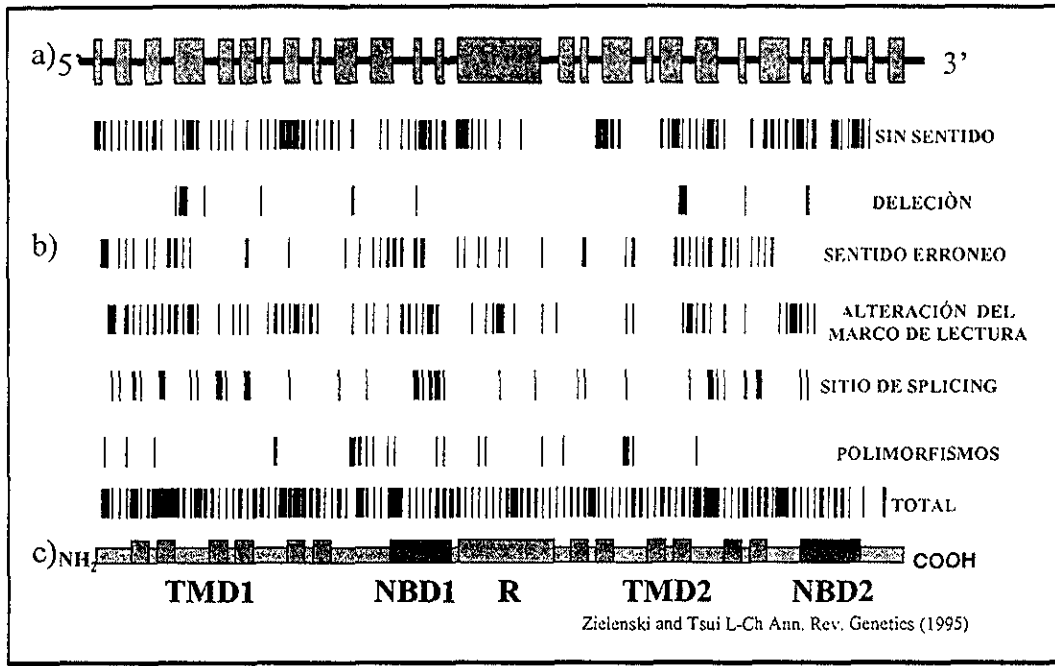


FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN FQ. a) Gen FQ. b) Las líneas verticales representan cada una de las mutaciones caracterizadas. c) Dominios de la proteína.

La mutación más frecuente a nivel mundial se conoce como $\Delta F508$, se localiza en el exón 10 que codifica para una parte del dominio NBD1, es una deleción de tres pares de bases que elimina el codón para la fenilalanina en la posición 508 de la proteína y se ha detectado en el 67% de los cromosomas FQ a nivel mundial (55). Sin embargo, presenta una amplia variación entre las diferentes poblaciones (25) que oscila entre 17.9% (56) y el 85% de los alelos afectados con FQ (55).

Con base al análisis de haplotipos se cree que esta mutación se originó hace aproximadamente 52,000 años por un sólo evento mutacional (57). En Europa, la distribución geográfica de la $\Delta F508$ sigue un gradiente por el cual la frecuencia aumenta de Sureste a Noroeste (50). En México, la frecuencia de esta mutación (39%) es significativamente menor a la reportada a nivel mundial e incluso a la de España (58), lo cual puede ser el reflejo del origen étnico de nuestra población, donde la presencia de mutaciones indígenas y otras mutaciones de origen Europeo, probablemente diluyeron la frecuencia de la $\Delta F508$.

La mayoría de las otras mutaciones del gen FQ son poco comunes, aunque algunas son frecuentes en ciertas poblaciones. Por ejemplo, la segunda mutación más frecuente a nivel mundial (G542X) que se encuentra en tan sólo el 3.4% de los cromosomas FQ, tiene una frecuencia del 25% en las Islas Canarias y del 8% en toda España (59). Con base al análisis de haplotipos, se ha postulado que la G542X también se originó de un solo evento mutacional y fue introducida a España por los fenicios hace 2500 a 3000 años y luego a Latinoamérica por los conquistadores. Así, en México se encuentra en el 6.2% de los cromosomas FQ, similar a la reportada en hispanos(60).

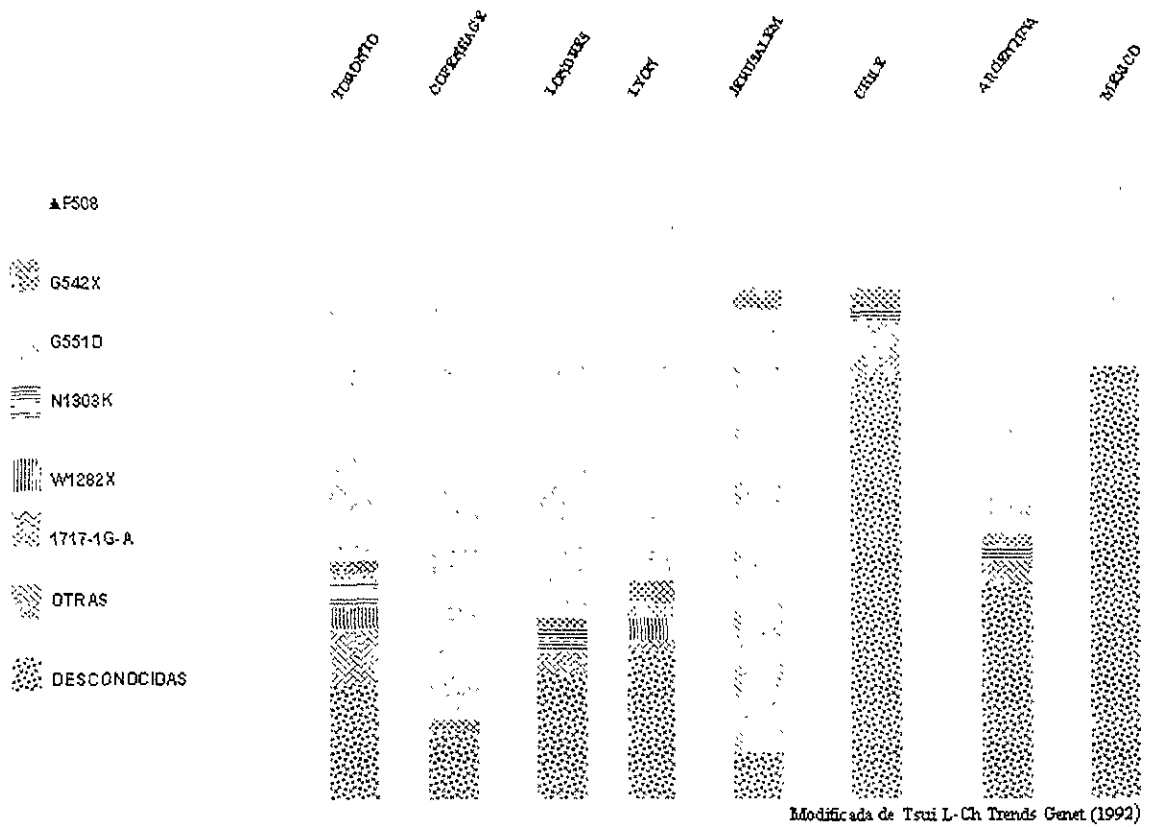


FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS MUTACIONES FQ. Se representa la distribución geográfica de 6 de las mutaciones más frecuentes y las regiones donde predominan cada una de éstas.

BASES MOLECULARES DE LA DISFUNCION DEL CANAL DE CFTR

Con la finalidad de entender mejor la fisiopatología de la FQ, las mutaciones se han clasificado en cinco clases generales de acuerdo a la manera en que afectan a la proteína.

CLASE I: MUTACIONES QUE BLOQUEAN LA SINTESIS DE LA PROTEINA.

Cerca de la mitad de las mutaciones en el gen FQ evitan la formación de un polipéptido CFTR de tamaño normal. Entre las mutaciones de esta clase se encuentran aquellas que producen codones de terminación (18%), corrimiento del marco de lectura (22%), o splicing aberrante del mRNA (8%) (Fig. 6). Varias de las mutaciones sin sentido y mutaciones que generan un corrimiento en el marco de lectura causan ausencia de la proteína (61-64).

CLASE II: MUTACIONES QUE AFECTAN EL PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL.

La biosíntesis de la CFTR requiere pasos de maduración complejos y solamente el 20 al 25% de la CFTR silvestre inmadura adquiere una conformación estable, que es transportada a la membrana plasmática (65). Así, algunas mutaciones como la $\Delta F508$, bloquean la maduración de la proteína generando un canal CFTR sin actividad. La proteína con la $\Delta F508$ adopta una conformación tridimensional anormal que no llega a la membrana de las células epiteliales (66, 67) y es degradada rápidamente en el retículo endoplásmico (RE) por el sistema ubiquitina-proteasoma (vida media de 0.5h) (68, 69) (Fig.6). Es interesante el hecho de que este atrapamiento de la proteína $\Delta F508$ es reversible *in vitro* a temperaturas subfisiológicas (23°-30°C) (70). Bajo estas condiciones, la proteína mutante puede pasar del RE al aparato de Golgi, ser glicosilada y alcanzar la membrana citoplasmática (70), formando un canal de cloro con propiedades similares a la de la CFTR silvestre. Esto resulta de gran interés para el posible tratamiento de la enfermedad.

CLASE III: MUTACIONES QUE AFECTAN LA REGULACION DEL CANAL DE CLORO.

Las mutaciones de esta clase son aquellas que generan proteínas que parecen estar completamente procesadas y correctamente localizadas en la membrana apical, pero que no pueden ser reguladas adecuadamente como canal iónico (Fig. 6). En algunas de estas mutaciones, los aminoácidos afectados son aquellos que participan en la unión de ATP en los dominios NBD's o en la fosforilación en el dominio R (71). El grado de alteración puede variar desde la pérdida grave de la función por una disminución o ausencia en la respuesta a la estimulación por ATP (G551D y S1255P), hasta una leve reducción de la actividad del canal (G551S, G1244E y G1349D) (39, 45).

CLASE IV: MUTACIONES QUE AFECTAN LA CONDUCTANCIA O LA APERTURA DEL CANAL DE CLORO.

Estas mutaciones se localizan en las regiones del gen que corresponden a algunos de los segmentos TM de la proteína y altera la conductancia del canal aunque la regulación es adecuada (72). Ejemplos de mutaciones que se consideran como leves y afectan aminoácidos localizados en TMD1 son: la R117H en la región TMD2, la G314E en TM5 y la R334W, R347P y R347H en TM6. El grado de reducción de la conductividad que producen algunas mutaciones se ha estudiado sólo *in vitro* y sugiere que estas mutantes producen una CFTR madura, totalmente glicosilada (73), que llega a la membrana apical, similar a lo que ocurre con la CFTR silvestre (34), utilizando agonistas de AMPc para estimular corrientes de cloro en membranas apicales, se observó que estos canales mutantes están regulados por fosforilación y nucleótidos intracelulares y mantienen su selectividad al cloro. Sin embargo, sus poros tienen propiedades alteradas que generan corrientes reducidas de este anión.(73). La CFTR silvestre normalmente funciona como un poro multi-iónico, que permite el paso simultáneo de varios iones Cl⁻ a la vez. Las mutaciones en la posición 347 reducen la

conductancia del canal que funciona como un poro mono-iónico. Esto sugiere que estas mutaciones probablemente también alteran la salida de cloro a través de CFTR.

CLASE V: MUTACIONES QUE CAUSAN REDUCCION EN LA SINTESIS DE LA PROTEINA

Las mutaciones de esta clase pueden incluir mutaciones en el promotor que reducen la transcripción, mutaciones puntuales que conducen a un splicing erróneo del transcrito o a substituciones de aminoácidos que causan una maduración ineficiente de la proteína. El efecto final de todas estas mutaciones sería una disminución en la cantidad y por lo tanto en la función de la proteína. La mayoría de ellas son las que generan splicing alterado. Los alelos mutantes pueden transcribir una pequeña cantidad de mRNA normal, además del mRNA producto de un splicing aberrante cuya función es ineficiente. Varias mutaciones con sentido erróneo como la P574H y la A455E localizadas en NBD1 causan un efecto similar. Estudios bioquímicos recientes han demostrado que ambas mutantes producen canales de cloro localizados en el epitelio, con poros con propiedades normales y regulados por fosforilación dependiente de AMPc y nucleótidos intracelulares, pero con disminución de la corriente apical de cloro porque la cantidad de proteína madura producida por estas mutantes solo es del 10 al 15% de la silvestre, por una alteración en su procesamiento (14,18). De hecho, la probabilidad de encontrar abierto el poro de la CFTR A455E fue equivalente a la del silvestre, y la de la proteína P574H fue aún mayor que la silvestre. Por ello se ha sugerido que estas mutantes se asocian a un fenotipo leve (suficiencia pancreática) porque compensan los efectos de procesamiento defectuoso al maximizar la función del canal.

