



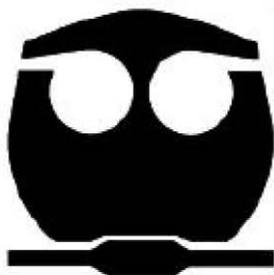
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM**
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE
MUTACIONES EN EL GEN *JAG1* POR
TÉCNICA DE DHPLC EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE ALAGILLE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
QFB. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ



Tutor: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

MÉXICO, D. F.

Octubre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *JAG1* POR TÉCNICA DE DHPLC EN PACIENTES CON SÍNDROME DE ALAGILLE.

I. Reconocimientos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y asesoría de la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso en el laboratorio 206 del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Dr. Ángel Zarain Herzberg	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso, del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de dHPLC y secuenciación.

Se reconoce la colaboración del Dr. Gustavo Varela Fasscineto, del Departamento de Cirugía de Trasplantes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, quien refirió pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Alagille.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (Fondo 105088) y Fondos Federales (HIM/2007/013). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr.
Vocal	Dr.
Vocal	Dra.
Vocal	Dra.
Secretario	Dra.
Suplente	Dr.
Suplente	Dr.

II. Agradecimientos

A mis padres, hermanos y sobrinos por acompañarme durante esta etapa y por su apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Marco Cerbón y a la Dra. Verónica Morán por su apoyo, asesoría y tiempo invertido para la realización de este trabajo.

A los Doctores Marta Menjívar y Ángel Zarain por su apoyo y acertadas observaciones y correcciones para enriquecer el presente trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de estos estudios.

A Leticia García por el seguimiento y asesoría con los trámites del posgrado.

A los laboratorios 206 del Edificio F de la F.Q. y de Biología Molecular del HIMFG por su asesoramiento y apoyo en las técnicas utilizadas para la realización de este trabajo.

A Lizbeth y amigos por hacer más agradable esta etapa.

A los pacientes y familiares que participaron en el protocolo HIM/2007/013 y al departamento de Genética y Trasplantes.

III. Índice.

I. RECONOCIMIENTOS.....	2
II. AGRADECIMIENTOS.....	3
III. ÍNDICE.....	4
IV. RESUMEN.	5
V. ANTECEDENTES.....	6
5.1. SÍNDROME DE ALAGILLE.....	6
5.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	8
5.1.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.....	20
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
VII. JUSTIFICACIÓN.....	26
VIII. HIPÓTESIS.....	27
IX. OBJETIVOS.....	27
X. MATERIAL Y MÉTODOS.	28
10.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	28
10.2. TOMA DE MUESTRA.....	29
10.3. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.	29
10.4. CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL DNA.....	31
10.5. PCR, dHPLC Y SECUENCIACIÓN DIRECTA.....	34
XI. RESULTADOS.	47
11.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	47
11.2. CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO.....	49
11.3. OBTENCIÓN DE VARIANTES.....	50
XII. DISCUSIÓN.....	55
XIII. CONCLUSIONES.....	80
XIV. PERSPECTIVAS.....	81
XV. BIBLIOGRAFÍA.	83
XVI. ANEXOS.....	96
16.1. METODOLOGÍA PARA CLONACIÓN A PARTIR DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE EL SISTEMA pGEM®-T VECTOR.....	96
16.2. REACTIVOS.....	97
16.3. EQUIPOS Y OTROS MATERIALES.....	97
16.4. TABLAS ANEXAS.....	98
16.5. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	101

IV. Resumen.

El síndrome de Alagille es un padecimiento multisistémico con un patrón de herencia autosómico dominante que presenta colestasis biliar, cardiopatías congénitas, facies característica, embriotoxón posterior y alteraciones esqueléticas (del tipo de vértebras en mariposa), principalmente. La mortalidad ocurre entre el 10% y el 20% de los pacientes y es una de las principales formas de enfermedad crónica hepática de la infancia con alta morbilidad. Este padecimiento presenta expresividad variable lo cual dificulta su diagnóstico clínico.

Mutaciones en el gen *JAG1* pueden ocasionar el síndrome de Alagille (OMIM ALGS1#118450) en el 25% al 89% de los casos. El producto protéico participa como ligando canónico para activar la vía de Notch, cuya alteración conduce a defectos en el desarrollo y en la función tisular, entre otros.

El presente trabajo consiste en la búsqueda de cambios en la secuencia codificante y regiones involucradas en el corte y empalme del gen *JAG1* en 11 pacientes mexicanos con este síndrome y 50 controles mediante un tamizaje previo por dHPLC.

Se identificaron 7 mutaciones en pacientes distintos, 5 de las cuales no han sido reportadas previamente. El porcentaje del tipo de mutaciones encontradas fue similar al reportado en la literatura: 57% sin sentido, 29% que alteran el corte y empalme y 14% que corresponde a una delección. Se descartó la presencia de mutaciones en controles y se estableció la frecuencia de los polimorfismos encontrados, los cuales en general tienen frecuencias similares a las reportadas en otras poblaciones. El presente trabajo demuestra la utilidad del diagnóstico molecular en pacientes con sospecha clínica de Síndrome de Alagille, lo que tiene implicaciones directas en el asesoramiento genético.

V. Antecedentes.

5.1. Síndrome de Alagille.

El síndrome de Alagille (OMIM #118450) es un padecimiento multisistémico con un patrón de herencia autosómico dominante que involucra principalmente al hígado, corazón, ojos, sistema esquelético y tiene una facies característica (Kamath et al, 2010). Los rasgos clínicos son muy variables inclusive dentro de una misma familia, lo cual dificulta su diagnóstico y pueden no estar presentes todos ellos al nacimiento (Kamath et al, 2003).

Las manifestaciones clínicas principales son: colestasis (caracterizada por estenosis biliar), cardiopatías congénitas (principalmente de arterias pulmonares), facies característica, alteraciones oculares (embriotoxón posterior) y alteraciones esqueléticas del tipo vértebras en forma de mariposa. También se han reportado defectos en el sistema nervioso central y riñones, entre otros (Tabla 1) (Krantz et al, 1997; Emerick et al, 1999; Lykavieris et al, 2001). Los criterios clínicos que corresponden al diagnóstico de síndrome de Alagille consisten principalmente en la determinación histológica de una disminución de los conductos biliares (lo cual se ha observado en el 90% de los casos) y la observación de al menos tres de las cinco características clínicas principales descritas en el Síndrome (Spinner et al, 2010)

El fenotipo del 95% de los pacientes con síndrome de Alagille se debe a mutaciones en los genes *JAG1* y *NOTCH2* (OMIM ALGS1#118450 y OMIM ALGS2#610205), cuyos productos protéicos participan como ligando y receptor de la vía de Notch, respectivamente. Esta ruta de señalización es una vía intercelular conservada evolutivamente en vertebrados que es requerida durante el desarrollo y la fase adulta para mecanismos diversos como diferenciación, proliferación celular y apoptosis, cuya alteración está asociada a aberraciones en el desarrollo y función tisular en el síndrome de Alagille y otras enfermedades (Kopan et al, 2009). Si se considera que hasta en el 47% de

pacientes con síndrome de Alagille confirmados por genotipificación, no presentaron todas las características clínicas principales, entonces este abordaje representa una importante posibilidad de apoyo al diagnóstico (Kamath et al, 2003).

La mortalidad en el síndrome de Alagille es del 10% al 20%, principalmente por la afectación del hígado, corazón y defectos vasculares. Además, se ha establecido como una de las principales formas de enfermedad crónica hepática de la infancia con morbilidad severa. La prevalencia es de 1 por cada 100 000 nacidos vivos en Estados Unidos, considerando únicamente los neonatos con padecimientos hepáticos (Spinner et al, 2010).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de 92 individuos con síndrome de Alagille. Obtenido de (Emerick et al, 1999).

Hallazgo clínico	Frecuencia	% de individuos
Disminución de los conductos hepáticos	69/81	85
Colestasis crónica	88/92	96
Murmullo cardíaco	90/92	97
Hallazgos oculares	65/83	78
Anomalías vertebrales	37/71	51
Facies característica	86/92	96
Enfermedad renal	28/69	40
Insuficiencia pancreática	7/17	41
Retraso en crecimiento	27/31	87
Retraso mental	2/92	2
Desarrollo retardado	15/92	16

El manejo de los pacientes con síndrome de Alagille requiere de un equipo multidisciplinario, siendo de particular interés especialistas en las áreas de genética, gastroenterología, nutrición, cardiología, oftalmología, trasplantes y pediatría, entre otros. No existe un tratamiento específico para estos pacientes, siendo el objetivo principal mejorar la calidad de vida y el pronóstico de la enfermedad para lo cual se ha establecido manejo mediante dietas especiales, suplementos alimenticios, medicamentos para disminuir el prurito provocado generalmente después del trasplante, entre otros (Kamath et al, 2010; Mozer-Glassberg et al, 2011).

5.1.1. Características clínicas.

I. Manifestaciones hepáticas.

La colestasis biliar es el criterio más importante para considerar el diagnóstico clínico de síndrome de Alagille. Se presenta como consecuencia de la disminución de los conductos biliares y se visualiza mediante biopsia hepática (Spinner et al, 2010).

Los conductos biliares intrahepáticos son desarrollados a partir de colangiocitos (células epiteliales) derivados de hepatoblastos (Fig. 1). Células que expresan Sox-9 (factor transcripcional que sincroniza el desarrollo de los conductos biliares) se unen a las ramificaciones de la vena porta para formar la lámina epitelial de los conductos. Esta lámina epitelial lleva a cabo la formación de los conductos biliares a través de un proceso de remodelamiento, basado en la asimetría trascendente creada por los colangiocitos y hepatoblastos, que finalmente se diferenciarán a colangiocitos (Antoniou et al, 2009).

Se ha establecido que las vías de señalización de TGF- β , Wnt/ β -catenina y Notch controlan la diferenciación biliar localizada (Zong Y et al, 2011). La vía TGF- β en proporciones adecuadas participa en la diferenciación de los hepatoblastos a células biliares (Clotman et al, 2005), la vía de Wnt/ β -catenina

estimula la proliferación de hepatoblastos y la diferenciación biliar (Decaens et al, 2008) y la vía de Notch dirige la tubulogénesis biliar (Fig. 1A).

La estenosis biliar observada en los pacientes con síndrome de Alagille fue la pauta para señalar que la vía de Notch tiene una participación importante en múltiples pasos del desarrollo biliar (incluyendo la diferenciación de los colangiocitos), debido a las mutaciones encontradas en los genes *JAG1* y *NOTCH2* (McDaniell et al, 2006).

Esta vía además de contribuir a la diferenciación de las células biliares que forman el conducto intrahepático, delimita su localización en la periferia de la vena porta por la expresión de *Jagged1* en la mesénquima periportal y de *Notch2* en las células biliares (Zong et al, 2009; Geisler et al, 2008). Adicionalmente se observó que en ausencia de *Hes-1* (blanco de la vía de Notch) la formación de los conductos no se lleva a cabo (Kodama et al, 2004).

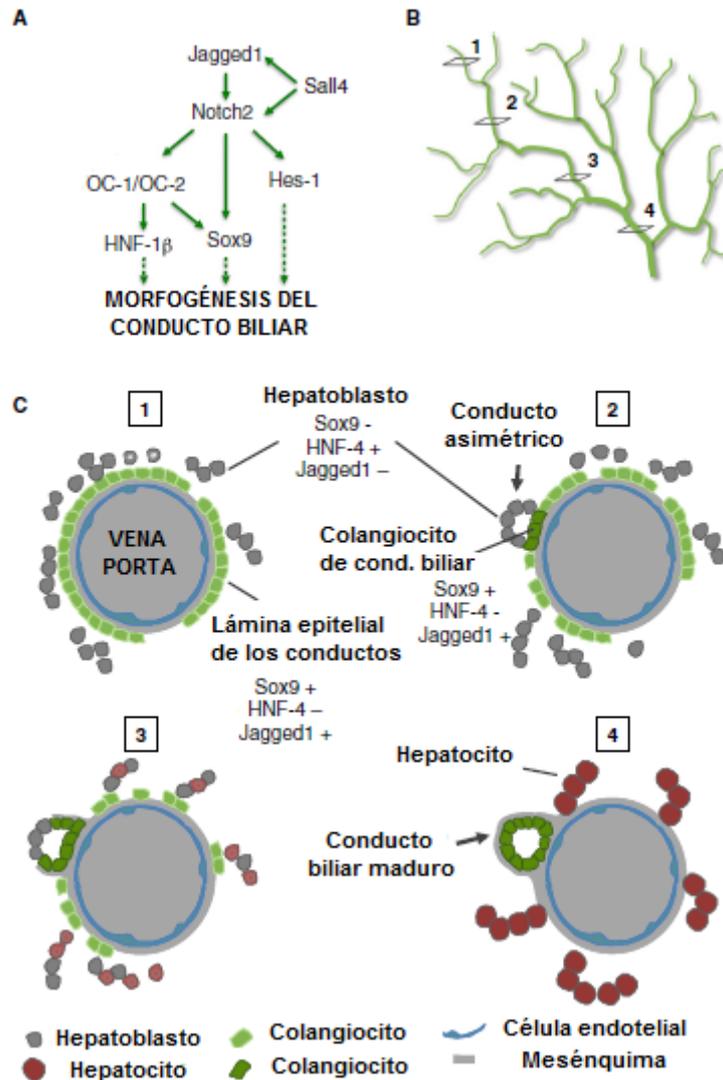


Figura 1. Desarrollo de los conductos biliares. A- Genes implicados en la vía de Notch y el desarrollo de los conductos. B y C- La morfogénesis de los conductos se lleva a cabo desde el hílum del hígado hasta la periferia de los lóbulos. 4- Conductos maduros. 1- Formación de lámina epitelial. 2 y 3- Fases intermedias entre 1 y 2 (Modificado de Si-Tayeb et al, 2010).