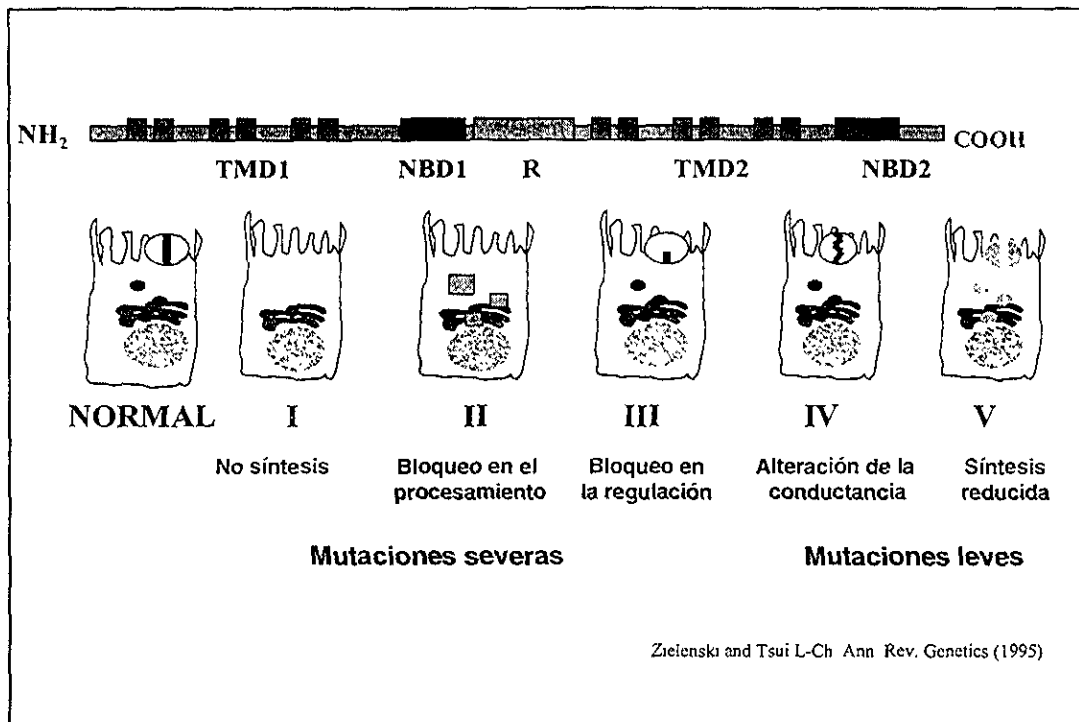


FIGURA 6. CONSECUENCIAS MOLECULARES DE LAS MUTACIONES FQ. Se esquematiza el daño molecular del canal CFTR de acuerdo con las diferentes clases de mutaciones FQ.

CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO

Dado el espectro de las consecuencias moleculares de las mutaciones (genotipo), el cuadro clínico de la FQ es muy heterogéneo. Estudios recientes han tratado de encontrar las características clínicas comunes entre los pacientes de FQ con un mismo genotipo, con la finalidad de definir la correlación entre el fenotipo y el genotipo (74-77).

De todos los síntomas analizados, solamente la función pancreática correlaciona directamente con el genotipo de los pacientes. En general, los pacientes con insuficiencia pancreática (IP) (78-79) son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones graves (mutaciones de clase I, II, o III), mientras que los pacientes con SP presentan al menos un alelo con una mutación con función residual (mutaciones de clase IV o V); así, las mutaciones leves son dominantes sobre las graves.

Las manifestaciones pulmonares son indistinguibles entre pacientes con diferente genotipo o presentan una alta variabilidad entre familiares con mutaciones idénticas. Se cree que en parte esta variabilidad se puede atribuir al medio ambiente y a otros factores genéticos. Sin embargo, recientemente en un modelo de ratón con FQ, se ha encontrado que hay otro canal de cloro apical activado por calcio intracelular. Parece ser que la expresión de estos canales sí correlaciona con la severidad de la enfermedad: los animales con epitelios que expresan este canal calcio-dependiente tuvieron enfermedad leve, mientras que aquellos con epitelios que carecían de este canal presentaban enfermedad grave (80).

OTROS FENOTIPOS

Una característica clínica persistente entre pacientes masculinos con FQ es la azoospermia obstructiva secundaria y la ausencia bilateral de los vasos deferentes (20). De hecho una condición autosómica recesiva similar, pero que no cursa con manifestaciones respiratorias o digestivas aparentes de FQ, es la ausencia bilateral congénita de vasos deferentes (CBAVD)

(81). El 50-60% de estos pacientes porta al menos una mutación conocida en un alelo el gen CFTR y el 10% presenta dos mutaciones conocidas en ambos alelos(82-85).

También se han buscado mutaciones de la CFTR en pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, bronquiectasias difusas, aspergilosis broncopulmonar alérgica, y bronquitis crónica por *Pseudomona aeruginosa*, etc. y se ha encontrado que estos pacientes presentan una mayor frecuencia de mutaciones CFTR que la población general (86-90).

ALELOS COMPLEJOS

Existe un gran número de reportes que describen la coexistencia de dos alteraciones diferentes en el mismo alelo FQ. Mientras la mayoría de estos alelos complejos pueden representar sólo una asociación de una mutación con una variación benigna o polimorfismo, hay ejemplos en los cuales la presencia de una segunda mutación en el mismo alelo puede modular el efecto de la primera; uno de ellos es el hallazgo de la mutación R553Q en un alelo que porta la mutación $\Delta F508$, que se conoce como grave. En este caso la asociación de ambas mutaciones parece atenuar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (91). Otro ejemplo es la mutación R117H, cuyo efecto en la expresión de la enfermedad parece ser modulada por la longitud de una región de politimidinas que se encuentra hacia la región 3' del intrón 8 (92). Este segmento de politimidinas es polimórfico en la población general y se han encontrado tres variantes: 9T, 7T y 5T que están relacionadas con el mecanismo de splicing alternativo. La variante 5T genera alrededor del 90% de un mRNA que carece del exón 9 (93). Aparentemente, la proteína producida por éste no es funcional, así, se ha visto que la mutación R117H se asocia a FQ solamente cuando se encuentra además un alelo 5T (94).

TRATAMIENTO CONVENCIONAL

Como tratamiento convencional, para este padecimiento se ofrecen suplementos de enzimas pancreáticas y vitaminas liposolubles, fisioterapia torácica vigorosa y regular y tratamientos profilácticos como el uso de antibióticos. En el caso del *ileo meconial* puede ser necesaria la cirugía paliativa para corregir la obstrucción del intestino delgado por moco viscoso y espeso. En algunos casos de cirrosis hepática en estado terminal se ha practicado el trasplante hepático y en los pacientes con enfermedad respiratoria terminal y *cor pulmonae* se ha realizado con éxito el trasplante pulmonar. Varios ensayos clínicos de terapia génica para la FQ se encuentran en desarrollo en este momento (95).

TERAPIA GENICA

Los conocimientos de las bases moleculares de la enfermedad han permitido diseñar nuevos abordajes para el tratamiento de la FQ. Así, hay 4 diferentes tipos de estrategias para intentar reparar la pérdida de la función de la CFTR: 1) Reemplazar la CFTR mutante con CFTR silvestre, 2) Alterar el procesamiento de la CFTR mutante para facilitar su llegada y retención en la membrana apical, 3) Incrementar la actividad de los canales mutantes localizados en la membrana apical al alterar la regulación del canal y 4) Estimular otros canales de cloro apicales regulados por diferentes vías (96). Un logro importante para la FQ, ha sido la posibilidad de administrar el gen CFTR a pacientes mediante vectores de adenovirus genéticamente modificados, valorando su inocuidad y su capacidad para expresar una proteína CFTR capaz de corregir el transporte de cloruros en el epitelio nasal de pacientes con FQ. Uno de los inconvenientes de este tipo de terapia es que la terapia génica debe administrarse periódicamente, debido a que las células del tejido epitelial se reemplazan cotidianamente.

ANTECEDENTES

Hasta el momento se han logrado grandes avances para entender las bases moleculares de la FQ. Sin embargo, todavía existe un número importante de pacientes con mutaciones aún no identificadas. Un estudio molecular en la población caucásica reveló que mediante la búsqueda dirigida de las 5 mutaciones más frecuentes a nivel mundial, se logró la caracterización de cerca del 85% de los alelos afectados (49).

A diferencia de los países desarrollados, en México no se conoce la frecuencia de la FQ. De la misma manera sabemos poco sobre la naturaleza de las mutaciones que afectan al gen en nuestra población y la forma en que influyen en las manifestaciones de este padecimiento.

En el Instituto Nacional de Pediatría se realizó la búsqueda dirigida de 12 mutaciones, 5 de éstas son mutaciones frecuentes a nivel mundial (Tabla 1), y el resto son mutaciones encontradas en otras poblaciones hispanas (Tabla 2). En dicho estudio se analizaron 128 cromosomas, detectándose que la mutación $\Delta F508$ se presenta en el 39% de los cromosomas analizados (58), mientras que la G542X se observó en el 6% (60), siguiendo en frecuencia la N1303K con un 3%, la $\Delta I507$ en el 1.98% de los alelos afectados, mientras que el resto de estas mutaciones se observaron en un porcentaje menor al 1%. Así, al realizar el análisis dirigido de las 12 mutaciones se logró detectar menos del 50% de los alelos afectados en nuestra población con FQ.

La caracterización de las mutaciones responsables de la FQ es necesaria para establecer estrategias de diagnóstico, detección de portadores y diagnóstico prenatal, es por ello que en este trabajo nos propusimos implementar nuevas estrategias para la identificación y caracterización de mutaciones nuevas o poco frecuentes en el gen FQ.

TABLA 1. MUTACIONES CFTR CON MAYOR FRECUENCIA A NIVEL MUNDIAL

MUTACION	FRECUENCIA %	POBLACIONES CON ALTA PREVALENCIA
Δ F508	66.0	Caucásica
G542X	2.4	Española
G551D	1.6	Inglesa
N1303K	1.3	Italiana
R553X	0.7	Alemana

TABLA 2. MUTACIONES CFTR DE MENOR FRECUENCIA A NIVEL MUNDIAL

MUTACIÓN	FRECUENCIA %
S549N	0.1
Δ I507	0.2
2869insG	<0.1
R1162X	0.3
3120+1G→A	<0.1
1924del7	<0.1
2055del9 →A	<0.1

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar mutaciones nuevas o poco frecuentes en el gen de fibrosis quística en una población de pacientes mexicanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Identificar las mutaciones presentes en los pacientes con diagnóstico clínico de FQ.
2. Correlacionar el genotipo con el fenotipo de los casos índice.
3. Detectar portadores de las 4 mutaciones más frecuentes en la población Mexicana, en los familiares de primer grado.
4. Estimar la frecuencia de las mutaciones detectadas en la población mexicana y compararla con otras poblaciones a nivel mundial

MATERIAL Y METODOS

ESTRATEGIA GENERAL

A) CRITERIOS DE INCLUSION

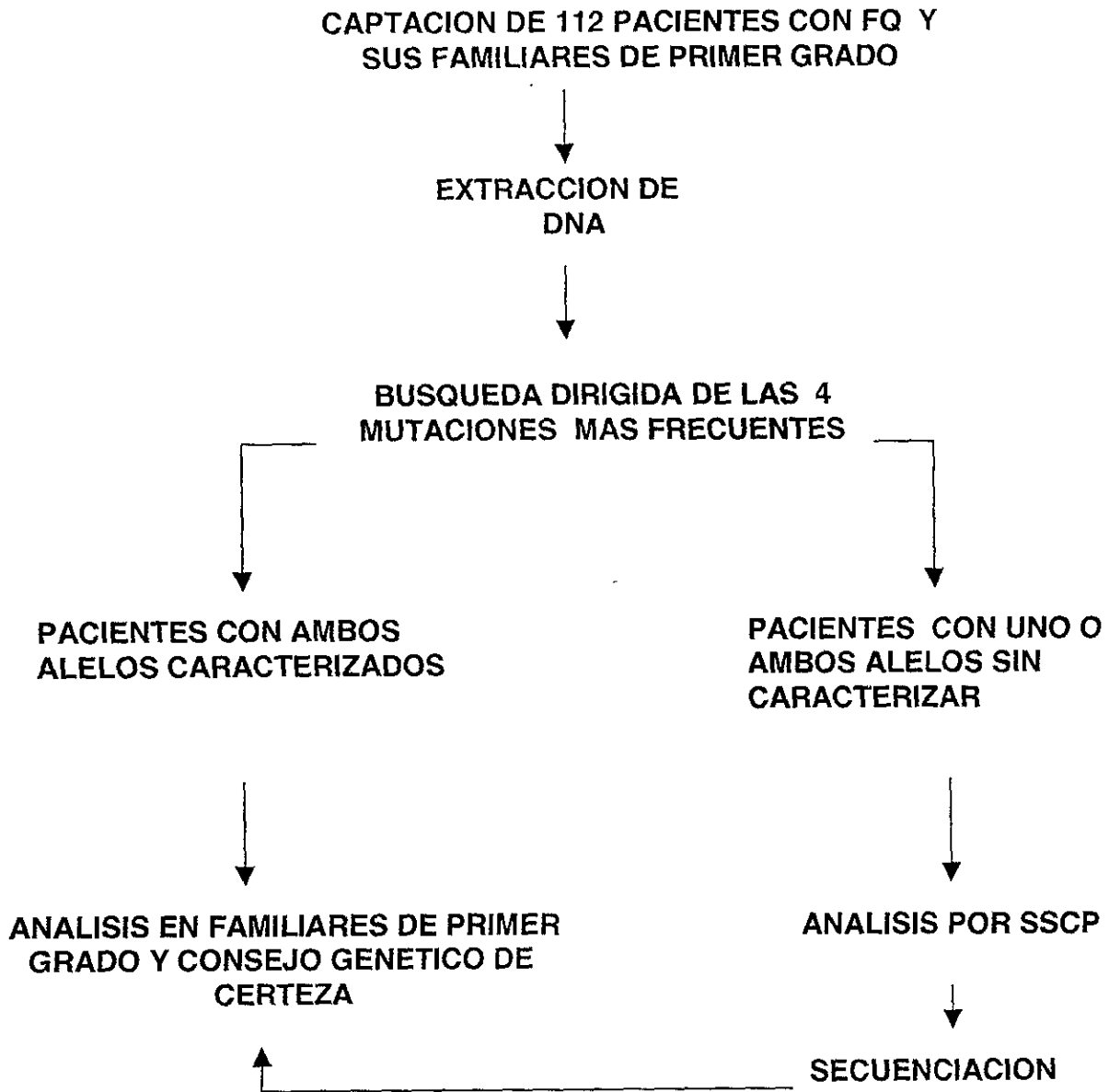
En el estudio se incluyeron 112 pacientes con diagnóstico clínico de FQ y sus familiares de primer grado. El diagnóstico se basó en la presencia de al menos de 2 de los siguientes parámetros: 1) cuantificación de cloruros en sudor mayor a los 60 mEq/l (97), 2) afección pulmonar grave con infecciones recurrentes y persistentes especialmente por *Pseudomona aeruginosa*, y 3) insuficiencia pancreática, valorando la concentración de grasa en heces (>7g/d) (98) Todas las familias fueron captadas de la consulta externa del Instituto nacional de Pediatría (INP) y de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ). Cabe mencionar que fueron incluidos 64 pacientes del estudio mencionado previamente, que formaban parte de un banco de DNA del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría.

B) CRITERIOS DE EXCLUSION.

Se excluyeron temporalmente pacientes transfundidos en los últimos tres meses.

También fueron excluidos pacientes con padecimientos infecto-contagiosos como SIDA y hepatitis, esto por razones de seguridad de los estudiantes y personal de laboratorio.

ALGORITMO METODOLOGICO



1. Captación de pacientes

A todos los pacientes se les realizó un árbol genealógico e historia clínica completa. Todos los casos nuevos fueron sometidos a la búsqueda dirigida de las 4 mutaciones más frecuentes en la población Mexicana ($\Delta F508$, G542X, N1303K y $\Delta I507$). En aquellos pacientes en donde existía un alelo sin caracterizar, se realizó la búsqueda de otras mutaciones en 7 exones (7, 10, 11, 13, 17, 20 y 21) mediante las técnicas de SSCP y secuenciación. Estos exones fueron seleccionados porque en ellos se ha detectado un mayor número de mutaciones. Finalmente, se detectaron los portadores entre los familiares de primer grado de los casos índice con mutaciones ya caracterizadas y se brindó asesoramiento genético de certeza.

2. Extracción de DNA de sangre periférica

Se extrajeron 14 ml de sangre periférica de los pacientes diagnosticados con FQ, usando EDTA como anticoagulante y después se centrifugó la muestra por 20 minutos a 3000 rpm, se tomó la capa de linfocitos, se colocó en 6 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se desecharon el plasma y los eritrocitos, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 6 ml de RCBL, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina. Finalmente se resuspendió el botón de linfocitos en 333 μ l de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de linfocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42°C para obtener un hidrolizado de linfocitos (99).

3. Purificación de DNA

Se agregaron 2 ml de fenol al hidrolizado obtenido en el paso anterior, se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, después la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior, posteriormente a la fase superior se le agregó 1 ml de fenol y 1 ml de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm, nuevamente la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior.

La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se agregó 2 ml de cloroformo/isoamilico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugo por 10 minutos a 3000 rpm. En un tubo limpio se agregó 90 μ l de NaCL 1 M y 3 ml de etanol absoluto a -20°C a la fase superior.

Se agitó suavemente hasta que las hebras de DNA se hicieron evidentes y estas se extrajeron con una pipeta Pasteur sellada, se secó por 10 minutos a temperatura ambiente se enjuagó en etanol al 70% a -20°C , se dejo secar a temperatura ambiente una vez más y se resuspendió en 200 μ l de agua destilada estéril.

4. Cuantificación de DNA

Para la cuantificación del DNA se diluyó 1 μ l de la muestra de DNA en 250 μ l de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda de (λ) de 260 nm, el dato obtenido se sustituyó en la siguiente fórmula (100).

Donde:

D.O₂₆₀ = Densidad óptica a una λ de 260 nm

F = Constante equivalente a 0.05

(D.O) (F)(DIL) = [DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (50 ng de DNA = 1 D.O₂₆₀)

DIL = Volumen de dilución equivalente a 250 μ l

Se confirmó la integridad del DNA por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio y se corrió a 100 volts por 30 minutos (Figura 7)

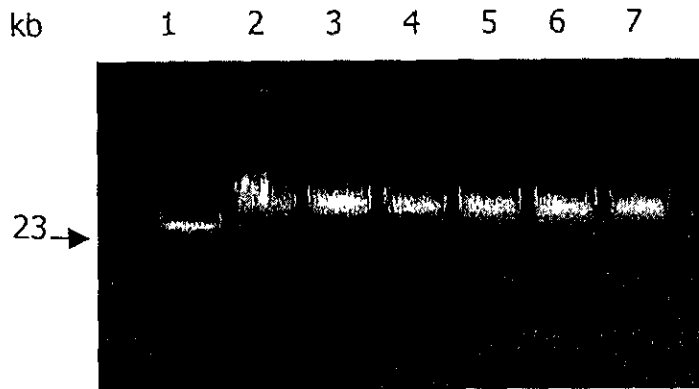


FIGURA 7. DNA extraído de linfocitos de sangre periférica. Gel de agarosa al 0.8% muestra la presencia de DNA íntegro. Carril 1: contiene el marcador de peso molecular λ -Hind III; carriles 2-7 muestran la presencia de DNA íntegro.

5. Análisis de Mutagénesis Dirigida mediada por PCR (PSM)

La técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM; del inglés PCR-mediated site-directed mutagénesis) se utilizó para detectar las 4 mutaciones más frecuentes descritas previamente en nuestra población (Δ F508, G542X, N1303K y Δ I507). Para llevar a cabo esta metodología se sintetizaron un par de oligonucleótidos o primers con un cambio de una sola base en uno de ellos, estos flanquean los sitios en donde se localizan cada una de las mutaciones antes mencionadas. Así, el producto amplificado por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) lleva una mutación puntual intencional que crea un sitio de restricción para una enzima específica en el alelo normal o en el alelo mutado, lo cual permite identificar uno del otro para cada mutación (101).

Después de la digestión de los amplificados, los fragmentos se corrieron en geles de acrilamida al 10% y así se logró distinguir el alelo mutado del normal. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados, los tamaños de los amplificados y las enzimas de restricción para cada mutación se muestran en la tabla 3.

Estas mutaciones se buscaron en todos los casos índice y en los familiares de primer grado de los pacientes en donde se detectó alguna de estas alteraciones ($\Delta F508$, G542X, N1303K y $\Delta I507$), esto para detectar portadores asintomáticos.

TABLA 3. OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES UTILIZADOS PARA PSM.

MUTACION	OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES O PRIMERS 5'.....3'	ENZIMA QUE CORTA	TAMAÑO DEL PRODUCTO AMPLIFICADO	ALELO QUE ES CORTADO	FRAGMENTOS GENERADOS POR LA DIGESTION
$\Delta F508$	F*: GCACCATTAAAGAAAATAT <u>G</u> AT R: CATTACAGTAGCTTACCCA	Mbol	219 pb	Silvestre	202 + 17 pb
G542X	F: CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT R*: CACTCAGTGTGATTCCACCTT <u>C</u> AC	HphI	180 pb	Silvestre	168 + 12 pb
N1303K	F: GAAATATTTTACAATAACAATAAGGG R*: CTCCACTGTTCATAGGGATC <u>I</u> AA	Ddel	144 pb	Silvestre	123 + 21 pb
$\Delta I507$	F*:GCCTGGCACCATTAAAGAAA <u>G</u> ATC R: CTAACCGATTGAATATGGAGCC	BglII	181 pb	Mutante	157 + 24 pb

Los oligonucleótidos iniciadores que introducen la mutación están indicados como F* (Forward 5') ó R* (Reverse 3'), y la base que introduce la mutación en el producto amplificado se encuentra subrayada.

Las mutaciones ($\Delta F508$, G542X, N1303K y $\Delta I507$) se localizan en los exones 10, 11, 21 y 10 respectivamente.

La técnica de amplificación por PCR para estas mutaciones se realizó en un termociclador (Perkin Elmer; Gene Amp 9600), las condiciones se describen en la tabla 4.

TABLA 4. PROGRAMA DE PCR PARA PSM PARA EL ANÁLISIS DE LAS 4 MUTACIONES MAS FRECUENTES

Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) 94°C	2 min.	1
a) 94°C	20 seg.	30
b) 55°C	20 seg.	
c) 72°C	30 seg.	
a) 94°C	12 seg.	1
b) 65°C	20 seg.	
c) 72°C	7 min.	

Los pacientes que después de éste tamizaje preliminar resultaron con al menos un alelo sin identificar se sometieron al análisis de 7 exones por la técnica de SSCP (polimorfismo conformacional de cadena sencilla), la cual se basa en la técnica de PCR empleando cNTP marcada con P³².

6. Amplificación de 7 exones por el método de PCR

Se estandarizaron las condiciones de amplificación para los exones 7, 11, 13, 17, 10, 20 y 21 del gen FQ mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un ciclador térmico Gen-Amp 9600, siguiendo un programa de 30 ciclos, cada uno de los cuales consta de tres pasos esenciales: desnaturalización a 94°C durante 20", alineación a 55°C durante 20" y extensión a 72°C por 30". La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 10 µl, la cual estaba compuesta de 2U de Taq polimerasa, 2.5 µl de buffer 10X, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de NTP's 100 ng de cada par de oligonucleótidos correspondientes a cada

exón más 100 ng de DNA. El tamaño de los amplificados se analizó por electroforesis a 85 volts en un gel de agarosa al 2.5%, verificando los tamaños específicos de cada exón, de acuerdo a la secuencia del gen de FQ reportada (28).

7. Análisis de SSCP

La técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) está basada en el principio de que las moléculas de DNA de cadena sencilla adquieren estructuras secundarias de acuerdo a su secuencia específica, por lo tanto las moléculas que se distinguen en al menos la sustitución de una sola base en un fragmento de DNA de 1,000 pares de bases pueden adoptar conformaciones secundarias diferentes y presentar un patrón electroforético distinto en geles de poliacrilamida (102). Por lo tanto esta metodología permite identificar una mutación puntual y se corrobora por el método de secuenciación.

Para el SSCP se amplificó cada uno de los 7 exones arriba citados del gen FQ por PCR como se describe en el paso 2, excepto que en este caso el producto amplificado se marcó radioactivamente agregando 1 uCi de α P³² a la mezcla de reacción, se tomaron 2 μ l de ésta y se llevaron a un volumen final de 10 μ l con una solución que contiene 95% de formamida, 5 mM de EDTA, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de xilencianol, esta mezcla se sometió a desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, y posteriormente se le dio un choque térmico en un baño de hielo para mantener separadas las cadenas de DNA. Para finalizar, las muestras se corrieron en un gel no desnaturalizante con una matriz de acrilamida/sacarosa (6% y 10% respectivamente) con un crosslinking de 2.5. Finalmente los geles se secaron a 80°C durante 90 minutos y se expusieron en una placa de autorradiografía (102).

8. Análisis de secuenciación

Las muestras que presentaron cambios electroforéticos o un patrón anormal de corrimiento por SSCP, fueron secuenciadas directamente de los productos de PCR por el método de Sanger (103).

a) PCR pre-secuenciación.

El DNA de una sola cadena fue obtenido por PCR asimétrico (empleando sólo uno de los primers forward o reverse (104) en donde la mezcla de reacción contenía 3µl del fragmento amplificado de la PCR purificado, 2µl del primer específico (antisentido o sentido) (100ng/µl diluido 1/16), 2µl de buffer secuenase, 2µl de enzima termosecuenase y 11µl de agua desionizada para llevar a un volumen final de 20µl. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 3% para visualizar los amplificados.

b) Purificación de fragmentos de PCR

Los amplificados se purificaron usando microcolumnas de Sephadex del kit QIAquick Spin PCR de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 20µl del producto amplificado es purificado adicionando 5 volúmenes de buffer PB a cada tubo del producto amplificado de PCR mezclado con vortex y se continuó con el protocolo proporcionado por el proveedor para el Kit "purification PCR Spin QIAquick"; el DNA se eluyó adicionando 30µl de agua desionizada y se centrifugó por 60 seg, el producto eluido se uso en la reacción de secuenciación como un templado de DNA.

Se colocaron 4.5µl de mezcla de reacción de secuenciación a 4 tubos de 0.6µl de cada dideoxinucleótido (ddG, ddT, ddA y ddC), se mezclaron correctamente y se empleó el siguiente programa para el termociclador 9600 de Perkin Elmer:

Segmento1	Desnaturalización	95°C/30 seg	} X 30 Ciclos
	Alineación	55°C/30 seg	
	Extensión	72°C/45 seg	

Después del PCR se agregaron 4µl de una solución que contenía: formamida, formaldehido azul de bromofenol y xilencianol. Las muestras se llevaron a una temperatura de 94°C por 5 minutos, inmediatamente después se sembraron 3µl de cada reacción en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 40%, el cual se corrió a 2000V durante 1.5, 3.0 o 4.5 h dependiendo del fragmento amplificado. El gel se secó al vacío a 80°C y se expuso a una película de autorradiografía durante 24-48h.

Es importante hacer notar que algunas muestras se secuenciaron empleando un secuenciador automático de Perkin Elmer modelo 310, versión 3.0, ABI-CE1, con el kit correspondiente ABI-PRISM.

RESULTADOS

Búsqueda dirigida de las mutaciones más frecuentes.

$\Delta F508$: En este análisis el producto de PCR que se obtiene es de 219 pares de bases (pb). Los alelos sin la mutación $\Delta F508$ son digeridos por la enzima *MboI*, generando dos fragmentos, de 202 pb y 17 pb, sin embargo los alelos con la mutación $\Delta F508$ no son cortados. Así los individuos normales (n/n) o pacientes con FQ sin esta mutación en ninguno de sus alelos (uk/uK), muestran la banda de 202 pb; los pacientes homocigotos ($\Delta F508/\Delta F508$) presentan la banda de 219 pb; mientras que los pacientes heterocigotos compuestos con la mutación $\Delta F508$ ($\Delta F508/uk$) y los portadores de esta alteración ($\Delta F508/n$), tienen las bandas de 202 y 219 pb y un fragmento heterodúplex producto del rearreglo entre las cadenas de alelos normales y mutantes durante la PCR (figura 8).