Recientemente se ha descrito que la activación de la vía de Notch por Notch2, regula la diferenciación y el mantenimiento de la lámina epitelial, así como la inducción de la tubulogénesis en distintas etapas (Tchorz et al, 2009; Sparks et al, 2010). Sin embargo, contradictoriamente se observó en un modelo murino que la inactivación de Notch2 sólo afecta la morfogénesis y no la diferenciación biliar, pudiéndose deber ya sea a la redundancia que existe entre los receptores de la vía de Notch que se expresan en el hígado del embrión o a las condiciones experimentales (Geisler et al, 2008; Kodama et al, 2004).

En la etapa adulta a diferencia de la etapa de desarrollo, el mantenimiento de la estructura de los conductos hepáticos y el aumento de los mismos depende también de otras señales como la de la aglutinina dolichos biflorus (DBA). Además se ha señalado el requerimiento de un umbral de la vía de Notch para el desarrollo y mantenimiento de dicho conducto durante el desarrollo del hígado, el cual determina la densidad de la arquitectura tridimensional del árbol biliar formado por los conductos intrahepáticos (Sparks et al, 2010).

Las alteraciones hepáticas en pacientes con síndrome de Alagille se presentan por lo regular durante los primeros tres meses de vida. Estas pueden manifestarse como ictericia, colestasis moderada y prurito hasta falla hepática. La ictericia suele ir acompañada de hiperbilirrubinemia en el periodo neonatal, así como ocasionalmente puede presentarse el incremento de concentraciones séricas de ácidos biliares (que forman parte de la bilis), fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) que participa en la síntesis y degradación del glutatión, triglicéridos y aminotransferasas. La colestasis biliar además de ser progresiva se manifiesta como prurito, xantomas, falla en el crecimiento y aumento de ácidos biliares en suero (Spinner et al, 2010).

En raras ocasiones el síndrome de Alagille puede estar acompañado por hepatocarcinoma sin la presencia de cirrosis, debido posiblemente a una desregulación de la expresión los genes implicados en el ciclo celular por la vía de Notch (Tsai et al, 2010).

Aproximadamente el 25% de los pacientes pediátricos afectados requieren trasplante de hígado cuando las alteraciones hepáticas progresan hasta la cirrosis y la falla hepática. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado marcadores ni correlaciones genotipo-fenotipo que tengan un valor predictivo para el estado del hígado y la enfermedad terminal hepática, (Kamath et al, 2010). Lo anterior es de importancia fundamental en la toma de decisiones para realizar el trasplante hepático. Actualmente se considera la enfermedad hepática terminal como criterio fundamental para llevar a cabo el trasplante (Spinner et al, 2010).

En el estudio de Arnon et al, 2010 se llevó a cabo un meta-análisis del pronóstico después del trasplante hepático en pacientes con síndrome de Alagille entre los años 1987 y 2008 (Tabla 2). En este estudio se destacaron en orden de frecuencia como principales causas de muerte de los pacientes trasplantados: el mal funcionamiento del hígado trasplantado, infecciones, complicaciones neurológicas, complicaciones cardiovasculares, fallas en múltiples órganos y falla respiratoria.

Tabla 2. Pronósticos después del trasplante de hígado en pacientes con síndrome de Alagille. (Arnon et al, 2010).

Pronóstico	%	Pronóstico	%
Duración del trasplante		Supervivencia del paciente	
1 año	74.7	1 año	82.9
5 años	61.5	5 años	78.4
Pérdida del trasplante		Muerte temprana	
< 30 días	11.7	< 30 días	9.6
< 14 días	7.6	< 14 días	7.6

II. Manifestaciones cardíacas.

Alteraciones en el desarrollo del tracto del flujo cardíaco están asociadas con el síndrome de Alagille. Esta estructura embrionaria conecta los ventrículos con la aorta ascendente y la arteria pulmonar (High et al, 2008). Las alteraciones comprenden lesiones obstructivas como la estenosis de la arteria pulmonar, la tetralogía de Fallot y defectos del tabique interventricular (McElhinney et al, 2002), lo cual fue demostrado en un modelo murino con haploinsuficiencia de los genes *Jag1* y *Notch2* (McCright et al, 2002).

La formación del tracto del flujo cardíaco requiere de la participación de distintos tejidos como las células endoteliales y las células de la cresta neural. Estas últimas pertenecen a un grupo de células precursoras que provienen del tubo neural dorsal y su diferenciación a otras estirpes está influenciada por la vía de Notch (Cornell et al, 2005).

El desarrollo de los vasos sanguíneos asimétricos a partir del remodelamiento de las arterias del arco aórtico y la separación del tracto del flujo cardíaco,

requieren de la migración y revestimiento de los nuevos vasos sanguíneos por las células de la cresta neural, así como de la diferenciación de éstas a células de músculo liso (Stoller et al, 2005) (Fig. 2).

Se ha establecido que la vía de Notch participa en la diferenciación de estas células a músculo liso, lo cual se ha señalado como un posible mecanismo de la estenosis pulmonar observada en los pacientes con síndrome de Alagille, ya que la capa de músculo liso se requiere para mantener la estructura de las arterias en desarrollo (High et al, 2007; Kamath et al, 2004). Este mecanismo también puede explicar los otros fenotipos observados en estos pacientes como son: murmullos cardíacos, alteraciones del tabique interventricular, estenosis de la aorta, entre otros.

La mutación *G274D* en el gen *JAG1* en pacientes con tetralogía de Fallot altera el plegamiento correcto del dominio donde se encuentran los repetidos tipo EGF, lo cual seguramente no permite la interacción adecuada con los receptores Notch y por lo tanto la activación de la vía (Guarnaccia et al, 2009). Sin embargo, al igual que ha sido mencionado en párrafos anteriores, diferentes genes parecen intervenir en la presentación de la tetralogía de Fallot, la cual puede presentarse tanto de manera aislada (o como alteración única) como de forma sindrómica (al formar parte de diferentes síndromes) y se considera que en su forma aislada presenta un patrón de herencia de tipo multifactorial.

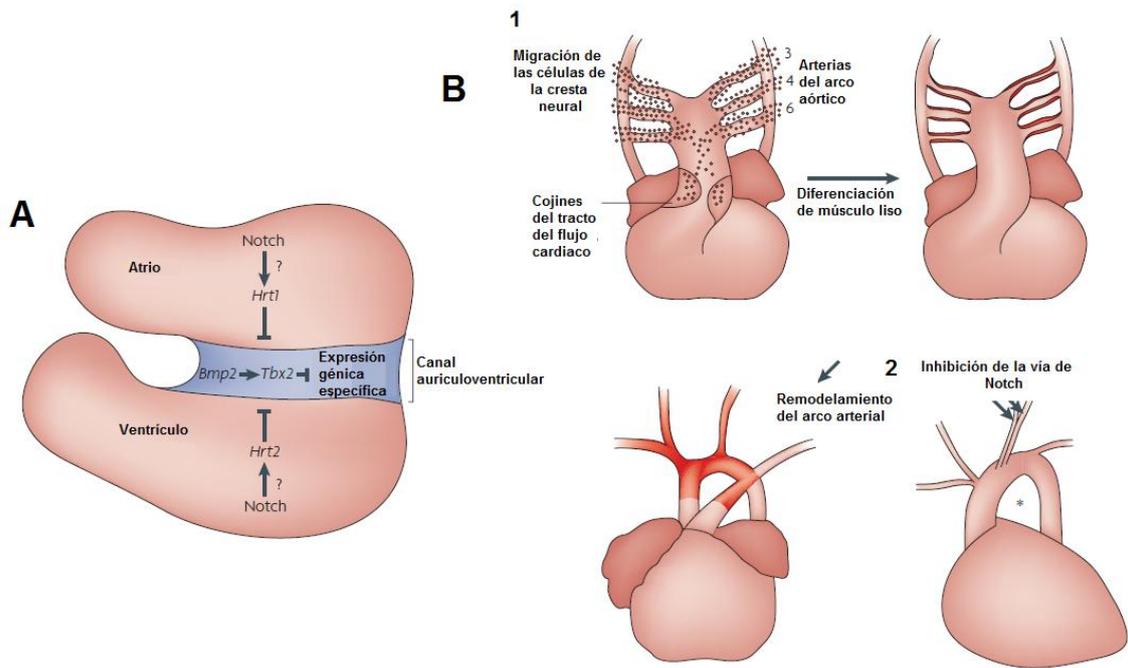


Figura 2. Influencia de la vía de Notch en el desarrollo cardíaco. A-Desarrollo del canal atrioventricular. B- Desarrollo del tracto del flujo cardíaco. 1- Formación del arco aórtico maduro en presencia de la vía de Notch. 2- Malformaciones (duplicación de arterias) observadas al inhibir la vía de Notch. (Modificado de High et al, 2008).

III. Manifestaciones oculares.

El embriotoxón posterior es la característica clínica ocular más común en los pacientes con síndrome de Alagille, la cual se identifica por la presencia del anillo de Schwalbe, un defecto de la cámara anterior del ojo (Fig. 3). Esta alteración no afecta la visión de los pacientes, sin embargo es un criterio útil de diagnóstico si bien no definitivo ya que del 8% al 15% de la población en general presentan este defecto (Spinner et al, 2010).

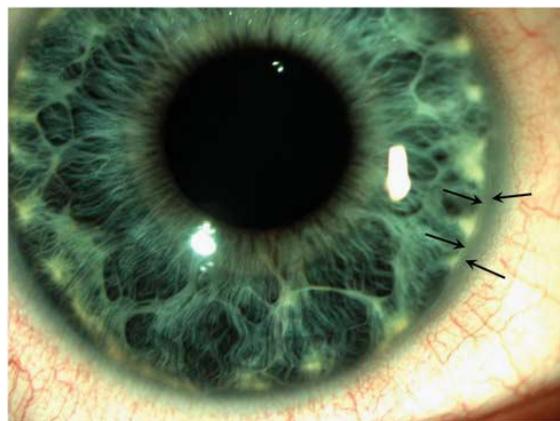


Figura 3. Embriotoxón posterior señalado por flechas. (Turnpenney et al, 2011).

Se han encontrado otros defectos oculares como son: las anomalías de Axenfeld y Rieger (ausencia de desarrollo en la cámara anterior del ojo con o sin glaucoma), alteraciones en el disco óptico (Nischal et al, 1997) y cambios en el pigmento de la retina (Hingorani et al, 1999).

El pronóstico de la visión en estos pacientes es bueno, aunque se ha observado pérdida de la agudeza visual y pérdida de la vista asociada a hipertensión intracraneal (Narula et al, 2006).

No se han descrito con detalle los eventos moleculares que conllevan a las alteraciones oculares en los pacientes con síndrome de Alagille. Sin embargo, en varios estudios se ha establecido la participación de la vía de Notch y Jagged1 en el desarrollo ocular, sobre todo en el cristalino.

Durante el desarrollo del cristalino, la vía de Notch participa en la formación y crecimiento de la vesícula que contiene al cristalino a través de la activación sinérgica de *Foxe3*, el cual es un factor de transcripción indispensable en este proceso (Ogino et al, 2008). Además, se ha establecido que esta vía es indispensable, a través de la expresión de *Jagged1* en un contexto espacio temporal estricto, en la formación de las fibras primarias del cristalino (fibras largas y finas formadas a partir de la vesícula del cristalino), la expansión de las células progenitoras del cristalino en la capa epitelial anterior y en la diferenciación de las fibras secundarias (constituyen la mayoría del cristalino maduro) (Jia et al, 2007; Rowan et al, 2008; Tien et al, 2009). Se ha demostrado que la participación de Notch2 y Jagged1 en el proceso de diferenciación de las fibras secundarias mediante un mecanismo de inducción lateral dependiente del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) (Saravanamuthu et al, 2009).

La vía de Notch también participa en la diferenciación neuronal, proliferación, apoptosis y conservación del fenotipo en la retina (Reisenberg et al, 2009). Sin embargo, no se han establecido con claridad los ligandos y receptores que participan y qué estirpes específicamente son favorecidas.

IV. Manifestaciones óseas.

La vértebra en forma de mariposa (Fig. 4) es la característica ósea más común en los pacientes con síndrome de Alagille, la cual consiste en una hendidura anormal de las vértebras, por lo regular a nivel torácico (Spinner et al, 2010). La prevalencia de esta alteración en los pacientes es del 33% al 87% (Emerick et al, 1999; Sanderson et al, 2002). Usualmente es asintomática y no genera ninguna complicación, al igual que el embriotoxón posterior se emplea como apoyo diagnóstico. Existen otras alteraciones esqueléticas que han sido reportadas en estos pacientes, como las anomalías en dedos con falanges pequeñas y craneosinostosis, entre otras (Yen et al, 2010). Sin embargo, su frecuencia ha sido muy baja en comparación con la frecuencia de la vértebra en mariposa.

Se ha reportado que podría existir un alto riesgo de fracturas a temprana edad en los pacientes con este síndrome debido al efecto adverso de la colestasis biliar y la acidosis tubular renal en el metabolismo óseo (absorción de vitaminas y minerales), siendo más frecuente en las extremidades inferiores (Bales et al, 2010)

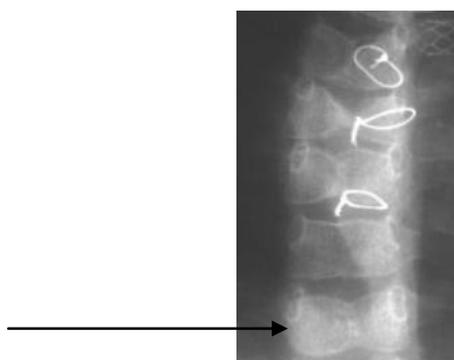


Figura 4. Vértebras en forma de mariposa (flecha) en la espina torácica de un paciente con síndrome de Alagille. (Turnpenny et al, 2007).

La vía de Notch participa en el desarrollo del esqueleto durante la embriogénesis y posterior al nacimiento (Zanotti et al 2010). Sin embargo, su sobreactivación ha mostrado inhibir la osificación endocondral (la cual no implica cartílago) y la diferenciación de osteoblastos, provocando osteopenia.

Además del síndrome de Alagille, alteraciones en la vía de Notch pueden causar enfermedades que afecten el tejido esquelético como el caso de la disostosis espondilocostal y el osteosarcoma. En el caso particular del síndrome de Alagille se ha propuesto que los defectos en la columna vertebral se pueden deber a una alteración en la somitogénesis, la cual está implicada en la adecuada segmentación de distintos planos corporales (Shifley et al, 2007).

La columna vertebral deriva del arreglo de las somitas. Las somitas son bloques provenientes del mesodermo dispuestos en pares que se encuentran localizados a cada lado del tubo neural y son formados como repetidos del mesodermo presomítico en dirección cefálica (Dunwoodie, 2009). Dicha segmentación reiterativa es controlada por el reloj de segmentación que genera estímulos periódicos para distintas vías de señalización, ya que dirige el patrón posicional de cada somita en porciones caudales y cefálicas y que a su vez dictaminará su unión con el esclerotomo para formar la vértebra (Saga et al, 2001; Dequeant et al, 2008).

Se ha demostrado que la vía de Notch es indispensable en este proceso y en la formación de somitas. Uno de los blancos de la vía de Notch, el homólogo del mesodermo posterior 2 (*Mesp2*), juega un papel central en el establecimiento de la polaridad de las somitas (Saga, 2007). Además, se ha establecido la importancia de otros componentes de la vía de Notch, así como de sus genes blanco en la somitogénesis (Sieger et al, 2006).

V. Facies característica.

Las características faciales observadas en forma prácticamente universal en los pacientes con síndrome de Alagille son: frontal y mandíbulas prominentes, ojos de localización profunda, barbilla puntiaguda, nariz recta con punta bulbosa. Se ha establecido que estos pacientes, la facies aparenta un triángulo invertido (Krantz et al, 1997) (Fig. 5).



Figura 5. Facies característica del síndrome de Alagille. (Spinner et al, 2010).

VI. Manifestaciones renales.

Dentro de las alteraciones renales principales observadas en los pacientes con síndrome de Alagille se encuentran: hipertensión renovascular, hipoplasia o agenesia renal, enfermedad renal quística, mesangioliipidosis, nefritis tubulointersticial y acidosis tubular (Shrivastava et al, 2010). A pesar de que las alteraciones renales no son muy frecuentes en los pacientes con síndrome de Alagille, se ha propuesto que pacientes con hipertensión renovascular (adultos) y agenesia renal unilateral (niños) en ausencia de algunas de las características clásicas, deben ser considerados dentro de los diagnósticos diferenciales para el síndrome de Alagille (Yucel et al, 2010; Shrivastava et al, 2010).

Se ha establecido que Notch2 tiene un papel fundamental durante el desarrollo del túbulo proximal y el glomérulo durante la segmentación de la nefrona (Cheng et al, 2007) (Fig. 6). Se ha demostrado que la activación por Notch1 a niveles fisiológicos participa en menor proporción durante el desarrollo del riñón y que posiblemente requiera de la señalización por Notch2 (Chen et al, 2005).

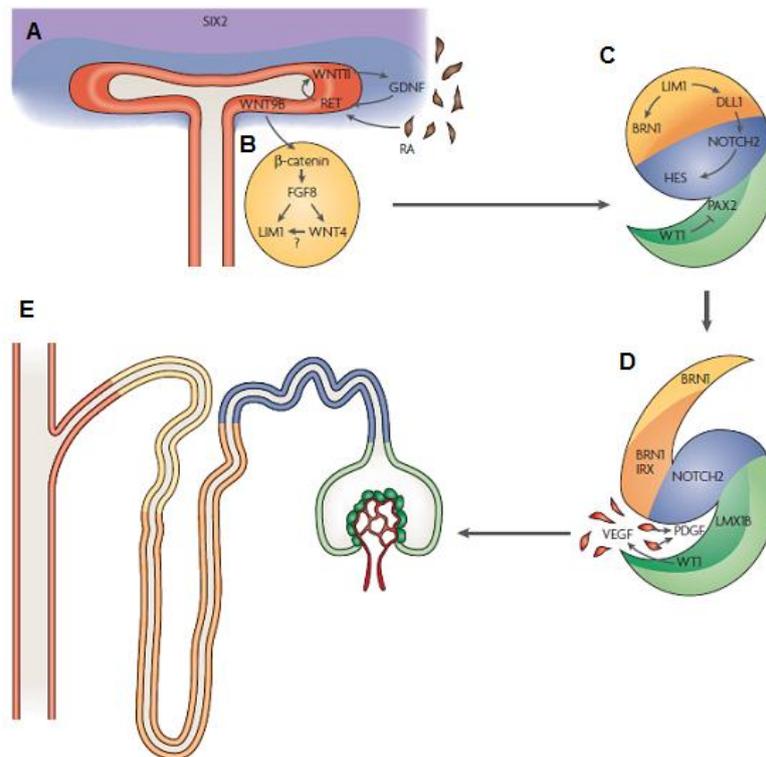


Figura 6. Participación de Notch en distintas etapas de la inducción de la nefrona. A- Interacciones entre la yema ureteral y B- mesénquima metanéfrica. C- Vesícula renal. D- Estructura en forma de S. E- esquema de una nefrona. (Obtenido de Schedl, 2007).

VII. Otras características.

Además de las implicaciones en los distintos sistemas y órganos señalados en los puntos anteriores, se ha encontrado con menor frecuencia lo siguiente:

- Alteraciones pancreáticas.
- Crecimiento anormal (Emerick et al, 1999; Arvay et al, 2005).
- Retraso mental y movimientos lentos (Emerick et al, 1999).
- Accidentes neurovasculares (Emerick et al, 1999) con una mortalidad del 34% (Kamath et al, 2004).
- Pubertad retardada (Spinner et al, 2010).
- Hipodontia marcada (Ho et al, 2000).

5.1.2. Características moleculares.

I. *JAG1*.

El gen *JAG1* contiene 26 exones y 25 intrones, se encuentra en el locus 20p12.2, tiene 3 transcritos diferentes de acuerdo al corte y empalme alternativo (dos productos proteicos), dentro de los cuales, el transcrito *JAG1-001* (ENST00000254958) se expande por 5.901 kb, codifica para una 1218 aminoácidos que conforman 11 dominios diferentes de la proteína *JAGGED1* y contiene mas de 300 variantes reportadas (Ensembl) (Fig. 7). Se han establecido modelos de varios dominios de *JAGGED1*, en los cuales se ha establecido la importancia de algunos residuos de aminoácidos en su función de acuerdo las estructuras obtenidas (Fig. 8).

El dominio de proteínas Delta y tipo OSM (DSL) es la región mas conservada evolutivamente y es indispensable para la interacción con los receptores tipo Notch y activación de la vía (Komatsu et al, 2008). El dominio DOS comprende los repetidos tipo factor de crecimiento epidermal (EGF1 y EGF2), los cuales adoptan estructuras secundarias que conforman la parte funcional de este dominio. Mutaciones en regiones cercanas a una parte conservada de este dominio están asociadas con el síndrome de Alagille y tetralogía de Fallot, por lo que se ha descrito como sitio potencial de unión a Notch. Además se ha establecido que el repetido EGF12 es crítico para la interacción con el receptor. El dominio transmembranal de *JAGGED1* aunque no interactúa con los receptores tipo Notch es indispensable para que el ligando se ancle a la membrana y por lo tanto active la vía. Finalmente, el dominio que corresponde al péptido señal (localizado en la parte aminoterminal del péptido), es requerido para la maduración del péptido funcional en el aparato de Golgi (Kopan et al, 2009).



Figura 7. Representación del cromosoma 20, el gen *JAG1*, los dominios predichos a partir de distintas bases de datos y variantes a lo largo de la secuencia de aminoácidos. Cuadro verde, mutación sinónima; cuadro naranja, mutación no sinónima; triángulo azul, deleción. Debido al gran número de variantes reportadas, sólo se muestran algunas de éstas a lo largo del gen. Modificado de Ensembl.

Se ha demostrado que *JAG1* se expresa principalmente en ovario, próstata, páncreas, placenta, corazón, riñón, músculo esquelético y pulmón en la etapa adulta (Oda et al, 1997; Gray et al, 1999). Durante el desarrollo embrionario se expresa en corazón, arteria pulmonar, arterias principales, vena porta, vesícula del cristalino, otocisto, arcos branquiales, mesodermo metanéfrico, páncreas, mesocardio, alrededor de los bronquios y en el tubo neural (Jones et al, 2000).

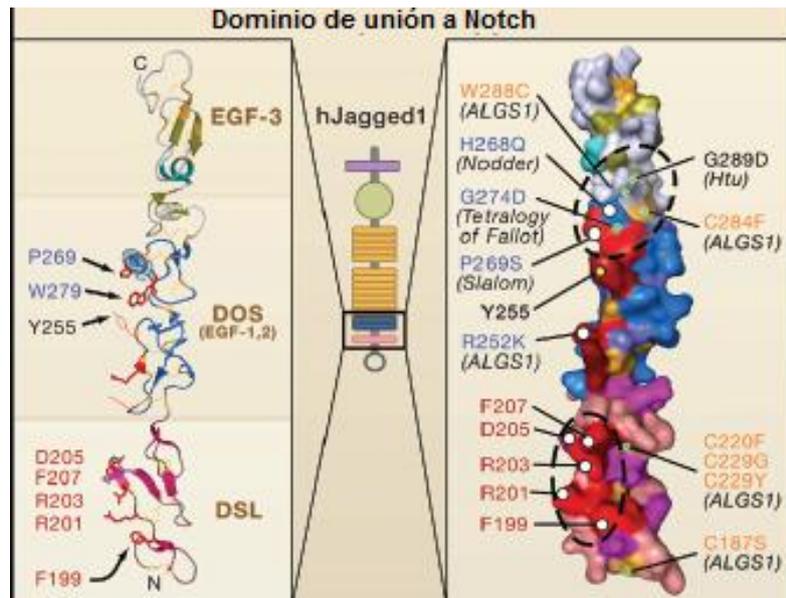


Figura 8. Dominio de unión a Notch de JAGGED1 humana y su caricatura en modelo de cintas. Los aminoácidos necesarios para la interacción con Notch del dominio DSL se encuentran en rojo; residuos expuestos en la superficie con círculos blancos, residuos ocultos a la superficie con círculos verdes; mutaciones en naranja son asociadas al síndrome de Alagille; las mutaciones en azul muestran las patologías a las que se asocian. (Modificado de Kopan et al, 2009).

Las funciones del producto protéico de este gen en la formación de distintos órganos se mencionan en el apartado de características clínicas, lo cual aunado con el patrón de expresión en distintos órganos de las etapas adultas y del desarrollo, se atribuye al fenotipo observado en estos pacientes. Aunque no se ha establecido claramente la regulación de la expresión de *JAG1*, se ha establecido que éste puede ser regulado por proteínas como Twist1 y los factores de transcripción Hnf1 α y β , que participan en el desarrollo óseo e intestinal respectivamente, por lo que probablemente depende del contexto tisular en el que se encuentren (Yen et al, 2010; D'Angelo et al, 2010).

De acuerdo a la base de datos HGMD se establece que existen 331 variantes en todo el gen, de las cuales 226 mutaciones se han identificado en los pacientes con síndrome de Alagille (Spinner et al, 2010). Alrededor de 4% corresponden a deleciones completas del gen, 69% a mutaciones sin sentido, deleciones e inserciones que conllevan a una proteína truncada, 16% a mutaciones que alteran el corte y empalme y 11% a mutaciones de sentido equivocado. Aproximadamente el 66% de las mutaciones determinadas en estos pacientes corresponden a los exones 1 a 6, 9, 12, 17, 20, 23, y 24 (Warthen et al, 2006).

La haploinsuficiencia es el mecanismo molecular por el cual las mutantes de *JAG1* ocasionan el fenotipo del síndrome de Alagille en la mayoría de los casos, ya que las mutaciones que llevan a un codón de paro prematuro y las deleciones corresponden a los cambios mas frecuentes; esto tiene como consecuencia que las proteínas codificadas no contengan el dominio transmembranal o aquellos que son necesarios para el transporte por endosomas y por lo tanto no se expresen en la superficie de la célula (Spinner et al, 2010).

Sin embargo, se ha determinado que muchos de los transcritos mutantes con codón de alto prematuro escapan de la degradación por RNA mensajero antisentido y permiten la expresión de formas solubles de la proteína truncada, que actúan como dominantes negativas inhibiendo la activación de la vía de Notch (Boyer et al, 2005; Boyer-Di Ponio et al, 2007).

Hasta la fecha no se han reportado correlaciones genotipo-fenotipo específicas entre las mutaciones encontradas en *JAG1* y las manifestaciones clínicas del síndrome de Alagille (Spinner et al, 2010). Sin embargo, se ha señalado que el corazón podría ser más susceptible que el hígado a presentar alteraciones por mutaciones en este gen en una forma dosis dependiente (Eldadah et al, 2001; Lu et al, 2003).