Los resultados de este análisis mostraron que la frecuencia de la $\Delta F508$ es de 38.4%, frecuencia similar a lo reportado por nuestro grupo en 1993 (57), detectándose 19 (16.7%) pacientes homocigotos y 48 (21.4%) heterocigotos compuestos con un solo alelo $\Delta F508$ ($\Delta F508/uk$).

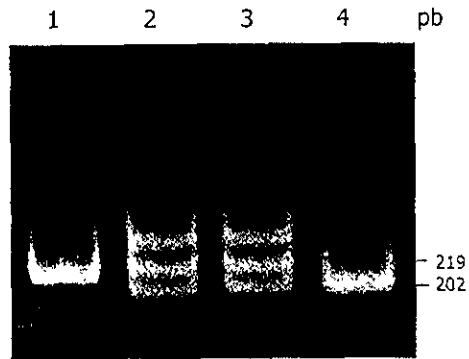


FIGURA 8. ANÁLISIS POR PSM DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra los productos obtenidos de la restricción con la enzima *MboI*, de los productos amplificados. Carril 1: caso índice homocigoto $\Delta F508$ ($\Delta F508/\Delta F508$); carril 2 y 3: portadores sanos ($\Delta F508/n$); carril 4: homocigoto normal (n/n).

G542X: Esta mutación se localiza en el exón 11 del gen FQ y provoca el cambio de una glicina por un codón de paro en la posición 542 de la proteína. El producto amplificado para el análisis de la G542X, es un fragmento de 180 pb que al ser digerido con *HphI*, produce dos fragmentos de 168 y 12 pb en el alelo normal, mientras que el alelo con la mutación G542X no se corta (figura 9). Así los individuos normales (n/n) y los pacientes sin esta mutación presentan la banda de 168 pb; los casos homocigotos G542X/G542X muestran la banda de 180 pb y los individuos con FQ heterocigotos compuestos (G542X/uk), así como los portadores sanos de la mutación (G542X/n) muestran las dos bandas de 180 y 168 pb.

El 6.7% de los cromosomas FQ estudiados presentó la mutación G542X: 3 (2.7%) pacientes fueron homocigotos y 9 (4.0%) pacientes fueron heterocigotos compuestos; de estos últimos, cuatro casos fueron $\Delta F508/G542X$ y cinco pacientes eran portadores de la mutación G542X en un alelo y una mutación desconocida en el otro (G542X/uk).

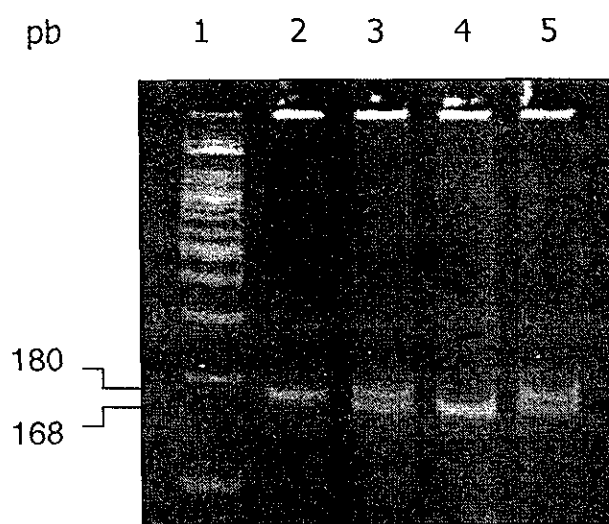


FIGURA 9. ANÁLISIS POR PSM DE LA MUTACION G542X. Gel de poliacrilamida al 15% que muestra los productos obtenidos de la restricción con la enzima *HphI*, de los productos amplificados. Carril 1: marcador de peso molecular ladder 100 pb, carril 2: caso índice homocigoto G542X/G542X; carril 3: padre portador G542X/n; carril 4: hermano normal (n/n); carril 5: madre portadora G542X/n.

N1303K: Esta mutación se localiza en el exón 21 del gen FQ y provoca el cambio de una asparagina por una lisina en el codón 1303. El tamaño del fragmento amplificado para el análisis de esta mutación fue de 144 pb. En este caso, el alelo normal presenta el sitio de corte para de la enzima de restricción *DdeI*, a partir de donde se producen dos fragmentos de 123 y 21 pb. Por lo tanto, el alelo mutado permanece intacto después de la digestión con *Dde I* (figura 10).

En las muestras estudiadas, la frecuencia de esta mutación fue del 2.2%, detectándose 5 pacientes heterocigotos compuestos: dos pacientes con la mutación N1303K en un alelo y en el otro alelo la $\Delta F508$ (N1303K/ $\Delta F508$) y 3 con un alelo N1303K y una mutación aún no caracterizada en el otro (N1303K/uk).

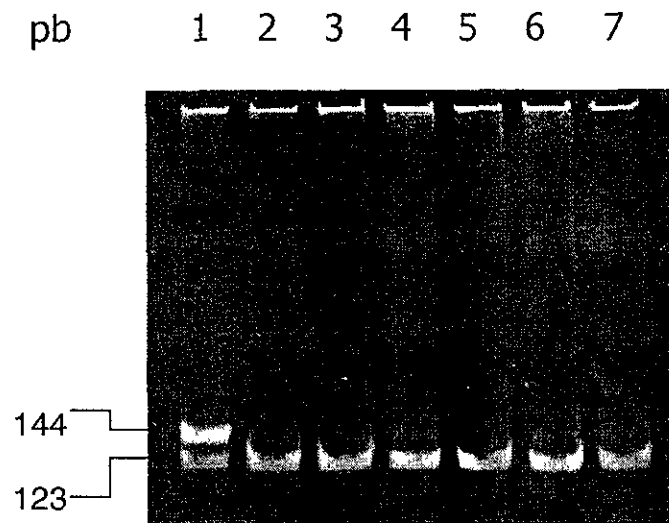


FIGURA 10. ANÁLISIS DE PSM PARA LA MUTACIÓN N1303K. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra los productos de amplificación después de la restricción con la enzima *DdeI*. Carril 1: heterocigoto compuesto N1303K/uk; carriles 2-7: pacientes negativos para la mutación N1303K, con mutaciones distintas a la analizada.

$\Delta I507$: Esta mutación se ubica en el exón 10 del gen FQ y es una deleción del codón número 507 que codifica para la isoleucina. En esta mutación el producto amplificado por la PCR es de 181 pb y lleva una mutación puntual que crea un sitio de restricción para la enzima *BglII* en el alelo mutado por lo que se produce una banda de 157 pb y otra de 24 pb, por lo tanto el producto amplificado del alelo normal no puede ser digerido con *Bgl II*, mostrando una banda de 181 pb después de la digestión (figura 11). Es importante mencionar que con este método de análisis para la $\Delta I507$ se logra distinguir también la mutación $\Delta F508$ que es una mutación aledaña, observándose en este caso la banda de 181 pb y dos bandas superiores que son heteroduplex y sirven como marcadores en los heterocigotos de la $\Delta F508$ (Fig. 11; carril 1, 5 y 7)

Esta mutación $\Delta I507$, se detectó en el 2.6% de los cromosomas afectados, 4 pacientes heterocigotos compuestos ($\Delta I507/\Delta F508$), y un paciente homocigoto ($\Delta I507/\Delta I507$).

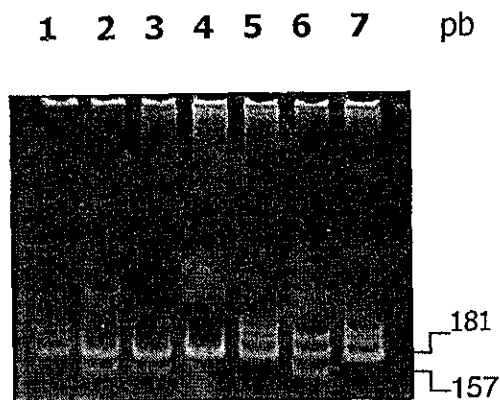


FIGURA 11. ANÁLISIS POR PSM PARA LA MUTACIÓN $\Delta I507$. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra los productos amplificados restringidos con *Bgl II*. Carril 1: control heterocigoto $\Delta F508/uk$; carril 2: control $\Delta I507/\Delta F508$; carril 3: paciente portador $\Delta I507/\Delta F508$; carril 4: hermano normal; carril 5: hermano heterocigoto $\Delta F508/N$, carril 6: madre portadora $\Delta I507/N$; carril 7: padre portador $\Delta F508/N$.

ANÁLISIS DE MUTACIONES POR SSCP

El tamizaje preliminar de las 4 mutaciones más frecuentes permitió identificar el 49.9% de las mutaciones en los alelos afectados analizados. De los 112 pacientes analizados 36 resultaron con ambos alelos caracterizados, 45 fueron heterocigotos compuestos, con un alelo caracterizado y el otro con una mutación desconocida, en tanto que 31 presentaron ambos alelos con mutaciones aún no caracterizadas. Por lo tanto, 76 pacientes resultaron al menos con un alelo sin caracterizar. Estos últimos fueron sometidos a un segundo rastreo por SSCP para búsqueda de mutaciones en siete exones, que son considerados puntos calientes (hotspots) del gen CFTR (Tabla 5)

TABLA 5. EXONES DEL GEN CFTR ANALIZADOS POR SSCP

EXON	DOMINIO QUE CODIFICAN	TAMAÑO (pb)
7	TMD1	410
10	NBD1	491
11	NBD1	425
13	REGULADOR	528
17	TMD2	579
20	NBD2	473
21	NBD2	477

Después del análisis de SSCP para los 7 exones, 11 pacientes mostraron alteraciones en el patrón electroforético (Figura 12). Para definir la naturaleza de estas alteraciones, se secuenciaron las muestras, lográndose la detección de 9 mutaciones previamente descritas en la literatura y 2 mutaciones nuevas caracterizadas en este estudio (Tabla 6).

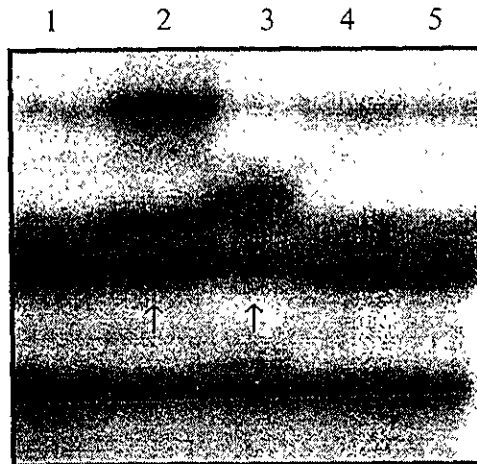


FIGURA 12 . ANÁLISIS DEL EXÓN 13 DEL GEN FQ POR SSCP. Carril 2 y 3 muestran el patrón electroforético alterado de dos pacientes con FQ; carril 1, 4 y 5 patrón electroforético normal.

Las 11 mutaciones identificadas en esta tesis se muestran en la tabla 6.

De estas mutaciones la S549N fue caracterizada mediante secuenciación automática (Figura 13 a y b). También los familiares de primer grado de los pacientes afectados por esta mutación fueron analizados obteniendo un amplificado de 425 pb del exón 11 y restringiendo posteriormente con la enzima *DdeI*. Con esta enzima se logra distinguir los alelos normales de los mutados, ya que los alelos normales permanecen intactos después de la restricción, en tanto que los alelos mutados presentan el sitio de corte, observando dos fragmentos (238 y 174 pb). (Figura 14)

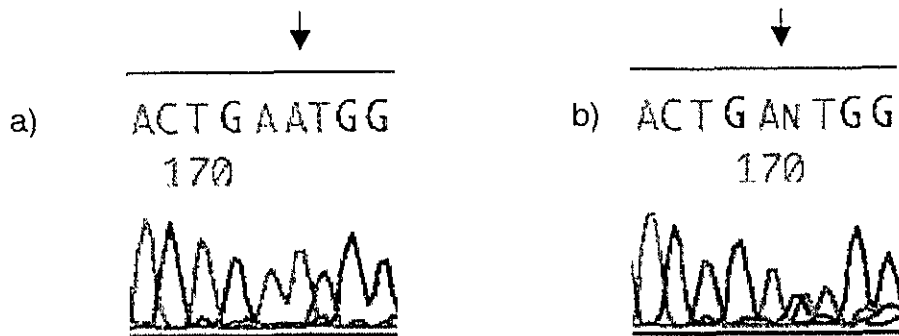


FIGURA 13. IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN S549N. Secuenciación automática del exón 11; a) corresponde a la secuencia del paciente con FQ, en donde se observa el cambio de una G por una A en la posición 1778 en ambos alelos y b) secuencia correspondiente de la Madre del paciente, en la que se observa el alelo alterado igual que el del paciente y el alelo normal.

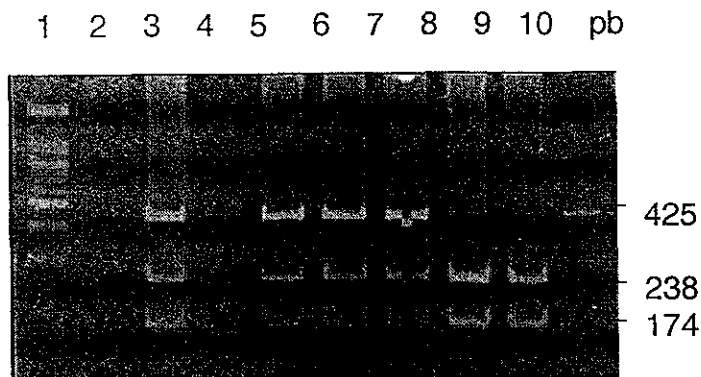


FIGURA 14. ANÁLISIS DIRIGIDO DE LA MUTACIÓN S549N. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra los productos amplificados restringidos con DdeI. Carril 1: Marcador de pesos moleculares leader (100pb); carril 3: heterocigoto conocido S549N/X; carril 4: control homocigoto S549N; carril 5 y 6 padres portadores de la S549N; carril 7: hermano portador; carril 8 y 9: hermanos homocigotos normales, carril 10: caso índice homocigoto S549N.