II. Utilidad en el diagnóstico.

Debido a que las características clínicas son determinantes en el diagnóstico del síndrome de Alagille pero que algunas de ellas pueden no estar presentes en edades tempranas y a que alteraciones en los genes *JAG1* y *NOTCH2* se asocian a más del 90% de los casos (si bien este porcentaje varía según las distintas series) y a que mutaciones en estos genes no están asociados a otros fenotipos independientes del síndrome de Alagille, se ha establecido la búsqueda de mutaciones y deleciones como método de diagnóstico molecular (Tabla 3).

Actualmente, se lleva a cabo la secuenciación del gen *JAG1* cuando existe sospecha clínica de síndrome de Alagille. Si no se encuentran mutaciones en este gen se ha sugerido realizar el análisis de cariotipo por citogenética convencional para buscar aberraciones cromosómicas, se lleve a cabo el análisis por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para determinar si existe deleción, y finalmente la búsqueda de mutaciones en *NOTCH2* (Spinner et al, 2010).

Tabla 3. Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico del síndrome de Alagille.

Método	Alteraciones	Frecuencia	Referencia
Secuenciación directa	Variantes en <i>JAG1</i>	88%	Warthen et al, 2006
FISH	Deleción de <i>JAG1</i>	7%	Warthen et al, 2006
Secuenciación directa	Variantes de <i>NOTCH2</i>	<1%	McDaniel et al, 2006

Diversos estudios han establecido que el porcentaje de mutaciones encontradas puede variar dependiendo de los criterios clínicos utilizados para el diagnóstico (estando presente estrictamente la hipoplasia de vías biliares), siendo encontradas en 20% de los casos si se considera únicamente un sistema afectado, hasta en 86% cuando se consideran los 5 sistemas clásicos (Subramaniam et al, 2011; Guegan et al, 2011).

III. Asesoramiento genético.

El síndrome de Alagille tiene un patrón de herencia autosómico dominante. Muestra expresividad variable incluso entre miembros afectados de una familia con la misma mutación en *JAG1*, abarcando diferentes características clínicas desde muy graves hasta subclínicas, y también se ha observado penetrancia incompleta (Kamath et al, 2003). Se ha planteado que los distintos niveles de penetrancia se deben a mutaciones en otros genes, posiblemente implicados en la vía de Notch (El-Rassy et al, 2008). Por otra parte, los individuos analizados con mutaciones en *NOTCH2* con fenotipo de síndrome de Alagille, muestran penetrancia completa (McDaniell et al, 2006).

Se ha establecido que entre el 30% y el 50% de los individuos con síndrome de Alagille tienen a uno de los padres afectado, mientras que entre el 50% y el 70% de los casos se deben a mutaciones *de novo* (Guegan et al, 2011). Estas son consideraciones importantes para el asesoramiento genético ya que si un individuo afectado con una mutación en *JAG1* o *NOTCH2*, tiene un riesgo del 50% de heredar el alelo mutado a su descendencia independientemente del género y por embarazo.

Si alguno de los padres tiene la mutación encontrada en el paciente, el riesgo de que hermanos de un paciente con síndrome de Alagille estén afectados es del 50%, lo cual está de acuerdo con la herencia autosómico dominante. Si se trata de una mutación *de novo*, el riesgo debe ser similar a la población general. Algunas situaciones que pueden complicar esta situación es el reporte de casos de mosaicismo germinal de microdeleciones de 20p (Giannakudis et al, 2001; Laufer-Cahana et al, 2002).

Existe la opción del diagnóstico prenatal cuando se conoce la mutación (ya sea por secuenciación o FISH), lo cual se realiza junto con el estudio por ultrasonido del feto (Spinner et al, 2010).

VI. Planteamiento del problema.

La determinación de mutaciones y polimorfismos asociados a ciertas enfermedades puede contribuir a la elucidación en la etiología de las mismas, puede ser una herramienta útil de diagnóstico en aquellos padecimientos que presentan una alta prevalencia, y finalmente, puede ser de gran ayuda en el asesoramiento genético, sobre todo en aquellos casos en los que se dificulta el diagnóstico clínico. Hasta el momento no se ha llevado a cabo la determinación de cambios en la secuencia codificadora del gen *JAG1* en pacientes mexicanos con síndrome de Alagille. Se ha establecido en diversos estudios que mutaciones en este gen corresponden entre el 25% al 88% de los casos, sin embargo no se ha establecido un marcador característico dentro del mismo gen que sirva de diagnóstico.

VII. Justificación.

Actualmente el diagnóstico del síndrome de Alagille se basa en las observaciones clínicas. La incorporación del estudio molecular permitiría efectuar un diagnóstico aún más preciso y temprano para ofrecer un mejor tratamiento, asesoramiento genético y calidad de vida a los pacientes.

Mediante un método de tamizaje rápido se puede permitir el estudio de este gen dado su extensión, y ser un posible método diagnóstico de aquellos pacientes con alteraciones hepáticas y/o cardíacas que pueden tener la enfermedad, tal como se ha reportado en otros estudios.

VIII. Hipótesis.

La búsqueda de mutaciones y polimorfismos en la secuencia codificadora del gen *JAG1* por técnica de dHPLC podrá contribuir de forma determinante en el diagnóstico de aquellos pacientes mexicanos con sospecha de síndrome de Alagille.

IX. Objetivos.

- Llevar a cabo la búsqueda de cambios en la secuencia codificadora y esencial para el corte y empalme adecuado del gen *JAG1* en pacientes con síndrome de Alagille mediante las técnicas de dHPLC y secuenciación.
- Realizar el análisis de las variantes obtenidas y establecer si existe una relación entre el genotipo y el fenotipo.
- Establecer el diagnóstico diferencial molecular en pacientes con sospecha de síndrome de Alagille.

X. Material y métodos.

10.1. Población de estudio.

El estudio comprende 11 pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Alagille que acudieron a consulta de genética y/o gastroenterología en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, así como 50 controles (sujetos sanos con al menos 2 generaciones previas de origen mexicano). Este estudio, como parte de una colaboración oficial con el HIMFG, ha sido autorizado por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad de esta institución con el título “Búsqueda y caracterización de mutaciones en el gen *JAG1* por técnica de dHPLC en pacientes con síndrome de Alagille” con registro: HIM/2007/13.

I. Criterios de selección.

Se consideraron como criterios de inclusión al presente estudio los siguientes puntos:

- Aquellos pacientes con diagnóstico de síndrome de Alagille, con previa aceptación para participar en el estudio y firma de una carta de consentimiento informado.
- Que no existiera alguna contraindicación para la toma de muestra y que los individuos no hubieran sido transfundidos en los tres meses previos a la misma.

Por otra parte, se consideraron como criterios de exclusión los siguientes puntos:

- Pacientes y/o tutores que no deseen participar en el estudio.
- Que no haya suficiente calidad y cantidad de material para analizar.

II. Tamaño de la muestra.

De acuerdo al cálculo estadístico (Tabla anexa A), en el cual se considera únicamente la incidencia del padecimiento y la frecuencia de los casos diagnosticados con mutaciones en *JAG1*, se considera analizar al menos 10 pacientes y 10 controles. Sin embargo, debido a la presencia de polimorfismos en este gen con frecuencias alélicas que van desde el 2% hasta más del 50%, se ha considerado analizar estos polimorfismos en 50 controles.

10.2. Toma de muestra.

Una vez que fueron confirmados los diagnósticos correspondientes, y cumplidos los criterios de selección, se tomó una muestra de 1 mL de sangre periférica en un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante, y fueron trasladadas al Departamento de Genética del HIMFG para la extracción de DNA genómico. Posteriormente las muestras se colocaron a 4°C para su conservación.

10.3. Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico a partir de las muestras obtenidas en el paso anterior, se llevó a cabo por el método de lisis celular con detergentes aniónicos, el cual corresponde a un kit comercial (Qiagen®). La técnica consiste en los siguientes puntos:

1. Lisis de glóbulos rojos. Este punto se basa en la sensibilidad de los eritrocitos a soluciones hipotónicas. Éstos se quieren eliminar debido a que no tienen núcleo y por lo tanto DNA. Consta de los siguientes pasos:
 - Se agregan 300 μ L de sangre periférica en un tubo con 900 μ L de la solución de lisis para glóbulos rojos, para posteriormente

mezclar e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo varias veces durante la incubación.

- Centrifugar durante 20 segundos a 13000 revoluciones por minuto (r.p.m.). Se elimina el sobrenadante teniendo la precaución de no eliminar el pellet formado.
- Agitación con vórtex para resuspender el pellet.

2. Lisis celular. En este punto se lleva a cabo la lisis de los leucocitos presentes en la suspensión resultante del paso anterior para liberar los componentes celulares. Consiste en un sólo paso, en el cual se agregan 300 μ L de la solución de lisis celular y se resuspende utilizando la pipeta hasta obtener una solución homogénea. Esta solución consiste en una mezcla de detergentes aniónicos, los cuales disuelven los lípidos que constituyen la membrana celular sin interaccionar con las moléculas de DNA.

3. Precipitación de proteínas. En este punto, se agrega al tubo anterior, solución de precipitación de proteínas, la cual como su nombre lo indica se encarga de precipitar las proteínas presentes, y de esta manera, tener el DNA lo más puro posible, ya que durante los posteriores ensayos una contaminación de proteínas puede repercutir en los resultados. Consta de los siguientes pasos:

- Se agregan 100 μ L de la solución de precipitación proteica al lisado celular.
- Se agita vigorosamente en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 1 minuto, observando la presencia de un precipitado café.

4. Precipitación de DNA. Basándose en la solubilidad del DNA en distintos solventes, se llevan a cabo los siguientes pasos:

- El sobrenadante del paso anterior se transfiere a un tubo nuevo que contenga 300 μL de isopropanol, se mezcla por inversión durante 50 segundos asegurándose de la formación de una maraña (que corresponde al DNA) y se centrifuga durante 1 minuto a 13000 r.p.m.
- Se decanta el isopropanol y se agregan 300 μL de etanol al 70% para lavar el DNA. Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 1 minuto y se decanta el etanol cuidando que el pellet no se elimine.
- Se colocan los tubos en un desecador a velocidad media durante 15 minutos para eliminar los restos de los solventes anteriormente mencionados.

5. Hidratación del DNA. Se resuspende el DNA obtenido del paso anterior en 50 μL de solución de hidratación y se incuba durante 1 hora a 60°C para su posterior cuantificación y verificación de la integridad.

10.4. Cuantificación e integridad del DNA.

I. Cuantificación.

La determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 260 y 280 nm de una solución de DNA, permite conocer la concentración y pureza del mismo. De esta manera, la lectura a 260 nm permite calcular la concentración de DNA en la solución (ya que presenta una absorción máxima a esta longitud de onda), teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica (DO) corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para DNA de doble cadena, además de que se cumple la ley de Lambert y Beer. La relación de la lectura a 260 nm entre la lectura a 280 nm,

proporciona un estimado de pureza de la muestra, ya que muchos de los contaminantes como proteínas y, RNA y DNA de una sola cadena presentan un pico máximo de absorción a 280 nm. Por lo tanto, un rango de pureza entre 1.8 y 2.0, indica que el DNA está libre de contaminantes celulares, y conforme se obtienen valores menores a 1.75, indica la presencia de proteínas principalmente; sin embargo, en muchos ensayos como en el caso de PCR se indica que se pueden obtener valores hasta de 1.65 para obtener resultados óptimos. La concentración de DNA depende de la aplicación para la cual se va a utilizar el mismo, ya que en el caso de la PCR se requiere por lo general una cantidad de 50 ng por reacción (Ausubel F.M, et al, 1991).

En el presente trabajo se utilizó un equipo denominado NanoDrop®, en el cual se deposita la muestra sin diluir en el detector, y está acoplado a un Software el cual hace los cálculos automáticamente y los muestra en pantalla. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Acceder al programa ND-1000 V3.2.1 y escoger la opción de ácidos nucleicos.
2. Cargar 2 μ L de agua inyectable y escoger la opción continuar.
3. Limpiar ambos lentes con agua inyectable y colocar 2 μ L para el blanco. Realizar la medición para el blanco.
4. Colocar la muestra, escribir el nombre de la misma, y realizar las mediciones.

II. Integridad.

Esta prueba se lleva a cabo para visualizar que tan íntegro se encuentra el DNA extraído, ya que si se tiene un DNA muy degradado, existe una alta probabilidad de que las secuencias blanco de estudio estén afectadas y no se obtengan resultados confiables, y que incluso, no se amplifiquen las mismas en el caso de la PCR. Lo anterior se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, cuya concentración se utiliza para fragmentos mayores a 1 kb, como lo es el caso del DNA genómico.

La electroforesis en gel de agarosa es un método empleado para separar moléculas de DNA y RNA basándose en su tamaño. Lo anterior, se lleva a cabo por el desplazamiento de las moléculas de ácidos nucleicos con carga negativa a través del gel de agarosa por un campo eléctrico, donde las moléculas más pequeñas se mueven más rápido y migran más lejos hacia el polo positivo que las más grandes.

Los pasos a seguir empleados para determinar la integridad de las muestras extraídas fueron los siguientes:

1. Se disuelve 1 g de agarosa en 100 mL de solución amortiguadora TBE 1X (Tris-boratos-EDTA), el cual es utilizado sobretodo para separar fragmentos menores a 1 kb (concentración final, 1%). Para poder llevar a cabo este paso es necesario calentar la suspensión resultante al agregar la agarosa, de esta manera, se funde la agarosa hasta formar una solución homogénea.
2. A la solución anterior, se le agrega 1 μ L de bromuro de etidio (0.5 mg), el cual es un colorante fluorescente que se intercala entre las bases del DNA y se puede visualizar con luz UV.
3. Lo anterior se coloca en un molde con peines, los cuales van a formar los pozos, dejándolo polimerizar durante 50 minutos.
4. El gel resultante se coloca en una cámara de electroforesis y se le quitan los peines. Se agrega solución de buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel de agarosa.
5. Se mezclan 5 μ L de la solución con DNA con 1 μ L del buffer de carga, el cual permite que la muestra tenga el mismo pH que el buffer de la cámara, le da mayor densidad a la muestra para que se dirija al fondo del pozo y permite visualizar el nivel aproximado de las muestras debido a que tiene un colorante. La anterior mezcla se pipetea en los pozos del gel. Debe de colocarse además, una escalera de peso molecular, la cual permite establecer un aproximado del tamaño del fragmento visualizado.
6. Una vez colocadas todas las muestras y el marcador de peso molecular, se procede a conectar la cámara con una fuente de poder, la cual

aplicará un campo eléctrico para que el DNA migre hacia el ánodo. Se aplica un voltaje de 100 Volts durante 90 minutos.

7. Una vez concluido el paso anterior, se coloca el gel en una cámara donde se va a tomar la fotografía del mismo aplicando luz UV, y de esta manera, se evalúa la integridad del DNA extraído.

10.5. PCR, dHPLC y secuenciación directa.

Para la genotipificación del gen *JAG1*, se utilizaron los oligonucleótidos (Tabla 4) publicados por Krantz para la PCR (Krantz et al, 1998), la cual se llevó a cabo por el método de Touchdown. Cada fragmento de la Tabla 1 corresponde a un amplicón, el número después de la "X" corresponde al número de exón dentro del amplicón y las letras a la parte del exón correspondiente (X2A significa que el amplicón abarca la primera parte del exón 2). Posteriormente se colocó el producto de PCR en el equipo para la dHPLC, cuyos fragmentos con un patrón de cambio se analizaron por secuenciación directa. Lo anterior se llevó a cabo una vez estandarizadas las condiciones para cada técnica en un control.

Tabla 4. Oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) utilizados para la PCR (Krantz et al, 1998).

Fragmento (pb)	Sentido (5'-3')	Long. (pb)	%GC	T _m (°C)	Antisentido (5'-3')	Long. (pb)	%GC	T _m (°C)
X1 (249)	TCCAATCGGCGGAGTATATTAGAGC	25	48.0	63.9	AGGACGGCTGGGAGGGA	17	70.6	63.0
X2A (308)	GCTGACCTACCTCCTCCCT	20	60.0	61.6	GATGCGGTTGCGGTGCGTTG	19	63.1	64.3
X2B (137)	TCATCGGGGGCAACACCTTC	20	60.0	63.8	CAGGCGCGGGTGTGAG	16	75.0	62.1
X3 (267)	TGACAAAGGAAGGGGAGTTGGTTTG	25	48.0	65.2	GTTTAGAGAAAAGTCCACAGAAGCGATAC	29	41.4	63.6
X4A (224)	TCAGGGAAGAAGGCTGCAATGTGAATA	27	44.4	66.3	CTGGGGCGGCAGAACTTATTG	21	57.1	62.9
X4B (237)	GCGTTGCCCACTTTGAGTAT	20	50.0	60.1	TGGTGGGGTGATAAATGGAC	20	50.0	58.9
X5 (309)	GCGTCCCGATGCAAGGAACAGGCAGTGT	28	60.7	73.9	AGAAGTGGTGTGTGCATTCC	20	50.0	60.1
X6 (203)	CAAAAAGGCTAACCTGGAGGTGTG	23	52.1	62.9	GATCCCACCCTGGGTCTCAT	20	60.0	62.5
X7 (363)	TGGGTTCCGCATCTTCACAGG	21	57.1	64.4	CGAATCAGCATCACCCAAAAAAGTTAGAGA	31	38.7	65.6
X8 (214)	ATCCCTCTCTGACTGCCATCC	21	57.1	62.3	CTCTCCCAGCGTGGTATCTT	21	57.1	63.1
X9 (212)	GGCCCGCCGCCCCCGCCGGTCAACCCCTCCTTTTCTT	38	73.7	85.8	CAATCAAAGCCAACCTTGGTA	21	42.9	58.4
X10 (201)	ATTTCTCATGCTCATCCCATCTCCTT	27	44.4	65.3	CAGCAAGTCGGCTACCCAAGTTT	23	52.1	65.2
X11 (177)	CCCAATTTCACTGTAAATTACCTCTTTAAATGATGAC	38	31.6	65.1	AGTCTCCTAGTGTGCGACAAAATCT	25	48.0	65.6
X12 (320)	CTGAAGCCCTGTGTTTGTGGAATAC	25	48.0	64.1	GAAAAGTAAAGGGAAGCGGAGGAG	24	50.0	62.7
X13 (247)	CCCTCCCCCTTTTCGCTGTT	27	44.4	65.8	TAGTAAGTGGGGACAAAAGGAGCAAGT	27	44.4	65.3
X14 (261)	GAATGCCGCATCTGTGGGTG	20	60.0	63.7	GCTGGGGAGCACTGGTC	17	70.6	60.9
X15 (249)	AGGAGGGAGCCATGAAAAGTGC	22	54.6	64.7	AACATGACCCATACATCCCAGAG	23	47.8	61.2
X16 (229)	GTGAATGGTCCTGGATCTCGTCTT	24	50.0	63.5	CCCTCCCACAGAAGACAGAG	20	60.0	60.9
X17 (287)	GCTATCTCTGGGACCCTTCC	20	60.0	60.7	CCAGGCCCAGAGAAATATCA	20	50.0	57.9
X18 (245)	TTATGATATTTCTCTGGGCCTGGTTCTTG	29	41.4	64.9	CGACAGCCCTGGGAGAGTT	19	63.2	62.6
X19 (228)	GCCTGGTTCCAATTTAGCAA	20	45.0	58.3	GCGTCCCACGATAGTGGATGAGTGCTG	29	62.0	73.4
X20 (194)	AGAGTAATGGACTGGGAGGTTGGTAA	26	46.1	64.3	TGAGGCATGGAATGAAGCGGTAAAG	25	48.0	65.4
X21 (197)	ACCATCAGTCCCTAACTTGAATCCATT	29	41.9	65.5	GCTCACCCAGAAAGCCCAT	20	60.0	63.4
X22 (238)	CAAAGGGCACAGGCATAACCATTTCATAA	29	41.4	66.3	GTGAAGTGCAGCCATCAT	21	57.1	65.1
X23 (334)	TTCTGGAATCAGGGATGAGC	20	50.0	58.7	GCAGACATCCACCATTCAA	20	45.0	57.6
X24 (212)	CTCTCAATCTTACACGTGTGTGGGTTT	27	44.4	65.2	CATCGAATAATGAGGTGTGAATGGGTC	27	44.4	63.4
X25 (307)	TCGAGTAATTTTGAAGAAAGGCTGCTTTGAGTAT	34	35.3	66.6	ATAATCCCTCGACCTGATGGCTTTATTGAA	30	40.0	66.1
X26A (264)	TTCTTTCTTTCTGGAGAGTTAATGGTTTTGTGC	35	34.3	66.3	ATAATCCTTGATGGGGACCGTGTG	25	48.0	64.7
X26B (244)	CAGCTGAACCATCAAAAACCCCA	25	48.0	65.0	TGTTTGTCCAGTTTGGGTGTTTTGTGCG	27	44.4	66.6
X26C (194)	GTACACGCTGGTAGACAGAGAAGA	24	50.0	62.9	GACAGTTTAAAGAACTACAAGCCCTCAGA	29	41.4	64.9

I. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Kary Mullis en 1985 y por la cual recibió el Premio Nobel de Química en 1993, es un proceso enzimático con múltiples aplicaciones en el cual, una región específica del DNA es replicada una y otra vez para producir muchas copias de una secuencia particular. Las fases de la PCR son desnaturalización, alineación y extensión.

En el presente trabajo, se empleó una variante de la PCR denominada Touchdown, que se caracteriza por incrementar la especificidad, sensibilidad y rendimiento de la amplificación de una forma simple y rápida (Korbie et al, 2008). Esta técnica permitió amplificar en una sola reacción 30 fragmentos distintos que corresponden a 26 exones del gen *JAG1* (cuyos oligonucleótidos poseen T_m distintas), lo cual incrementó la eficiencia del proceso de una manera formidable. Sin embargo, aunque dicha técnica teóricamente no requiere ajustes en los reactivos para la PCR, éstos se llevaron a cabo en algunos de los fragmentos debido a la presencia de bandas inespecíficas visualizadas en la electroforesis en agarosa.

El principio del Touchdown consiste en disminuir gradualmente la temperatura de alineamiento durante 10 a 15 ciclos, comenzando por una temperatura mayor a la T_m del fragmento, lo cual implica condiciones estrictas en un principio y después condiciones más flexibles que permitirán la amplificación exponencial sólo del amplicón deseado. Finalmente se aplican 30 ciclos más a una temperatura ligeramente menor a la T_m de los oligonucleótidos empleados para asegurar la formación de los productos deseados.

Las condiciones para cada PCR fueron las siguientes:

Tabla 5. Condiciones generales para la PCR.
Para los amplicones 1 y 2A se agregó DMSO (10%). *Se utilizaron distintas concentraciones de sulfato de magnesio.

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen final para 20 µL de reacción (µL)</i>
Buffer para PCR	10X	1X	2.0
dNTP's	10 Mm	0.2 mM	0.4
MgSO ₄ *	50 mM	2.0, 1.5, 1.0 mM	0.8
Pol. <i>Taq platinum</i>	1 u/µL	1.0 u	1.0
Primer Forward	10 pmol/µL	1.0 pmol/µL	2.0
Primer Reverse	10 pmol/µL	1.0 pmol/µL	2.0
DNA	-	50.0 ng	X
H ₂ O	-	-	p/llegar a 20.0

Las condiciones para la PCR en el termociclador fueron las siguientes:

Tabla 6. Condiciones para el termociclador.

<i>Paso</i>	<i>Fase</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
1	Desnaturalización inicial	95	5 min.
2	Desnaturalización	95	30 s.
3	Alineamiento	60	30 s.
4	Decremento	(0.5)	
5	Extensión	72	30 s.
Repetir 2-5 por 10 ciclos			
6	Desnaturalización	95	30 s.
7	Alineamiento	55	30 s.
8	Extensión	72	30 s.
Repetir 6-8 por 30 ciclos			
9	Mantenimiento	4	-

Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis, en la cual se asegura que se obtuvo el producto esperado. Lo anterior se realizó en un gel de agarosa al 2% durante 60 minutos a 100 Volts, utilizando un marcador de 100 pb y corriendo un negativo que corresponde a la mezcla de los reactivos sin DNA.

II. Cromatografía de líquidos de alta resolución desnaturalizante (dHPLC).

La técnica de dHPLC permite la identificación de mutaciones mediante la comparación de dos o más locus que se encuentran como parte de una mezcla de cadenas desnaturalizadas y realineadas, basándose en la retención diferencial de estructuras tipo homo y heterodúplex de DNA en una cromatografía de fase reversa bajo condiciones semidesnaturalizantes (Xiao et al, 2001). Se pueden identificar cambios de un solo nucleótido, deleciones e inserciones a través de un sistema de detección con UV en un lapso de 3 a 5 minutos a partir de productos de PCR sin purificar, con una sensibilidad y especificidad mayor al 96%. Sin embargo, este método únicamente señala la presencia de un cambio, ya que la localización y el tipo de cambio son identificados mediante secuenciación, siendo de particular importancia en el estudio de genes con numerosos amplicones y/o cuando existe un número considerable de muestras a analizar al reducir los costos hasta 10 veces (a comparación de la secuenciación directa).

Esta cromatografía de fase reversa semidesnaturalizante se ha empleado también en ensayos de cuantitativos de expresión, discriminación alélica, mapeo de genes, análisis de microsatélites, detección del patrón de metilación, entre otros (Xiao et al, 2001). Una importante cantidad de genes han sido analizados directamente o parcialmente por esta técnica, lo cual le da una relevancia fundamental como herramienta de investigación y diagnóstico (Tabla 7).

Tabla 7. Algunos genes analizados por dHPLC.

Gen	#OMIM	Patología asociada	Referencia
<i>CHEK2</i>	604373	Cáncer de mama, próstata, pulmón y de ovario	Scharrer et al, 2010.
<i>ATP8B1</i> , <i>BSEP</i> y <i>MDR3</i>	602397 603201 171060	Colestasis intrahepática progresiva familiar	Shapiro et al, 2010.
<i>FLCN</i>	607273	Síndrome de Birt-Hogge-Dube	Kunogi et al, 2010.
<i>PINK1</i>	608309	Enfermedad de Parkinson	Zhang et al, 2010.
<i>BRCA1</i> y	113705	Cáncer de mama y ovario hereditario	Soumitra et al, 2009; Arnold et al, 1999; Kiechle et al, 2000.
<i>BRCA2</i>	600185	Cáncer de mama y ovario hereditario	Gross et al, 2000; Shiri-Sverdlov et al, 2000.
<i>MIP</i>	154050	Cataratas congénitas (autosómica dominante)	Wang et al, 2010.
<i>CYP21A2</i>	201910	Hiperplasia adrenal congénita	Tsai et al, 2009.
<i>JAG1</i>	601920	Síndrome de Alagille	Samejima et al, 2007 Heritage et al, 2002

Suponiendo que se amplifican un par de fragmentos por separado que corresponden al mismo locus y a distintas muestras, las cuales poseen una diferencia de un nucleótido en su secuencia, el procedimiento en general consiste en lo siguiente (Fig. 8):

1. Ambas muestras amplificadas por separado son mezcladas y sometidas a un gradiente descendente de temperatura para promover la formación de homodúplex y heterodúplex (Fig. 8A).
2. La mezcla anterior es colocada en una gradilla. A partir de este momento, el equipo se encarga de todo el proceso.
3. La muestra es inyectada en una columna que contiene un amortiguador compuesto por acetato de trietilamonio (TEAA) y acetonitrilo (ACN). El TEAA es anfipático en esta solución, siendo su parte hidrofóbica la que está en contacto con el cartucho (donde se encuentra el horno y se lleva

a cabo la separación del DNA) y su parte hidrofílica se une al DNA debido a su carga positiva (Fig. 8B).