TABLA 6. MUTACIONES IDENTIFICADAS POR SSCP

Nombre de la mutación	Cambio de la secuencia de DNA	Ubicación (exón)	No. de alelos afectados	Tipo de mutación
S549N	G a A en 1778	11	3	Sentido erróneo Ser a Asn en 549
I506T	T a C en 1649	10	2	Sentido erróneo Ile a Thr en 506
2183AA→G	A a G en 2183 y deleción de A en 2184	13	2	Alteración en el marco de lectura
3199del6	Del de ATAGTG en 3199	17	2	Alteración en el marco de lectura
1716G→A	G a A en 1716	10	1	Splicing
L558S	T a C en 1805	11	1	Sentido erróneo Leu a Ser en 558
W1089X	G a A en 3398	17	1	Sin sentido
Y1092X	C a A en 3408	17	1	Sin sentido
1078delT	Del de T en 1078	7	1	Alteración en el marco de lectura
P750L*	G→T en 2381	13	1	Sentido erróneo Pro a Lis en 750
W1098C*	G→T en 3426	22	1	Sentido erróneo Trp a Cys en 1098

* Mutaciones nuevas, detectadas en este estudio.

MUTACIONES NUEVAS

En este estudio se caracterizaron dos mutaciones nuevas, las cuales fueron detectadas en sólo un cromosoma en nuestra muestra de pacientes analizados con FQ. Las dos son mutaciones de sentido erróneo que cambian un aminoácido por otro (W1098C y P750L).

W1098C

Esta mutación es una transversión de G a T fue detectada en el cromosoma materno en el nucleótido 3426 en el exón 17b el cual codifica para el dominio TMD2 de la proteína CFTR. A nivel de CFTR, existe un cambio de triptófano a cisteína en el aminoácido 1098 de la proteína. W1098C fue detectada en un paciente masculino portador de la mutación severa R75X en el exón 3 del alelo paterno (Figura 15). El paciente con genotipo R75X/W1098C presentó suficiencia pancreática y manifestó un cuadro clínico leve de FQ a la edad de 23 años. Dado que la mutación R75X se ha descrito como una mutación grave, las manifestaciones leves de la enfermedad fueron atribuidas a W1098C, considerándose como una mutación leve.

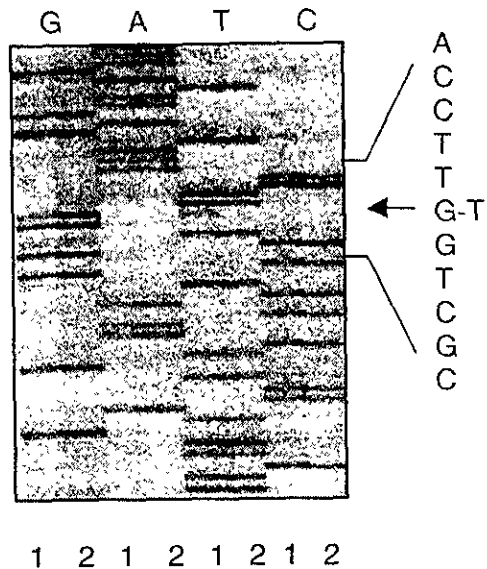


FIGURA 15. CARACTERIZACION DE LA MUTACION W1098C. Secuenciación del exón 17 del gen CFTR, los números indican pacientes analizados; en el paciente No. 1 se muestra un cambio de G por T. El No 2 es una muestra normal.

P750L

Esta mutación es una transición de C a T en el nucleótido 2381 del exón 13b el cual codifica para el dominio R del CFTR. A nivel proteico cambia una prolina por una leucina en el aminoácido 750 de la CFTR (Figura 16).

Esta mutación fue encontrada en un paciente masculino que es portador de la mutación $\Delta 508$ en el otro cromosoma. Este paciente tiene un fenotipo severo con inicio de la enfermedad a los dos meses de edad, presenta insuficiencia pancreática y afección pulmonar crónica. Con base en su cuadro clínico, esta mutación fue clasificada como grave.

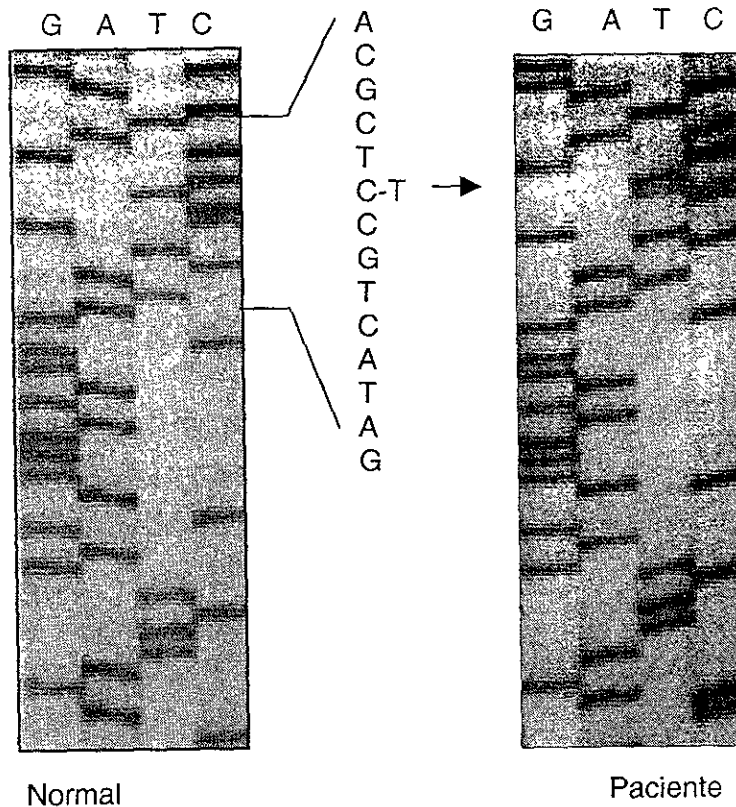


FIGURA 16. CARACTERIZACION DE LA MUTACION P750L. Secuenciación del exón 13. La flecha muestra una alteración en la secuencia del paciente con FQ, que es un cambio de un nucleótido de C por T en la posición 2381.

ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LA POBLACIÓN MEXICANA.

En la tabla 7 se muestra la frecuencia de cada una de las mutaciones analizadas en nuestra población. En los 112 pacientes mexicanos con FQ analizados (224 cromosomas) se encontró que la mutación $\Delta F508$ fue el alelo que predominó, con una frecuencia del 38.4% en los cromosomas FQ. De los pacientes que presentaron esta mutación, 19 (38 cromosomas que representan el 16.7%) fueron homocigotos y 48 pacientes (21.4%) heterocigotos compuestos. La segunda mutación más frecuente fue la G542X presente en el 6.7% de los cromosomas FQ, seguida por su frecuencia la $\Delta I507$ con un 2.6%, la S549N y la N1303K se detectaron en el 2.23% de los cromosomas analizados; en tanto que el resto de las mutaciones se detectaron en menos del 1% de los cromosomas afectados. En la tabla 8, se comparan las frecuencias obtenidas en este trabajo, con las reportadas en la literatura. En México, la mutación $\Delta F508$ se presentó con menor frecuencia (38.4%) que a nivel mundial (67.7% CIFQ), mientras que las mutaciones G542X (6.7%), $\Delta I507$ (2.6%) y S549N (2.23%), fueron significativamente más frecuentes que lo reportado por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística. La mutación N1303K la detectamos con una frecuencia cercana a lo reportado en poblaciones del Sur de Europa (Tabla 8).

Con este análisis en los pacientes con FQ se logró identificar la presencia de 18 mutaciones, incluyendo dos nuevas en el gen CFTR. Este análisis completo permitió caracterizar 60.2% de los cromosomas FQ. De éstas sólo 5 presentaron una frecuencia mayor al 1%, mientras que 13 se encontraron sólo en uno o dos cromosoma cada una y por tanto representan menos del 1% de los cromosomas analizados. Es importante destacar que de las 18 de mutaciones caracterizadas sólo 3 (16.66%) son mutaciones leves y el resto son mutaciones graves, lo cual es similar a lo descrito en otras poblaciones, en donde se incluyen pacientes con FQ típica (Tabla 7).

TABLA 7. FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES EN PACIENTES MEXICANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

MUTACIÓN	NO. CROMOSOMAS AFECTADOS	FRECUENCIA (%)
ΔF508	86	38.4
G542X	15	6.70
ΔI507	6	2.67
S549N	5	2.23
N1303K	5	2.23
2055del9→A	2	0.90
1924del7	2	0.90
ΔI506*	2	0.90
2183AA→G	2	0.90
3199del6*	2	0.90
R553X	1	0.44
G551D	1	0.44
1716G→A	1	0.44
L558S	1	0.44
W1089X	1	0.44
Y1092X	1	0.44
P750L	1	0.44
W1098C*	1	0.44
TOTAL	135	60.26

* Mutaciones leves

TABLA 8 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS MUTACIONES FQ MAS FRECUENTES

MUTACIÓN	FRECUENCIA EN MEXICANOS	FRECUENCIA EN CAUCASICOS	FRECUENCIA EN ESPAÑOLES	FRECUENCIA MUNDIAL (CIFQ)
ΔF508	38.40	70.2	54.0	67.1
G542X	6.70	2.07	8.0	3.4
ΔI507	2.6	0.26	0.06	0.2
N1303K	2.23	0.98	2.45	1.8
S549N	2.23	0.08	0.02	0.1

CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO

Una vez identificadas las mutaciones en este trabajo se procedió a realizar la correlación del genotipo (mutaciones en CFTR) con el fenotipo (cuadro clínico) de 94 pacientes no relacionados con diagnóstico de FQ e historia clínica completa, los cuales se clasificaron en diferentes grupos, de acuerdo a los genotipos ya determinados (Tabla 9).

TABLA 9. CLASIFICACION DE PACIENTES SEGÚN SU GENOTIPO

GRUPO	GENOTIPO
I	$\Delta F508/\Delta F508$
II	$\Delta F508/C$
III	$\Delta F508/uk$
IV	C/C
V	C1/uk
VI	C/uk
VII	G542X/uk
VIII	uk/uk

C. Mutaciones distintas a $\Delta F508$

C1. Mutaciones leves

uk. Desconocida

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

De los 94 casos índice incluidos el 58.5% (55/94) eran varones, en tanto que el 41.5% (39/94) eran mujeres. Este análisis revela que el promedio de edad de inicio de los síntomas era de 16 meses de edad, sin embargo el lapso transcurrido entre ésta y la edad al diagnóstico fue en promedio de 40.9 meses. Es importante mencionar que existe diferencia entre el promedio de sobre vida de nuestros pacientes (8 años) y el de los países desarrollados (>30 años) en donde el diagnóstico se realiza a más temprana edad.

El 75.5% (71/94) de los pacientes presentaron cultivos positivos por *Pseudomonas aeruginosa*, este dato y las manifestaciones gastrointestinales (72.3% con esteatorrea y malabsorción) fue similar a lo reportado en la literatura (1). Entre otras complicaciones presentes en este grupo de pacientes se detectó: cirrosis en 1.06%, diabetes mellitus en 3.19% y falla en el crecimiento nutricional en el 14.8%.

Es interesante hacer mención la baja frecuencia de consanguinidad que encontramos en los padres de los pacientes (3.2%). Este resultado aunado a que cerca del 4.2% de los pacientes presentaron antecedentes de FQ en familiares de segundo grado, sugiere una alta frecuencia de portadores asintomáticos en nuestra población.

Analizando los pacientes del grupo I ($\Delta F508/\Delta F508$), se confirma que la mutación $\Delta F508$ está asociada con una presentación clínica severa de la enfermedad, manifestándose en todos los casos (100%) (17/17) con esteatorrea y malabsorción intestinal y por lo tanto todos presentaban insuficiencia pancreática (IP), en tanto que el 76.4%(13/17) presentaba afección pulmonar, el 70.5% (12/17) de este grupo presentaba enfermedad pulmonar crónica y sólo el 5.8%(1/17) manifestó afección pulmonar aguda, por otro lado se observó que la edad de inicio del padecimiento es a temprana edad como se describe en la literatura (Tabla 10).

En el análisis del grupo II ($\Delta F508/C$) se observó que el 78.9% (15/19) de los pacientes presentaban esteatorrea con malabsorción intestinal y el 89.5% (17/19) IP, el restante 10.5% (2/19) fue suficiente pancreático (SP). De estos resultados se deduce que en los pacientes con IP la $\Delta F508$ está asociada con una mutación grave en todos los casos, mientras que en el resto además de presentar la $\Delta F508$ en uno de sus alelos presenta una mutación leve en el otro, ya que las mutaciones leves son dominantes sobre las graves y provocan una función residual de la proteína CFTR. Las manifestaciones pulmonares se detectaron en este grupo en el 78.9% (15/19) de los pacientes, de los cuales el 68% (13/19) son pulmonares crónicos y el 10.5% (2/19) presentan afección pulmonar aguda. También se observó en este grupo una edad temprana de inicio del padecimiento (Tabla 10).

En el grupo III ($\Delta F508/uk$) el 69.2% (18/26) manifestó IP y el 30.76% (8/26) son SP, por lo que se sugiere que las mutaciones aún no caracterizadas en estos pacientes suficientes pancreáticos son leves. Las manifestaciones pulmonares se detectaron en el 80.76% (21/26) de los pacientes, el 73.0% (19/26) con enfermedad pulmonar crónica y el 7.69% (2/26%) con afección pulmonar aguda. Al igual que los dos grupos anteriores, estos pacientes presentan una edad de inicio de los síntomas muy temprana (Tabla 10).

Es importante mencionar que en los grupos I y III se detectó una mortalidad del 17.6% y 11.5% respectivamente.