4. El software controla la temperatura y el gradiente de acetonitrilo. Se aumenta gradualmente la concentración de acetonitrilo a través de la columna, que debido a sus propiedades de solvente disminuye la fuerza de interacción entre el DNA y el TEAA. Esto provoca la separación del DNA del cartucho, siendo los heterodúplex los que salen primero que los homodúplex debido a su menor estabilidad (Fig. 8C).

La temperatura tiene un papel muy importante en la estabilidad, ya que cuando existe un apareamiento incorrecto de bases (heterodúplex) el fragmento tendrá mucho menor estabilidad que el que tiene un apareamiento perfecto (homodúplex), por lo que tendrá un tiempo de retención menor al ser más fácil de desprender de la columna. Las condiciones de temperatura son semidesnaturalizantes precisamente para observar el fenómeno anteriormente descrito, ya que si se trabajara en condiciones desnaturalizantes no habría diferencia en el tiempo de retención de ambos fragmentos.

5. Dichos fragmentos pasan a través del detector de UV que registra la absorbancia y la manda al software donde es registrada en forma de cromatogramas (Fig. 8C). Si no existen diferencias entre los fragmentos eluidos sólo se observa un pico, mientras que se observan de dos a cuatro picos si existe dicha diferencia.

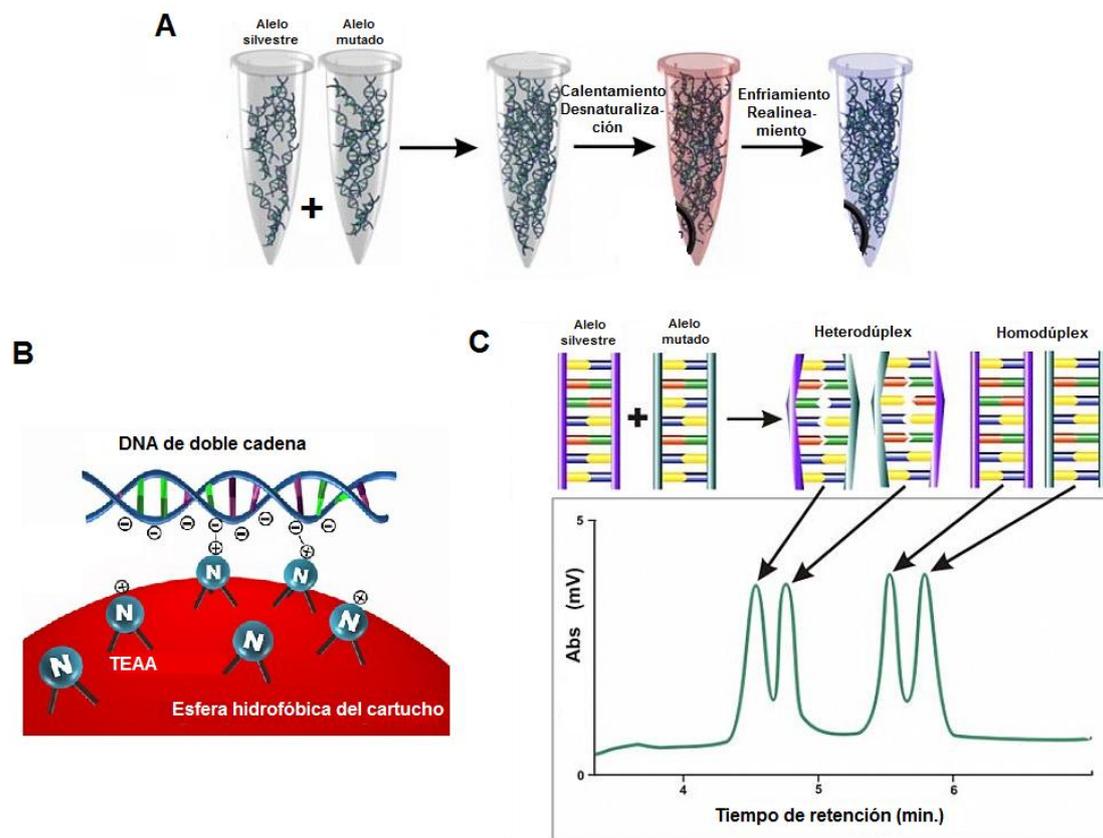


Fig. 8. Análisis de mutaciones mediante dHPLC. (Modificado de www.transgenomic.com.)

Las condiciones utilizadas experimentalmente fueron las siguientes:

Tabla 8. Condiciones utilizadas para las corridas de las muestras (opción “detección de mutaciones”). Amortiguador A: TEAA [100 mM], EDTA [0.1 mM], pH 7.0; Amortiguador B: TEAA [100 mM], EDTA [0.1 mM], pH 7.0, Acetonitrilo [25%].

<i>Gradiente</i>	<i>Tiempo (min.)</i>	<i>Amortiguador A (%)</i>	<i>Amortiguador B (%)</i>
Carga	0.0	54.4	45.6
Comienzo de gradiente	0.5	49.4	50.6
Fin de gradiente	5.0	40.4	59.6
Comienzo de limpieza	5.1	54.4	45.6
Fin de limpieza	5.6	54.4	45.6
Comienzo de equilibrio	5.7	54.4	45.6
Fin de equilibrio	6.1	54.4	45.6

Las temperaturas fueron asignadas de acuerdo al software incluido en el equipo (Navigator®), así como de los que se encuentran en las páginas de la Universidad de Keio (<http://www.dhplc.jp/genetics/body.html>) y de Stanford (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) (Tabla 9). Cada una de estas temperaturas fue probada (con un intervalo de +/- 1°C) para asegurar un patrón cromatográfico sencillo de interpretar.

Tabla 9. Temperaturas asignadas para cada fragmento. Se aplicó más de una temperatura en aquellos amplicones que poseían más de una temperatura de desnaturalización con el fin de asegurar la detección.

Amplicón	Temperatura °C	Amplicón	Temperatura °C	Amplicón	Temperatura °C
1	66.2, 70.5	9	59.8, 61.5	19	59.7
2A	64.6	10	58.6, 60.6	20	60.3, 63.5
2B	66.7	11	53.3, 61.0	21	59.4, 63.0
3	59.4	12	58.8, 60.5	22	61.1
4A	57.6, 63.6	13	60.2, 62.7	23	57.0, 61.0, 64.5
4B	60.9	14	61.2	24	57.3, 60.3
5	57.2, 60.1	15	58.1, 61.3	25	57.9, 59.9
6	62.7, 63.7	16	59.8, 63.0	26A	60.3, 64.4
7	58.9, 60.0	17	61.4	26B	58.7, 62.9
8	60.4, 62.7	18	62.8	26C	61.9

Para establecer la cantidad de muestra utilizada para el análisis, se determinó la concentración mínima óptima a la cual se pueden apreciar adecuadamente los cromatogramas. Esta concentración fue a la que se llevó cada una de las muestras para hacer las mezclas del estándar y muestra problema.

El análisis de los cromatogramas obtenidos se llevó a cabo en el software del equipo. El software reporta el resultado en una ventana independiente en la cual se pueden seleccionar los resultados que se desean observar. Se estableció como método de análisis la observación directa de los cromatogramas arrojados por el equipo y a manera de confirmación del análisis directo mediante la normalización (también en aquellos casos en los que el análisis directo no fue determinante). El criterio para incluir las muestras para el análisis por secuenciación se basó en la identificación de diferencias incluso

situles en los patrones cromatográficos respecto al estándar, las cuales fueron revisadas al menos por triplicado.

III. Secuenciación directa.

La genotipificación basada en el método de secuenciación se utiliza para determinar la secuencia exacta de nucleótidos de un gen o un fragmento de interés. Tal como se mencionó previamente, se secuenciaron únicamente los amplicones con un patrón de cambio en los cromatogramas obtenidos en el paso anterior.

La técnica empleada en el presente trabajo consiste en una modificación de la descrita por Sanger, ya que los diferentes fluoróforos están acoplados a los cuatro didesoxinucleótidos (contenidos en una mezcla), siendo la terminación de la señal (Applied Biosystems). Una vez que se lleva a cabo la reacción de secuenciación, ésta se purifica y coloca en un equipo que lleva a cabo una electroforesis capilar y la detección de cada uno de los fluoróforos arrojando los resultados en forma de electroferograma.

Previo a la reacción de secuenciación se requiere purificar el producto de PCR, lo cual se llevó a cabo por el método de EXOSAP-IT®, el cual elimina el exceso de oligonucleótidos y nucleótidos, ya que éstos pueden interferir en la reacción de secuenciación. Este método que se basa en la actividad de la exonucleasa I (degrada fragmentos de DNA de cadena sencilla) y de la fosfatasa alcalina de camarón (quita fosfato a nucleótidos), consiste en lo siguiente:

Tabla 10. Condiciones de incubación. Se agregaron 5 µL de producto de PCR y 2 µL de EXOSAP-IT®.

<i>Paso</i>	<i>Fase</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min.)</i>
1	Activación	37	15
2	Inactivación	80	15
3	Mantenimiento	4	-

Una vez purificado el producto, se lleva a cabo la reacción de secuenciación. Los reactivos utilizados y las fases de la reacción de secuenciación son similares a los de la PCR. Las reacciones de secuenciación fueron estandarizadas utilizando un control, siendo las condiciones generales las siguientes:

Tabla 11. Condiciones generales para la reacción de secuenciación.
* Se utilizaron diferentes concentraciones.

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen final para 10 µL de reacción (µL)</i>
Master Mix	2.4X	1X	4.0
Primer*	1.0 pmol/µL	0.1 pmol/µL	1.0
DNA (PCR)*	-	20.0 ng	X
H ₂ O	-	-	p/llegar a 10.0

Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación fueron elegidos considerando los fragmentos que se pierden al principio de la secuencia (preservando el exón), así como evitando aquellos que tuvieran anclajes o modificaciones y agrupándolos en 6 partes en las que no hubiera 1°C de diferencia en la *t_m* entre cada uno (Tabla 12). Sin embargo, debido a que en algunas de las secuencias no se cumplió con el primer punto, se llevó a cabo la secuenciación con el oligonucleótido contrario, así como para la confirmación de las variantes encontradas. Esto también se llevó a cabo en los amplicones con cambios en la secuencia para asegurar la presencia de dicho cambio.

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de secuenciación.

Temperatura (alineamiento y extensión) °C	Oligonucleótidos (sentido)
58.3	4BR, 9R, 19F, 23F
60.1	5R, 16R, 17F
62.1	2BR, 6R, 8R
63.3	1F, 2AR, 12F, 14F, 21R
64.4	3F, 7F, 10R, 15F, 18F, 20R, 24F, 26AR, 26CR
65.6	4AF, 11R, 13F, 22F, 25R, 26BR

Las condiciones para la reacción de secuenciación en el termociclador fueron las siguientes:

Tabla 13. Condiciones del termociclador para la reacción de secuenciación. * De acuerdo a la tabla 12.

<i>Paso</i>	<i>Fase</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
1	Desnaturalización inicial	95	5 min.
2	Desnaturalización	95	30 s.
3	Alineamiento y Extensión*		30 s.
Repetir 2-3 por 40 ciclos			
4	Mantenimiento	4 (oscuridad)	-

Posteriormente, se purifica la reacción de secuenciación mediante columnas CENTRI-SEP® por el método de filtración en gel para recuperar fragmentos de DNA mayores a 16 pb y eliminar hasta el 98% de sales nucleótidos trifosfatados y otros compuestos de bajo peso molecular. Esto se lleva a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Reconstituir la columna con 0.8 mL de agua para hidratar el gel (polímero de dextrano). De esta forma se pueden guardar a 4°C.
2. Antes de utilizar la columna dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Remover la tapa inferior para quitar el fluido intersticial. Centrifugar durante 2 minutos a 3,000 rpm para eliminar el exceso de agua. Procesar las muestras inmediatamente.
4. Agregar el producto de la reacción de secuenciación en el centro de la columna, cuidando de no tocar las paredes del tubo ni la columna con la punta.
5. Colocar la columna en un tubo nuevo y centrifugar durante 2 minutos a 3,000 rpm para recuperar la muestra purificada.
6. Secar la muestra al vacío durante 15 minutos a temperatura media.
7. Agregar 12 µL de formamida. Colocar en tubos para el secuenciador.

8. Colocar a 96°C durante 2.5 minutos para desnaturalizar las dobles cadenas de DNA formadas e inmediatamente colocar en frío para evitar que se asocien de nuevo. La formamida juega un papel fundamental debido a que se interpone a las cadenas de DNA debido a su mayor tamaño molecular.

Finalmente, los tubos se colocan en el secuenciador (ABI PRISM 310®). Los productos de cadena sencilla de diferentes longitudes son separados por electroforesis en capilar. El secuenciador detecta la fluorescencia emitida por cada uno de los fluoróforos que permiten la identificación de las cuatro bases (A, G, T, C). Cada uno de los fluoróforos emite luz a diferente longitud de onda cuando es excitado por el láser de Argón, lo que permite la detección de dichas bases en una sola inyección del capilar. El software del equipo reproduce las señales recibidas como un electroferograma que corresponde a la secuencia de nucleótidos.

En aquellos fragmentos en los que exista una delección o inserción que comprometa la calidad de la secuencia, se emplea la técnica de clonación a partir de productos de PCR de la compañía Promega (pGEM®-T Vector Systems, Anexo 12.1), para aislar el producto de cada variante y poder diferenciar entre el alelo mutado y el alelo silvestre. Esto se lleva a cabo, como parte de una colaboración, en el Departamento de Genética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana a cargo del Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz.

Finalmente, la búsqueda de frecuencias de polimorfismos y de mutaciones encontradas se lleva a cabo en las bases de datos de Ensembl, dbSNP, Uniprot, HGMD, LOVD y mutDB. El análisis de las mutaciones y polimorfismos se realizó mediante el software Alamut 2.0, Transeq, SignalIP 4.0, I-TASSER, VMD y GLIDER.

XI. Resultados.

11.1. Población de estudio.

Se incluyeron 11 pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Alagille y 50 controles de acuerdo a lo establecido en la Metodología, los cuales fueron reclutados antes y durante el trabajo experimental que abarca el presente trabajo. Del total de pacientes incluidos, 5 acudieron a consulta al departamento de Genética y Gastroenterología del HIMFG y 6 fueron referidos por parte del Departamento de Trasplantes de la misma institución. Estos pacientes son originarios de la zona metropolitana y otros estados de la República, mientras que los controles son originarios de la zona metropolitana del país.

La distribución del género de los pacientes incluidos fue de 54.5 % para el sexo masculino y 45.5% para el femenino, lo cual no muestra preferencia alguna de la patología de acuerdo al género, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Spinner et al, 2010).

El diagnóstico clínico de los pacientes se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en la literatura (Spinner et al, 2010), siendo el criterio definitivo de inclusión la hipoplasia de vías biliares y/o colestasis biliar, y al menos otra de las cinco características clínicas principales descritas en el síndrome (Tabla 14).

Tabla 14. Criterios clínicos de inclusión en los pacientes mexicanos con Síndrome de Alagille.

Paciente	Colestasis	Estenosis pulmonar	Vértebra mariposa	Embriotoxon	Facies características	#
J1	+	+	-	+	-	3
J2	+	+	+	-	+	4
J3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J4	+	-	-	-	+	2
J6	+	+	-	-	-	2
J7	+	+	-	+	+	4
J8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J9	+	+	-	-	-	2
J10	+	+	+	+	-	4
J11	+	+	-	-	-	2
J12	+	+	+	-	-	3

ND: No determinado.

11.2. Cuantificación e integridad del DNA genómico.

La cuantificación e integridad del DNA extraído se muestran en la figura 9 y la tabla 15. Las soluciones en las que se resuspendió el DNA extraído de los 11 pacientes y 50 controles mostraron un valor de pureza de 1.70 a 2.00, así como se obtuvieron concentraciones necesarias para la PCR ajustándose a una concentración de trabajo de 20 ng/μL. Ambos parámetros, tanto concentración y pureza, fueron los adecuados de acuerdo a lo establecido en la parte de Metodología y fue consistente con los resultados obtenidos en la PCR. Por su parte, se determinó que la integridad del DNA fue adecuada, ya que no se observó degradación en las muestras correspondientes al correrlas en un gel de agarosa al 1%.

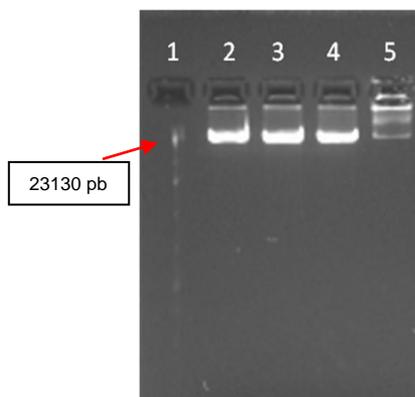


Fig. 9. Evaluación de la integridad del DNA extraído de 4 muestras representativas. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% aplicando 100 Volts durante 90 minutos y teñido con bromuro de etidio. La descripción de cada muestra contenida en los diferentes pozos se encuentra en la tabla 15.

Tabla 15. Cuantificación del DNA extraído de 4 muestras representativas. Ésta se realizó mediante el equipo Nano Drop® y su software correspondiente.

Pozo	Muestra	ng/μL	A 260/280
1	P.M. Lambda/HindIII	-	-
2	J1	81.0	1.84
3	J2	31.6	1.96
4	J3	23.8	1.95
5	J5	91.0	1.86

11.3. Obtención de variantes.

A continuación se describirán los resultados de cada una de las técnicas utilizadas, en los cuales se incluyen ejemplos representativos de la PCR y las variantes obtenidas por dHPLC y secuenciación.

I. PCR.

Se amplificaron los 30 fragmentos del gen *JAG1* mediante la técnica *Touchdown* de las muestras correspondientes a los 11 pacientes y 50 controles, cada uno de los cuales fue evaluado por electroforesis para asegurar la obtención del fragmento esperado y la ausencia de contaminaciones (Fig. 10). Por otra parte, como parte de la Metodología para el análisis de las muestras problema por dHPLC, se amplificó el equivalente a 60 reacciones de una muestra control de cada uno de los amplicones (muestra estándar), evaluando la ausencia de contaminaciones y la presencia del producto esperado. En total se realizaron alrededor de 3480 reacciones, sin considerar aquellas utilizadas para la estandarización y repeticiones.

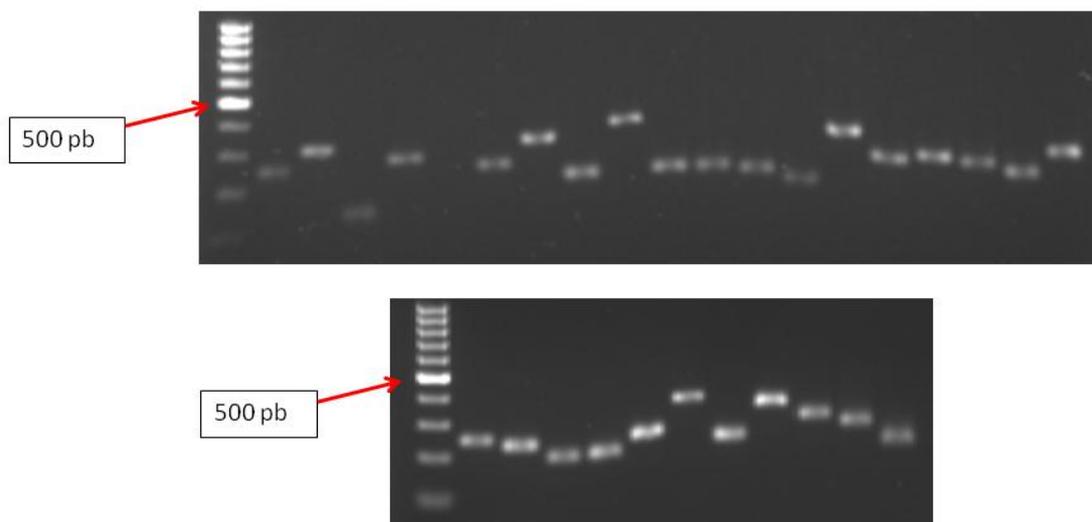


Fig. 10. Amplicones obtenidos por PCR. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% aplicando 100 Volts durante 60 minutos y teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos corresponden a los mostrados en la Tabla 4 (X1-X3, negativo, X4B-X17 gel superior; X18-X26C gel inferior).

II. dHPLC y secuenciación.

En total se realizaron 3294 análisis por dHPLC de las muestras de pacientes y controles considerando que en promedio se incluyeron 2 temperaturas por cada amplicón, sin incluir los análisis necesarios para la estandarización y las repeticiones. Respecto a la técnica de secuenciación se generaron 405 secuencias, de las cuales 75 se utilizaron para la estandarización y el resto para la búsqueda de variantes.

Se identificaron 7 mutaciones heterocigotas localizadas en distintas regiones del gen *JAG1* en 7 pacientes, 5 de las cuales no han sido reportadas previamente (Tabla 16). Los cambios identificados mostraron un patrón cromatográfico diferente a aquellos obtenidos en el estándar e incluso a todas las muestras analizadas tanto de otros pacientes como controles, lo cual fue confirmado por secuenciación en cada uno de los casos (Fig. 11).

Tabla 16. Mutaciones encontradas en pacientes.

Paciente [Exón (E) / Intrón (I)]	Mutación (HGMD)*	Dominio	Efecto predicho	Fenotipo ⁺
J12 I1-2	Intrónica no reportada: NM_000214.2(<i>JAG1</i>):c.82-6C>A	NA	Alteración en el sitio de corte y empalme	H, C, E, R
J3 E2	Sin sentido (CM030050, [Trp128X])	DSL	Proteína trunca	ND
J11 I4-5	Intrónica no reportada: NM_000214.2(<i>JAG1</i>):c.694+1G>C	NA	Alteración en el sitio de corte y empalme	H, C
J10 E6	Sin sentido no reportada [Gln291X]: NM_000214.2(<i>JAG1</i>):c.871C>T	EGF	Proteína trunca	H, C, O, E, R
J1 E13	Sin sentido no reportada [Gln539X]: NM_000214.2(<i>JAG1</i>):c.1615C>T	EGF	Proteína trunca	H, C, O, R
J9 E13	Inserción (CI062270, [Cys572fs]):	EGF	Corrimiento del marco de lectura	H, C, R
J2 E21	Sin sentido no reportada [Cys855X]: NM_000214.2(<i>JAG1</i>):c.2563C>A	EGF	Proteína trunca	H, C, O, E, F, R

* Nomenclatura de acuerdo al programa "Mutalyzer 2.0 β -8" (<http://www.lovd.nl/mutalyzer/>) actualizado el 31 de enero de 2011.

⁺ Órganos o sistemas afectados: Hígado (H), Corazón (C), Ojo (O), Esquelético (E), Facies (F), Riñón (R).

NA - No Aplica. No determinado.

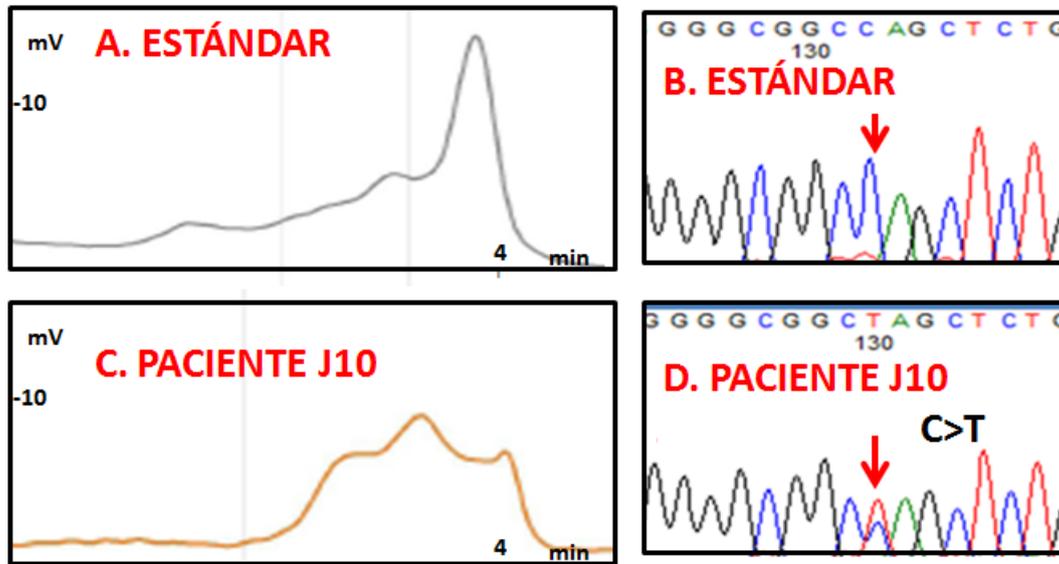


Fig. 11. Mutación sin sentido (Gln291X) detectada en estado heterocigoto por dHPLC y secuenciación en el paciente J10. A y C- Cromatogramas obtenidos por dHPLC. B y D- Electroferogramas correspondientes a A y C, el cambio observado está señalado por una flecha.

El análisis de las variantes identificadas en los 50 controles descartó la presencia de mutaciones no sinónimas, deleciones e inserciones en los 30 fragmentos que corresponden a la región codificante y la necesaria para el corte y empalme adecuado; por otra parte se identificó la presencia de 14 polimorfismos ya reportados a lo largo de dichos fragmentos tanto en pacientes como controles, por lo que el análisis de las frecuencias de éstos se realizó en la población general de estudio ya que no se puede establecer una comparación entre pacientes y controles debido al tamaño de la muestra (Tabla 17). Únicamente 2 polimorfismos mostraron un comportamiento distinto respecto a las frecuencias (mencionados mas adelante). Los polimorfismos detectados arrojaron un patrón cromatográfico característico y distinto al estándar, pudiendo discriminar entre la presencia de individuos homocigotos o heterocigotos para la variante en cuestión (Fig.12).

Tabla 17. Polimorfismos encontrados en pacientes y controles.