En el grupo IV (C/C), en donde se incluyeron 3 pacientes con ambos alelos caracterizados, uno de ellos manifestó esteatorrea con malabsorción intestinal e IP, mientras que los otros dos son SP. Los 3 pacientes presentaron afección pulmonar crónica con una edad de inicio de la enfermedad que va desde los 2 a los 10 años de edad (Tabla 10). En este grupo se esperaba que todos los pacientes presentaran insuficiencia pancreática, ya que las mutaciones caracterizadas en estos pacientes son consideradas como severas (G551D, R553X, $\Delta I507$ y S549N). por lo que necesariamente los 2 pacientes que presentaron SP en este grupo, tienen que tener un seguimiento para vigilar el desarrollo de la IP.

El análisis del grupo V (C1/uk), reveló que el 66.6% (2/3) manifiestan esteatorrea y malabsorción, por lo tanto presentan IP, en tanto que el 33.3% (1/3) son considerados como SP. Por otro lado el 100% (3/3) de los casos manifiestan afección pulmonar crónica. Con una edad de inicio de los síntomas que va desde los 9 meses hasta los 3 años. En este grupo en donde las mutaciones caracterizadas son leves (3199del6 y W1098C), se esperaba que el 100% de los casos presentaran un fenotipo de SP, con lo cual, vemos que no necesariamente todos los pacientes que portan mutaciones leves tienen que estar asociados con un fenotipo moderado.

En el grupo VI (C/uk) se determinó que el 66.6% (4/6) manifiestan esteatorrea y malabsorción por lo que son IP y el 33.3% (2/6) son suficientes pancreáticos, el 100% (6/6) de estos pacientes manifiestan afección pulmonar, de los cuales el 83.3% (5/6) son crónicos

y el 16.6% (1/6) son agudos, presentan una edad temprana de inicio del padecimiento (Tabla 10). En este grupo de pacientes todas las mutaciones caracterizadas son mutaciones graves (2055del9, N1303K, S549N y Y1092X) por lo que se sugiere que el 66.6% de ellos que presentan IP seguramente tienen una mutación grave en el alelo aún no caracterizado, lo cual agudiza las manifestaciones clínicas, mientras que los SP (33.3%) deben presentar una mutación leve en el alelo desconocido.

En el grupo VII (G542X/uk) se determinó que el 75% (6/8) presentan esteatorrea y malabsorción intestinal, lo que les conduce a que presenten también IP, en tanto que 2/8 (25%) presentan SP, en cuanto a la afección pulmonar se observa que el 87.5% (7/8) de los pacientes la manifiestan y de estos 75% (6/8) son crónicos y el 12.5% (1/8) son agudos (Tabla 10). Haciendo el análisis de las mutaciones se observa que el 66.6% que son IP presentan en ambos alelos mutaciones graves en donde están incluidos 2 de los pacientes homocigotos G542X, un paciente heterocigoto compuesto G542X/S549N y 3 pacientes con la mutación G542X y una aún no caracterizada. El 25% que son SP lo representan 2 pacientes heterocigotos compuestos (con la mutación G542X y una mutación desconocida), a pesar de presentar la G542X que es una mutación grave, se estima que en el otro alelo presenta una mutación leve.

En el grupo VIII (uk/uk) se logró determinar que el 75% (9/12) presentaban esteatorrea y malabsorción intestinal así como IP, en tanto que el 25% (3/12) son SP. Por otro lado se observó que el 83% (10/12) presentan afección pulmonar crónica y tienen una edad de inicio de la enfermedad que va desde el mes hasta los 4 años. En este grupo a pesar de no tener caracterizados ambos alelos, se sugiere que el 25% de los pacientes presentan una mutación leve al menos en uno de sus alelos (Tabla 10)

DETECCIÓN DE PORTADORES DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES EN LA POBLACIÓN MEXICANA.

La detección de portadores en las familias afectadas se realizó con el objetivo de brindar un asesoramiento genético de certeza y en este trabajo se llevó a cabo la búsqueda dirigida de 298 familiares de primer grado en las familias en donde ya se había detectado alguna de las mutaciones más frecuentes en los casos índice: 112 madres, 86 padres y 110 hermanos.

Las mutaciones que portan los familiares fue posible identificarlas en 55 Madres y 46 Padres. De los 110 hermanos, 16 presentaron manifestaciones clínicas y fueron homocigotos o heterocigotos compuestos para algunas de las mutaciones en el gen CFTR con lo que se corroboró el diagnóstico de FQ molecularmente. De los 94 hermanos fenotípicamente sanos, 17/94 (18.08%) fueron genéticamente normales; en tanto que 34/94 (36.17%) fueron diagnosticados como portadores. En 43/94 (45.74%) no se pudo establecer el diagnóstico de certeza ya que resultaron ser hermanos de pacientes con alelos aún no caracterizados; en ellos no se descarta el estado de portador ya que podrían presentar un genotipo normal (N/N) o un genotipo de portador de la mutación aún no caracterizada (uk/N).

TABLA 10. CORRELACIÓN GENOTIPO- FENOTIPO

	I ΔF508/ΔF508	II ΔF508/C	III ΔF508/X	IV C/C	V C1/X	VI C1/X	VII G542X/ X	VIII X/X
Ci mEq/L	19-130 97.34 ± 24.56	63-124 99.05±16.53	48-156 95.27±20.42	91-120 103.66±12.1	75-121 99±18.83	84-112	85-126 106.25±14.2	68-108 92±13.23
Manifestaciones Gastrointestinales	17/17 E/MA 1/17 IM 1/17 OI 1/17 PR	15/19 E/MA 1/19 IM 1/19 PR 1/19 OI 4/19 NO	15/26 E/MA 3/26 IM 1/26 PR 1/26 OI 9/26 NO	1/3 E/MA	2/3 E/MA	3/6 E/MA 1/6 IM 3/6 NO	6/8 E/MA 2/8 IM 2/8 NO	9/12 E/MA 1/12 IM 3/12 NO
Manifestaciones Pulmonares	1/17 A 12/17 PC 4/17 NO	13/19 PC 2/19 A 4/19 NO	19/26 PC 2/26 A 6/26 NO	3/3 PC	3/3 PC	5/6 PC 1/6 A	6/8 PC 1/8 A 1/8 NO	10/12 PC 2/12 NO
Afección pancreática	17/17 IP	17/19 IP 2/19 SP	18/26 IP 8/26 SP	2/3 IP 1/3 SP	2/3 IP 1/3 SP	4/6 IP 2/6 SP	6/8 IP 2/8 SP	9/12 IP 3/12 SP
Cultivos <i>Pseudomonas</i>	13/17 positivos	15/19 positivos	18/26 positivos	3/3 positivos	3/3 positivos	3/6 positivos	7/8 positivos	10/12 positivos
Escala Shwacman/Brasfield	5/17 M 4/17 B 2/17 E 2/17 MG 1/17 G	7/19 M 2/19 G 6/19 B 2/19 E	6/26 B 4/26 G 3/26 E 3/26 MG 7/26 M	1/3 M 1/3 B	1/3 M 1/3 G 1/3 B	2/6 M 1/6 G 1/6 B 1/6 E 1/6 NO	2/8 M 2/8 B 4/8 NO	3/12 G 1/12 MG 2/12 E 1/12 B 1/12 M
Sexo	9/17 Masculinos 8/17 Femeninos	11/19 Masculinos 8/19 Femeninos	15/26 Masculinos 11/26 Femeninos	2/3 Masculinos 1/3 Femeninos	2/3 Masculinos 1/3 Femeninos	4/6 Masculinos 2/6 Femeninos	4/8 Masculinos 4/8 Femeninos	4/12 Masculinos 8/12 Femeninos
Edad inicio (años)	0-7.0	0-9.0	0-25.0	2.0-10.0	0.9-3.0	0-3.0	0-3.0.	0.1-4.0
Edad al diagnóstico	0.1-13.5	0.3-20.0	1.0-30.0	2.6-14.0	6.3-23.2	0.2-11.6	3-9.0	0.7-14
Tiempo sin dx -años	0-12.6	0.1-11.0	0-29.6	0.6-5.0	5.6-22.2	0.2-11.6	0.2-6.0	0.4-10
Edad. actual (años)	0.2-18.5 3/17 Fallecieron	0.3-25.1 7.47 ± 5.55	1.0-34.3 3/26 Fallecieron	11.8-33.5	7.5-23.1	0.3-16.6	1.17-17	3.9-20.7
Consanguinidad	1/17	1/19	NO	NO	NO	NO	1/8	NO
Familiares afectados	8/17	6/19	5/26	NO	NO	1/6	3/8	1/12

E/MA: Esteatorrea y malabsorción intestinal

IM: Ileo meconial

OI: Obstrucción intestinal

PR: Prolapso rectal

A: Afección pulmonar aguda

PC: Pulmonar crónico

Escala de Swacman/Brasfield: **M** mala, **B** buena, **G** grave, **MG** muy grave, **E** excelente

DISCUSIÓN

En México no se conoce la frecuencia real de la FQ, ya que ésta es una de las muchas enfermedades que se enmascaran con otros padecimientos comunes en nuestro país, como desnutrición, problemas gastrointestinales y problemas respiratorios crónicos entre otros. La determinación de cloruros en sudor, que hasta la fecha es una prueba diagnóstica para detectar la FQ, presenta algunas desventajas: 1) algunos pacientes presentan cloruros en sudor entre el límite normal y el anormal y 2) no detecta portadores. En contraste el análisis molecular da la posibilidad de prevención de padecimientos como la FQ, donde no existe un tratamiento oportuno. Así mismo el diagnóstico molecular permite detectar las mutaciones del gen CFTR, que provocan la FQ en los pacientes, además permite establecer un pronóstico de la enfermedad, lograr un diagnóstico temprano para ofrecer un tratamiento oportuno, además de la detección de portadores, para brindar un asesoramiento genético de certeza en las familias afectadas y en algunos casos diagnóstico prenatal.

Actualmente se han descrito más de 850 mutaciones en el gen CFTR. La mayoría de estas mutaciones son poco comunes, muchas de ellas tienen una frecuencia menor del 1%. La variación en la frecuencia de las distintas mutaciones en este gen, en los distintos grupos étnicos ocasiona que en algunas poblaciones con poco mestizaje o de carácter endogámico, predominen una o dos mutaciones. Como es el caso de las poblaciones Caucásica y Judío Ashkenazi, en donde al realizar la búsqueda dirigida de 5 mutaciones en pacientes con FQ se logra identificar del 85 al 96% de los alelos afectados respectivamente, mientras que en aquellas poblaciones con alto grado de mestizaje existe una gran diversidad de mutaciones, como es el caso de la población mexicana; en este trabajo se muestra que a pesar de implementar estrategias novedosas como el SSCP posterior al tamizaje dirigido de 12 distintas mutaciones se logró la caracterización del 60% de los alelos afectados, por lo que se piensa que quizá muchas de las mutaciones presentes en nuestra población aún no han sido caracterizadas, esto se ve claramente, por el hallazgo de las 2 mutaciones nuevas descritas en este trabajo (105).

Los datos obtenidos de nuestra búsqueda inicial sugirieron la presencia de mutaciones únicas para la población mexicana.

La detección y análisis de las 4 mutaciones más frecuentes en nuestra población, reveló que la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en la población estudiada fue baja (38.4%) en comparación a lo reportado a nivel mundial y es muy similar al 45% (106) y 34.4% (107) encontrado en otras regiones de México. La mutación G542X tiene una frecuencia más elevada (6.70%) que la descrita a nivel mundial (46), pero es similar a lo encontrado en pacientes Hispanos (59).

Por otra parte, la mutación $\Delta I507$ previamente reportada por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística, como una mutación rara y con una frecuencia menor al 1%, en nuestra población se encontró en el 2.6% de los cromosomas FQ analizados. Este hallazgo puede deberse a que en nuestros pacientes se realiza la búsqueda dirigida de esta mutación $\Delta I507$, mientras que otros autores asumen que en los alelos en los cuales se identifica la $\Delta F508$, la mayoría efectivamente tienen la mutación $\Delta F508$, aunque algunos podrían en realidad tener la $\Delta I507$ (108). En otras palabras, la mutación $\Delta F508$ puede ser enmascarada por la $\Delta I507$ cuando se realiza la búsqueda dirigida de la $\Delta F508$, mediante mutagénesis sitio dirigida (PSM), ya que ambas mutaciones se localizan en codones contiguos, y los pacientes heterocigotos compuestos para las dos mutaciones ($\Delta F508/\Delta I507$) resultan con un patrón de homocigotos para la $\Delta F508$, debido a que al realizar el PCR solamente se amplifica el alelo mutado por la $\Delta F508$ y no el de la $\Delta I507$, precisamente por una doble falla en la alineación de los primers, que resulta por un lado por el cambio de una base en uno de los primers para realizar la PSM y por la delección de un codón ($\Delta I507$); por esta razón es necesaria la búsqueda dirigida de esta mutación en todos los casos, para evitar que pueda ser subestimada, como creemos que sucede en varias poblaciones, si no se busca intencionadamente.

Un hecho relevante es que la mutación S549N fue relativamente frecuente en nuestra población (2.5%) mientras que a nivel mundial se reporta con una frecuencia menor al 0.1% y no se encontró en una muestra de 640 familias españolas con FQ (59) ni en 114 familias argentinas (55).

Los datos obtenidos de nuestra búsqueda inicial, en donde se identificó cerca del 50% de los alelos afectados, sugirieron la presencia de mutaciones únicas para la población mexicana y que el espectro de mutaciones consiste de un gran número de alelos CFTR poco frecuentes. Para caracterizar el espectro de mutaciones, se analizaron mediante la técnicas de SSCP, las muestras de los pacientes que resultaron con al menos un alelo desconocido después de la primera búsqueda. Esta estrategia nos permitió identificar un total de 18 mutaciones diferentes en 112 familias y se incrementó el nivel de detección de mutaciones de la población estudiada hasta un 60%. El porcentaje de alelos mutados caracterizados en la población estudiada es bajo, como lo observado en otras poblaciones principalmente del Sur de Europa que presentan una frecuencia relativamente baja de la mutación $\Delta F508$. En el sur de Francia, se han identificado un total de 40 mutaciones, lo que representa 91% de los cromosomas caracterizados (51); en el Noreste de Italia 22 mutaciones equivalen al 90% de los alelos FQ (53), en Grecia 21 mutaciones se encontraron en 74.5% (109) y 75 mutaciones representan 90.2% de los alelos españoles (59).

La complejidad del espectro de mutaciones observado en el gen CFTR de nuestros pacientes puede explicarse por la mezcla genética entre las poblaciones del Sur de Europa y Amerindia que conforman la población Mexicana. De las 18 mutaciones identificadas en este estudio , 3 fueron leves y 15 fueron graves, lo cual es similar a lo descrito en otras poblaciones, en donde se incluyen pacientes con FQ típica.

Entre estas 18 mutaciones caracterizadas se incluyen dos mutaciones nuevas en nuestra población, que no han sido descritas en otros países: (W1098C y P750L). Con los resultados obtenidos hasta el momento, es difícil realizar una correlación fenotipo-genotipo de las mutaciones nuevas porque sólo se cuenta con un paciente FQ para cada mutación. La W1098C se consideró una mutación leve, porque el paciente tiene manifestaciones leves a pesar de tener una mutación grave (R75X) en el otro alelo y la literatura refiere que las

mutaciones leves son dominantes sobre las graves. En contraste, la otra mutación nueva se clasificó como grave de acuerdo con el cuadro clínico observado en el paciente que la presenta ya que manifiesta insuficiencia pancreática (IP) y afección pulmonar crónica. Es importante mencionar que estas dos mutaciones nuevas fueron ya publicadas, donde se reportan otras 3 mutaciones nuevas (846delT, 4160 insGGGG y 297-1G→A) (105) que junto con las descritas anteriormente ya son 7 las detectadas en la población Mexicana. Esto puede ser el reflejo de la alta heterogeneidad de nuestra población afectada con FQ, lo cual puede explicarse por la compleja composición étnica de la población Mexicana.

Por otra parte, se sabe que el análisis molecular del gen de la FQ ha contribuido de manera muy importante al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y al entendimiento de la correlación entre el efecto de las diferentes mutaciones en la función de la proteína y su repercusión en el cuadro clínico del paciente. El cuadro clínico de la FQ se ha descrito como un amplio espectro de signos y síntomas, donde un paciente puede presentar desde un cuadro grave como en el caso de los homocigotos $\Delta F508$, hasta un cuadro muy leve como en el caso de los homocigotos G551S. En ocasiones el cuadro es atípico manifestándose como único síntoma esterilidad primaria por ausencia congénita de los vasos deferentes (CBAVD) (81).

Es importante destacar que todas las mutaciones afectan de manera diferente la función de la proteína, y que las combinaciones de las mutaciones afectan de manera particular el transporte de cloro a través de las membranas epiteliales. Además, la expresión de un gen también se encuentra influenciada o modificada por su interacción con los otros 50,000 o 100,000 genes que son diferentes en cada individuo, y por los factores ambientales. Por lo tanto las variaciones en el genotipo (mutaciones específicas) se ven reflejadas en el fenotipo, está demostrado que el grado de correlación entre el genotipo CFTR y el fenotipo FQ varía, entre las características clínicas y en gran medida por el estado pancreático, así como en menor proporción la afección pulmonar; esta pobre correlación entre el genotipo CFTR y la severidad de la afección pulmonar sugiere fuertemente una influencia ambiental y secundariamente, factores genéticos (genes modificadores). Ciertos genes se relacionan con una respuesta inmune adaptativa que tiene que ser implicada como genes modificadores. En

el caso del ileo meconial (IM), que es una obstrucción intestinal severa, detectada en el 15-20% de los pacientes con FQ al nacimiento y cursan con insuficiencia pancreática, se ha visto que no necesariamente tienen que ser detectadas mutaciones en el gen CFTR, en algunos casos. Un rango de recurrencia familiar de 29% sugiere que otros factores genéticos son involucrados en la expresión del fenotipo de IM, como es la presencia de un gen FQ modificador para IM que se localiza en el cromosoma 19 en la región 13.2 en humanos. Con lo anterior se explica la variabilidad del cuadro clínico de la fibrosis quística, sin embargo, existen reportes donde se muestra que la función pancreática en la mayoría de los pacientes depende directamente de su genotipo (110), posiblemente por la poca influencia del medio ambiente sobre éste órgano. En contraste, en los pacientes con manifestaciones pulmonares se ha observado que independientemente del tipo de mutación, la afección es variable, incluso en pacientes con el mismo genotipo.

En este trabajo, encontramos que el 78.72% (71/94) de los pacientes presentó insuficiencia pancreática. Los pacientes con SP se detectaron en todos los grupos, excepto en el grupo I, los cuales son homocigotos $\Delta F508$ y la severidad de los síntomas se ve reflejada en su genotipo.

Al analizar la afección pancreática de los pacientes se observa claramente una correlación entre la gravedad de las manifestaciones clínicas y el inicio temprano de las mismas. Por otro lado, aunque el lapso entre el inicio de las manifestaciones clínicas y el diagnóstico de la enfermedad fue prolongado en todos los grupos, el lapso transcurrido se hizo aún más grande cuando los pacientes presentaban un cuadro con función pancreática normal.

Al realizar en nuestro estudio la búsqueda de portadores en los familiares de primer grado encontramos que de 286 individuos analizados 135 son portadores de alguna de las mutaciones más frecuentes en nuestra población (47.2%), lo cual revela una frecuencia alta de portadores en las familias afectadas.

La baja frecuencia de consanguinidad detectada en las familias afectadas con FQ de 3.19% (3/94), así como el número de familiares de segundo grado afectados que detectamos (4.2%), nos lleva a pensar que la frecuencia de portadores en nuestra población es alta.

Es importante hacer notar que a pesar de los grandes avances a nivel molecular y terapéuticos que se han realizado de la FQ, en México hace falta mayor información sobre este padecimiento. Un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría en 1980, mostró que de 32 casos con fibrosis quística diagnosticados en 3,260 autopsias consecutivas, sólo 9 se sospecharon en vida (111). Aún más, en los años 90's algunos casos fueron diagnosticados postmortem mediante análisis molecular (112), por lo que es de esperarse que en los hospitales de primero y segundo nivel un gran número de individuos con fibrosis quística mueran sin diagnóstico y sin tratamiento adecuado. Es por ello que contar con estrategias para el análisis molecular del gen FQ es un logro importante para el diagnóstico y prevención de la fibrosis quística.

CONCLUSIONES

1. La frecuencia de la mutación $\Delta F508$ fue más baja que la reportada a nivel mundial y nos ubica dentro de los países de más baja frecuencia.
2. La frecuencia de la mutación G542X fue más alta que la reportada por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística, pero similar a otras poblaciones hispanas.
3. Las mutaciones $\Delta I507$ y S549N que son mutaciones de muy baja frecuencia a nivel mundial, en nuestra población se encuentran dentro de las 5 mutaciones de mayor frecuencia.
4. Se describen dos nuevas mutaciones (W1098C y P750L) que provocan el cambio de un aminoácido por otro en la proteína CFTR, produciendo un cuadro clínico leve y grave respectivamente.
5. Dada la heterogeneidad génica de nuestra población, al realizar el análisis de 18 mutaciones distintas logramos caracterizar el 60% de los cromosomas afectados.
6. A pesar de que la técnica de SSCP simplifica la búsqueda de mutaciones desconocidas o poco frecuentes, la caracterización de las mutaciones presentes todavía es baja, por lo que sugerimos que el resto de las mutaciones en nuestra población no se encuentran en los puntos calientes del gen, analizados en este trabajo.
7. Con este trabajo surge la necesidad de implementar nuevas estrategias para búsqueda de mutaciones que aumenten la eficiencia del rastreo de las mutaciones presentes en nuestra población.
8. La baja frecuencia de consanguinidad entre los padres de los pacientes, así como el número de familiares de 2o. grado afectados, sugieren que la frecuencia de portadores de FQ en la población mexicana es alta.

BIBLIOGRAFIA

1. Welsh MJ, Tsui L, Boat FT, Beaudet AI. 1995. Cystic fibrosis. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, ed. C Scriver, A Beaudet, W Sly, D Valle, 3:3799-3876. New York.: McGraw-Hill Inc.
2. Pérez L, Flores C, López E, Parra W, Lezana JL. 1989. Cystic Fibrosis in Mexican Children. *Inter. Pediatr* 4: 266-70.
3. Kerem E, Kerem B (1996) Genotype-Phenotype correlation in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 22: 387-395
4. Tomaszefski JF Jr, Bruce M, Stern RC, Dearborn DG, Dahms B. 1985. The pathology of pulmonary air cysts in cystic fibrosis. Relation to radiologic findings and history of pneumothorax. *Hum. Pathol.* 16:253
5. Ryland D, Reid L. 1982. The pulmonary circulation in cystic fibrosis. *Thorax* 30:285
6. Stern RC, Boat TF, Wood Re, Matthews LW, Doershuk CF. 1982. Treatment and prognosis of nasal polyps in cystic fibrosis. *Am. J. Dis. Child.* 126:1067
7. Handwerker S, Roth J, Gorden P, di Sant' Agnese PA, Carpenter DFR, Peter G. 1969. Glucose intolerance in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 281: 451
8. di Sant' Agnese PA, Hubbard VS. 1984. The pancreas. In Taussing LM (ed): *Cystic Fibrosis*. New York, Thieme-Stratton: p 230
9. Mischler EH, Chesney PJ, Chesney RW, Mazes RB. 1979. Demineralization in cystic fibrosis. *Am. J. Dis. Child.* 133: 632
10. Friedman HZ, Langman CB, Favus MJ. 1985. Vitamin D metabolism and osteomalacia in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 38: 803
11. Torstenson OL, Humphrey GB, Edson JR. 1970. Cystic Fibrosis presenting with severe hemorrhage due to vitamin K malabsorption: A report of three cases. *Pediatrics* 45: 857
12. Hansen RC, Lemen R, Revsin B. 1983. Cystic fibrosis manifesting with acrodermatitis enteropathica-like eruption. *Arch. Dermatol.* 129:51
13. di Sant' Agnese PA, Davis PB. 1979. Cystic fibrosis in adults: 72 cases and a review of 232 cases in the literature. *Am. J. Med.* 66:121
14. Rodman HM, Matthews LW. 1981. Hyperglycemia in cystic fibrosis: A review of the literature and our own patient experience. In Warwick WJ (ed): *1000 Years of Cystic Fibrosis*, Minneapolis, MN, University of Minnesota Press, p 67.
15. di Sant' Agnese PA, Blanc WA. 1956. A distinctive type of biliary cirrhosis of the liver associated with cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 188:387
16. Stern RC, Stevens DP, Boat TF, Doershuk CF, Izant RF, Matthews LW. 1976. Symptomatic hepatic disease in cystic fibrosis: Incidence, course, and outcome of portal systemic shunting. *Gastroenterology* 70:645
17. di Sant' Agnese PA, Hubbard VS. 1984. The gastrointestinal tract, in Taussing LM (ed): *Cystic Fibrosis*. New York, Thieme-Stratton, p 212
18. Landing BH, Wells Tr, Wang CI. 1969. Abnormality of the epididymis and vas deferens in cystic fibrosis. *Arch. Pathol.* 88: 570

19. Taussing LM, Lobeck CC, di Sant' Agnese PA, Ackerman DR, Kattwinkel J. 1972. Fertility in males with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 287:586
20. Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS. 1968. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 279:65
21. Valman HB, France EN. 1969. The vas deferens in cystic fibrosis. *Lancet* 2:566
22. Shwachman H, Kowalski M, Khaw KT. 1977. Cystic fibrosis: a new outlook, *Medicine (Baltimore)* 56:129
23. di Sant' Agnese PA, Darlig RC, Perera GA, Shea E. 1953. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics* 12:549
24. Munger B, Brusilow S, Cooke R. 1961. An electron microscopic study of eccrine sweat glands in patients with cystic fibrosis of the pancreas. *J. Pediatrics* 59:497
25. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L-C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analyses. *Science* 245: 1073-1080
26. Riordan JR, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073
27. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1066
28. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, et al. 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10: 214-228
29. Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun S. 1991. The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) superfamily *Adv. Exp. Med Biol.* 290: 19-29
30. Egan M, Flotte T, Aione S, Solow R, Zeitlin PI, et al. 1992. Defective regulation of outwardly rectifying CL-channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR (see comments). *Nature* 358: 581-584
31. Chang X, Hou Y, Jensen TJ, Riordan JR. 1994. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J. Biol. Chem.* 269:18572-18575
32. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, et al. 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253: 202-20549.
33. Oblat-Montal M, Reddy GL, Iwamoto T, Tomich JM, Montal M. 1994. Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of CFTR, the cystic fibrosis channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1495-1499
34. Sheppard DN, Rich Dp, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. 1993. Mutations in CFTR associated with mild-disease form channels with altered pore properties. *Nature* 362: 160-164
35. McDonough S, Davidson N, Lester HA, McCarty NA. 1994. Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block. *Neuron* 13:623-634

36. Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, et al. 1993. Multi-ion pore behavior in the CFTR chloride channel (see comments). *Nature* 366: 79-82 53.
37. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, et al. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827-834
38. Gregory RJ, Rich DP, Cheng SH, Souza DW, Paul S, et al. 1991. Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol. Cell Biol.* 11: 3886-3893
39. Anderson M R, Welsh MJ. 1992. Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* 257:1701-1704
40. Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. 1995. The two nucleotide-binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.* 270: 1711-1717
41. Rich DP, Gregory RJ, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. 1993. Effect of deletion mutation on the function of CFTR chloride channels, *Receptors Channels* 1:221-232
42. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ. 1991. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 66:1027-1036
43. Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P, Neirin AC. 1992. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 267: 12742-12752
44. Wilkinson DJ, Strong TV, Collins FS, Dawson DC. 1994. CFTR activation: stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Pediat. Pulmon. Suppl.* 10:3 (Abstr.)
45. Dulhanty AM, Riordan JR. 1994. Phosphorylation by cAMP-dependent protein Kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 33:4072-4079
46. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. 1994. Population variations of common cystic fibrosis mutations. *Hum. Mutat.* 4: 167-17
47. Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, et al. 1993. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1015-1022
48. Orozco L, Zielenski J, Markiewicz D, Villarreal T, Tsui L-C, Lezana JL, Del Angel RM (1997) Two novel frameshift deletions (1924del7, 2055del9→A) in the CFTR gene in Mexican cystic fibrosis patients. *Hum Mutat* 10:239-240
49. Dodge JA, Brock DJH, Widdicombe JH Cystic Fibrosis: Current Topics Vol. 1 John Wiley and Sons. 357pp
50. Claustres M, Laussel M, Desgeorges M, Giansily M, Culard JF, Razakatsara G, Demaille J (1993) Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in Southern France. *Hum Mol Genet* 2:1209-1213
51. Chillon M, Casals T, Giménez J, Ramos MD, Palacios A, Morral N, Estivill X, Nunes V (1994) Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 93:447-451

52. Bonizzato A, Bisceglia L, Marigo C, Nicolis E, Bombieri C, Castellani C, Borgo G, Zelante L, Mastella G, Cabrini G, Gasparini P, Piagnatti PF (1995) Analysis of the complete codig region of the CFTR gene in a cohort of CF patients from north-eastern Italy: Identification of 90% of the mutations. *Hum Genet* 95: 397-402
53. Estivill X, Bancells C, Ramos C, Biomed CFMA Consortium (1997) in European populations. *Hum Mutat* 10:135-154
54. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, Grenoville M, Segal E, Carniglia L, Kaplan JC, Barreiro C (1997) Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 51:43-47
55. Genetics-European Working Group on CF Genetics 1990. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum. Genet*, 85:436-441
56. Messaoud T, Verlingue C, Denamur E, Pascuad O, Quere I, Fattom S, Elion J, Ferec C (1996) Distribution of CFTR mutations in CF patients of Tunisian origin: identification of two novel mutations. *Eur J Hum Genet* 4:20-24
57. Ammerman AJ, Cavalli-Sforza LL. 1984. The neolithic transition and the genetics of populations in Europe. Princeton: Princeton University Press. Pp
58. Orozco L, Salcedo M, Lezana JL, Chávez M, Valdez H, Moreno M, Carnevale A (1993) Frequency of $\Delta F508$ in a Mexican sample of cystic fibrosis patients. *J Med Genet* 30:501-502
59. Casals T, Ramos MD, Giménez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X (1997) High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet* 101:365-370
60. Villarreal MT, Chávez M, Lezana JL, Cuevas F, Carnevale A, Córdova E, Del Angel R, Orozco L (1996) G542X mutation in Mexican cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 49: 54-5695.
61. Hamosh A, Rosenstein BJ, Cutting GR, 1992. CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet*. 1: 542-544
62. Smith LS, Nasr SZ, Iannuzzi MC, Collins FS. 1993. An African-American cystic fibrosis patient homozygous for a novel frameshift mutation associated with reduced CFTR mRNA levels. *Hum. Mutat*. 2. 148-151
63. Will K, Dork T, Stuhmann M, von der Hardt H, Ellenmunter, et al. 1995. Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Hum. Mutat*. 5:210-22098
64. Will K, Reiss J, Dean M, Schloseer M, Slomski R, et al. 1993. CFTR transcripts are undetectable in lymphocytes and respiratory epithelial cells of a CF patient homozygous for the nonsense mutation R553X. *J. Med. Genet*. 30: 833-837
65. Welsh MJ. 1994. the path of discovery in understanding the biology of cystic fibrosis and approaches to therapy. *Am. J. Gastroenterol*. 89: S97-S105
66. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Suoza DW, et al. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827-834

67. Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, et al. 1990. Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 347: 382-386
68. Lukacs GI, Mohamed A, Kartner N, Chang X-B, Riordan JR, Grinstein S, 1994 Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (**iError!Marcador no definido.F508**) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 13: 6076-6086
69. Ward CI, Kopito RR. 1994. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant protein. *J. Biol. Chem.* 269: 25710-25718
70. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. 1992. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive [see comments]. *Nature* 358: 761-764
71. Hiestad DM, Sorcher EJ, Huang Z, Wang Y, Haley BE. 1994. Use of 2-N³ATP to identify the site of ATP interaction on nucleotide binding domain-2 from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pediatric Pulmonology suppl* 10:42 (Abstr.)
72. Mansoura MK, Strong TV, Collins FS, Dawson DC, 1994. A disease-related mutation in TM5 alters the conduction and gating properties of CFTR. *Pediat. Pulmonol. suppl.* 10: 1 (asbtr.)
73. Sheppard DN, et al 1993. Mutations in CFTR associated with mild disease form Cl channels with altered pore properties, *Nut* 362, 160-164
74. Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. 1993. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 329: 1308-1313
75. Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, Corey M, Levison H, et al. 1992. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly for Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 245-250
76. Kerem B, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, et al. 1990. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis analysis of the most common mutation (delta F508). *N. Engl. J. Med.* . 323: 1517-1522
77. Shoshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, et al. 1992. 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: 222-228
78. Cleghorn G, Benjamin L, Corey M, Forstner G, Dati F, Durie P. 1985. Age-related alterations in immunoreactive pancreatic lipase and cationic trypsinogen in young children with cystic fibrosis. *J. pediatr.* 107: 377-381
79. Gan KH, Heijerman HGM, Bakker W. 1994. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis (letter to the editor). *N. Engl. J. Med.* 330: 865-866
80. Clarke LL (1994) Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in Cfr (-/-) mice. *Proc. Natl. Sci U.S.A.* 91, 479-483
73. Romeo G, Devoto M. 1990. Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. *Hum. Genet.* 85: 391

81. Schellen TCM, van Stratten A. 1980. Autosomal recessive hereditary congenital aplasia of the vasa deferentia in four siblings. *Fertil. Steril.* 35: 401-404
82. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard, B, et al. 1992. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *J. Am. Med. Assoc.* 267: 1794-1797
83. Culard J, Desgeorges M, Costa P, Laussel Razakatzara G, et al. 1994. Analysis of the whole CFTR regions and splice junctions in azoospermic men with congenital bilateral aplasia of epididymis or vas deferens. *Hum. Genet.* 93:467-470
84. Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, et al. 1995. Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 272-277
85. Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ. 1993. Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum. Reprod.* 8: 215-220
86. Gervais R, Dumur V, Rigot J, Lafitte J, Roussel P, et al. 1993. High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of vas deferens. *N. Engl. J. Med.* 328: 446-447
87. Miller PW. 1994. CFTR mutations and adult pulmonary disease. *Pediatr. Pulmonol. suppl.* 10: S11.2
88. Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazo M, Luisetti M. 1994. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Human.Mol.Genet.* 4: 635-640
89. Poller W, Faber JP, Scholz S, Olek K, Muller KM. 1991. Sequence analysis of the cystic fibrosis gene in patients with disseminated bronchiectatic lung disease. Application in the identification of a cystic fibrosis patient with atypical clinical course. *Klin. Wochenschr.* 69: 657-663
90. Simon-Bouy B, Stern M, Taillandier A, Mornet E, Boue A, Caubarrere I. 1993. Increased frequency of the delta F508 mutation in patients with bronchiectasis. *Pediatric Pulmonology suppl* 9: 127 (Abstr)
91. Dork T, Wulbrand U, Richter T, Neumann T, Wolfes H, et al. 1991. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene *Hum. Genet.* 87: 441-446
92. Kieseletter S, Macek MJ, Davis C, Curristin SM, Chu C. 1993. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature Genet.* 5: 274-277
93. Chu C, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. 1993. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genet.* 3: 151-156
94. Strong TV, Wilkinson DJ, Mansoura MK, Devor DC, Henze K, et al. 1993. Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activate chloride conductance. *Hum. Mol. Genet.* 2: 225-230
95. Cox 1999. *Biología Molecular en Medicina. Trastornos Monogénicos* 101-136 pp.
96. Sheppard DN and Ostedgaard LS. 1996. Understanding how cystic fibrosis mutations cause a loss of Cl channel function. *Mol Med Today*, July 290-297

97. Gibson LE, Cooke RE (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilorcarpine iontophoresis. *Pediatrics* 23:545-549
98. van der Kamer JH, ten Bokkel Huinink H Weyers HA. Rapid method for the determination of fat in faeces. *J Biol Chem* 177: 347-355
99. Ausbel F, Brent R, 1988. Current protocols in molecular biology. Overview DNA Sequency Methods. Greene publishing Associates and Wiley- Intersciencie. New York pp 12.8.9.
100. Maniatis T, Sambrook J, 1989 Molecular cloning a laboratory manual VII 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA pp 7.87
101. Friedman KJ, Highsmith WE, Silverman LM, 272 cystic fibrosis mutations n Europe of the mayor CF mutation and of its associated (1991) Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 37:1-6
102. Glavac, D. y Dean, M. A (1994) Comparision of the sensitivity of the single-strand conformation polymorphism and heteroduplex methods. *Methods in Neurosciences*
103. Sanger FR, Nicken S, Coulson A.1997. DNA sequencig with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-5467
104. Gyllensten UB, Erlich HA (1988) Generation of ssDNA by the PCR and its aplication to direct sequencing of the HLADQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 885: 7652-7656
105. Orozco L, Velazquez R, Zielenski J, Tsui L-Ch, Chávez M, Lezana JL, Saldaña Y, Hernández E, Carnevale A. (2000) Spectrum of CFTR mutations in mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G→A) *Hum Genet* 106:360-365
106. Villalobos C, Rojas A, Villarreal E, Cantú JM, Sanchez FJ, Saiki RK, Barrera HA (1997) Analysis of 16 Cystic fibrosis mutations in Mexican Patients. *Am J Med Genet* 69:380-382
107. Flores S, Gallegos M, Moran M, Sánchez J (1997) Detection of $\Delta F508$ mutation in cystic fibrosis patients from northwestern Mexico. *Ann Génét* 40:189-191
108. Schwartz M, Srensen N, Brandt NJ, Hgdall E, Holm T. 1995. High incidence of cystic fibrosis on the Faroe Islands: a molecular and geografical study. *Hum. Genet.* 95: 703
109. Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadis T, Traeger-Synodinos J, Doudounakis S, Adam G, Matsaniotis N, Kattamis C (1995) Mutation analysis of 10 exones of the CFTR gene in Greek cystic fibrosis patients: Characterization of 74.5% of CF alleles including 1 novel mutation. *Hum Genet* 96:364-366
110. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, et al. 1992. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet.* 50:1178-1184
111. López-Corella E, Ridaura, G López. A report of 32 cases in 3260 consecutive pediatric autopsies. *Patologia* 1980; 18:167-181.

112. Salcedo M, Chávez M, Ridaura C, Moreno M, Lezana JL, Orozco L. 1993. Detection of the Cystic Fibrosis Delta-F508 Mutation at autopsy by Site-Directed Mutagenesis. Am J Med Genet 46:268-270

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

APÉNDICE

Preparación de reactivos y soluciones

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

Fenol saturado (Carlo Erba o BRL o destilado)

- Disolver 300 ml de Fenol 100% a 68 °
- Poner en una botella estéril de 500 ml:
 - 200 ml de H₂O destilada estéril
 - 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.

Cloroformo/isoamílico 24:1

- 24 partes de cloroformo
- 1 parte de isoamílico

Agarosa 2.5% y 0.8 %

- Aforar con TBE 1X

Bromuro de etidio
- 5 mg en cada μ l

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

Enzima utilizada en la amplificación.

Enzima	Concentración	Buffer 10X
Amplitaq DNA polimerasa	10 U/ μ l	100 mM tris HCl,

Enzimas 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 ditiotreitól (pH 7.9)
HphI	37°C	NEBuffer 4 50 mM acetato de potasio, 20 mM Tris acetato, 10 mM acetato de Magnesio, 1 mM ditiotreitól (pH 7.9)
DdeI	37°C	NEBuffer 3 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ditiotreitól (pH 7.9)

Bgl II

37°C

NEBuffer 3

100 mM NaCl,
50 mM TRis-HCl,
10 mM MgCl₂,
1 mM ditiotreitól (pH 7.9).

Acrilamida/bisacrilamida 30%

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

Buffer acarreador

- 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.

Preparación de geles de poliacrilamida para mutagénesis sitio dirigida.

Porcentaje	10%	15%
TBE 5%	2.00 ml	3.26 ml
Acril /bisacrilamida 30%	3.06 ml	5.00 ml
H ₂ O	4.83 m	1.56 ml
AP 10%	100 µl	163 µl
TEMED	10 µl	16.3µl
Vol. final.	10.00 ml	10.00 ml

Preparación de gel para SSCP

Solución 1

Acrilamida al 6%, con un crosslinking de 2.5 y sacarosa al 10%

Acrilamida 40%	15 ml
TBE 10X	10 ml
Sacarosa	10 g

Llevar a un vol. Final de 100 ml.

De la solución 1 se tomaron	15 ml
TBE 5X	3.6 ml

H ₂ Odd		41.4 ml
Persulfato de amonio 10%		240 µl
TEMED		24 µl

Lo anterior se lleva a un volumen de 60 ml, cantidad necesaria para una cámara de electroforesis vertical de 45 cm x 70 cm.

Solución Stop para SSCP y secuenciación

Formamida	95%	19 ml
EDTA	20 mM	0.15g
Azul de bromofenol	0.5%	0.01g
Xilen Cianol	0.5%	0.01g
H ₂ Odd		20 ml

Preparación de gel para Secuenciación:

Acrilamida al 40%

Acrilamida	200g
Bis-acrilamida	6.7g

Aforar a 500 ml

Beffer GTG 20x

TRIS	216g
Taurina	72g
EDTA	4g

Aforar a 1000 ml

Para Buffer de corrida se lleva a 0.8x