Exón(E) / intrón (I)	Variante (dbSNP)*	Frec. alélica
E2	Sinónima (rs1051415, [Gly89]): NM_000214.2(JAG1):c.267G>A	0.08
E2	Sinónima (rs79338570, [Ser98]): NM_000214.2(JAG1):c.294C>T	0.01
I2-3	Intrónica (rs74464347): NM_000214.2(JAG1):c.388-149C>T	0.10
I3-4	Intrónica (rs2273060): NM_000214.2(JAG1):c.440-15T>C	0.55
E4	Sinónima (rs1801138, [Cys196]): NM_000214.2(JAG1):c.588C>T	0.18
E5	Sinónima (rs10485741, [Pro248]): NM_000214.2(JAG1):c.744A>G	0.09
E6	Sinónima (rs1131695, [Tyr255]): NM_000214.2(JAG1):c.765C>T	0.52
E7	Sinónima (rsrs45575136, [Asn308]): NM_000214.2(JAG1):c.924C>T	0.14
E17	Sinónima (rs1801140 [Thr738]): NM_000214.2(JAG1):c.2214A>C	0.12
E20	Sinónima (rs56225585 [Ser794]): NM_000214.2(JAG1):c.2382C>T	0.02
I20-21	Intrónica (rs2273059): NM_000214.2(JAG1):c.2458+30A>G	0.11
I23-24	Delección intrónica (rs71334418): NM_000214.2(JAG1):c.2916+27delT	0.43
E26B	Sinónima (rs1051419, [Tyr1139]): NM_000214.2(JAG1):c.3417T>C	0.76
E26B	Sinónima (rs424234234, [Tyr1176]): NM_000214.2(JAG1):c.3528C>T	ND

* Nomenclatura de acuerdo al programa “Mutalyzer 2.0 β -8” (<http://www.lovd.nl/mutalyzer/>) actualizado el 31 de enero de 2011.
ND-No Determinado.

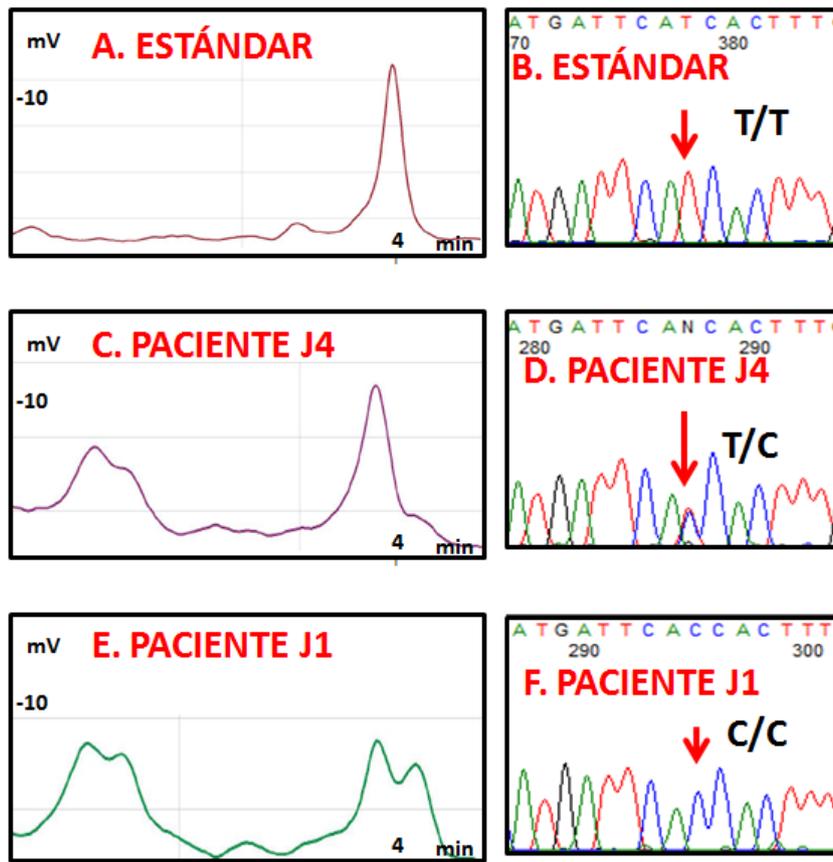


Fig. 12. Polimorfismo rs2273060 detectado en estado heterocigoto y homocigoto por dHPLC y secuenciación en los pacientes J4 y J1. A, C y E- Cromatogramas obtenidos por dHPLC (E). B, D y F- Electroferogramas correspondientes a A, C, y E, el cambio observado está señalado por una flecha.

XII. Discusión.

De acuerdo a lo reportado en la literatura las características clínicas del síndrome de Alagille son variables, ya que además de la colestasis biliar pueden presentar una o cuatro de las características clínicas principales (Spinner et al, 2010). El porcentaje de las características clínicas que conforman el fenotipo de los pacientes incluidos en el presente estudio se muestran en la figura 13.

En esta figura se incluye también la distribución de los rasgos clínicos encontrados en un estudio reciente realizado en el Reino Unido en el que se analizaron 117 individuos con síndrome de Alagille (reclutados durante 25 años), como parte de la experiencia en el diagnóstico molecular para esta enfermedad (Subramaniam et al, 2011).

De acuerdo a la prueba de χ^2 se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la prevalencia de 3 características clínicas al comparar ambos estudios (dentro de las cuales no se contemplan la colestasis ni las cardiopatías congénitas, siendo éstas las más frecuentes independientemente del estudio realizado), lo cual puede ser debido a lo siguiente: influencias multifactoriales en el fenotipo que sean particulares en los pacientes mexicanos o a la diferencia en el tamaño de la muestra y en los criterios de inclusión utilizados en ambos estudios. Sin embargo, existe mayor probabilidad de que sea el segundo caso considerando la diferencia en el tamaño de muestra entre ambas poblaciones y que en el estudio del Reino Unido se consideraron como criterios de inclusión desde una hasta cinco de las características clínicas principales (a diferencia del presente estudio que se incluyeron pacientes con 2 a 4 características), además que la enfermedad se caracteriza por presentar expresividad variable.

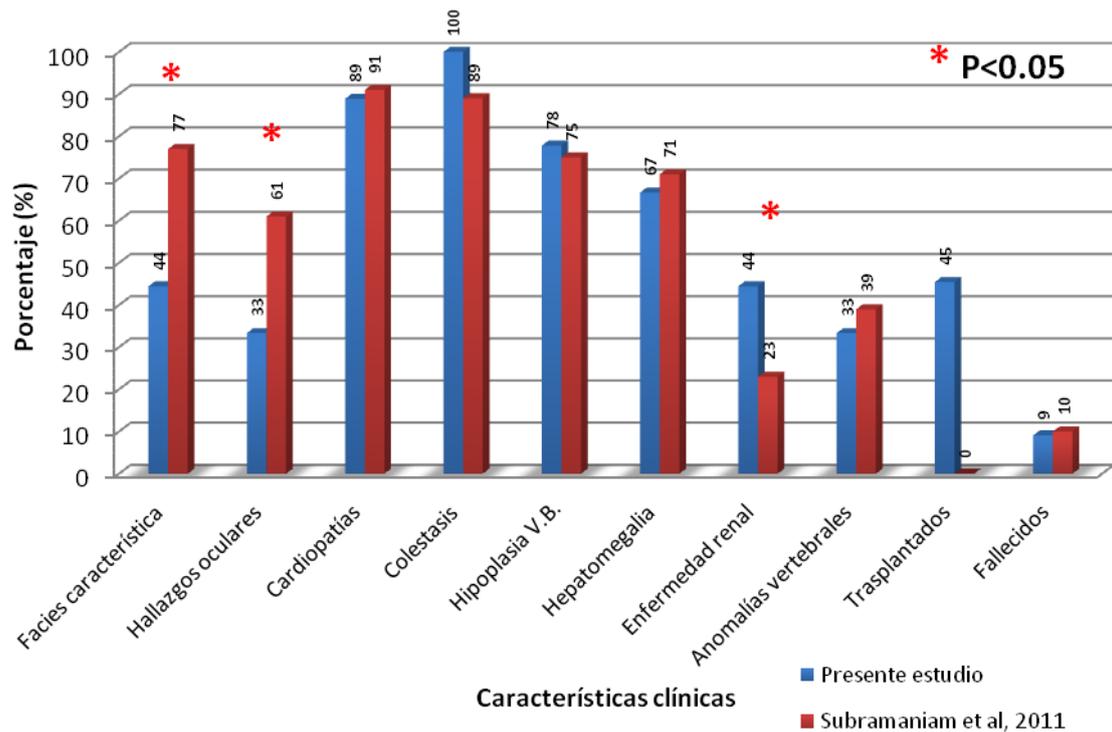


Fig. 13. Características clínicas de los pacientes mexicanos con síndrome de Alagille del presente estudio y lo reportado por Subramaniam et al, 2011. El porcentaje de pacientes trasplantados únicamente contempla el presente estudio. V.B.: vías biliares.

La búsqueda de mutaciones en el gen *JAG1* permitió identificar 7 mutaciones en 7 pacientes distintos, así como 14 polimorfismos distribuidos en las regiones intrónicas y codificantes (Fig. 14).

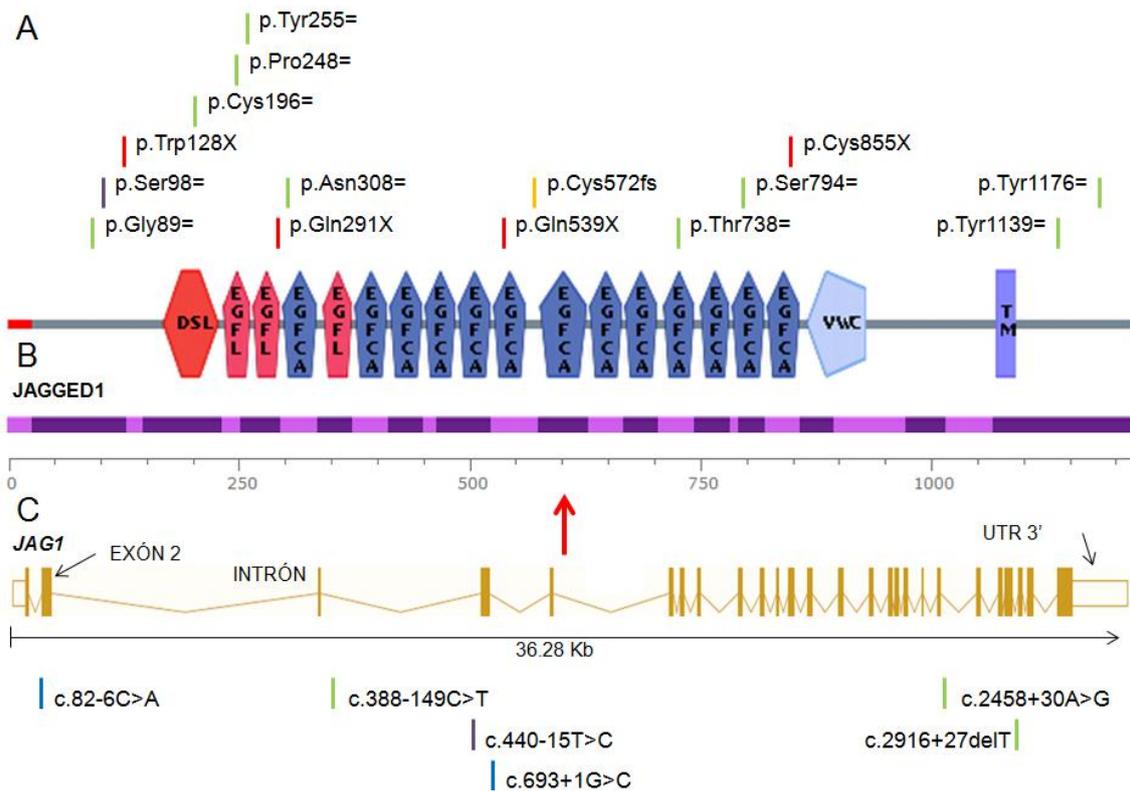


Fig. 14. Mutaciones y polimorfismos detectados a lo largo del gen *JAG1*. A- Variantes exónicas. B- Escala de aminoácidos que corresponden a los dominios de A. C- Variantes intrónicas. Mutación sin sentido (rojo), inserción (naranja), mutación en sitio de corte y empalme (azul), polimorfismo (verde), polimorfismo con posible asociación (morado).

El análisis de cada una de las mutaciones identificadas es el siguiente:

- c.82-6C>A.

Corresponde a una transversión en el intrón 1-2 del paciente J12. Se han reportado mutaciones que pueden alterar el corte y empalme asociadas al síndrome de Alagille que se localizan cerca de esta posición (Röpke et al, 2003). El alelo silvestre está conservado en el 80% de 35 mamíferos (Ensembl), por lo que pudiera ser indispensable para la maduración del transcrito que produce al péptido precursor que activa la vía de Notch. De acuerdo al software Alamut 2.0 este cambio crea un nuevo sitio aceptor de corte y empalme, el cual tiene mayor porcentaje de probabilidad de ser un sitio aceptor respecto al sitio aceptor normal que se tiene en el alelo silvestre (Fig. 15). Este software predice la probabilidad de que una región en particular participe en el corte y empalme (extremo 5' o 3') de acuerdo a los sitios conservados

reportados en mamíferos y a metodologías predictivas de distintas bases de datos y programas (*SpliceSiteFinder-like*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE* y *Human Splicing Finder*). La utilidad de este software y bases de datos ha sido demostrada en un estudio en el que se comprobaron experimentalmente los resultados arrojados, reportando una sensibilidad del 100% y especificidad del 60% para detectar alteraciones en el sitio de corte y empalme (Holla et al, 2009), sin embargo es importante considerar las limitaciones que conllevan las predicciones *in silico* y que se requiere confirmar experimentalmente dicha alteración.

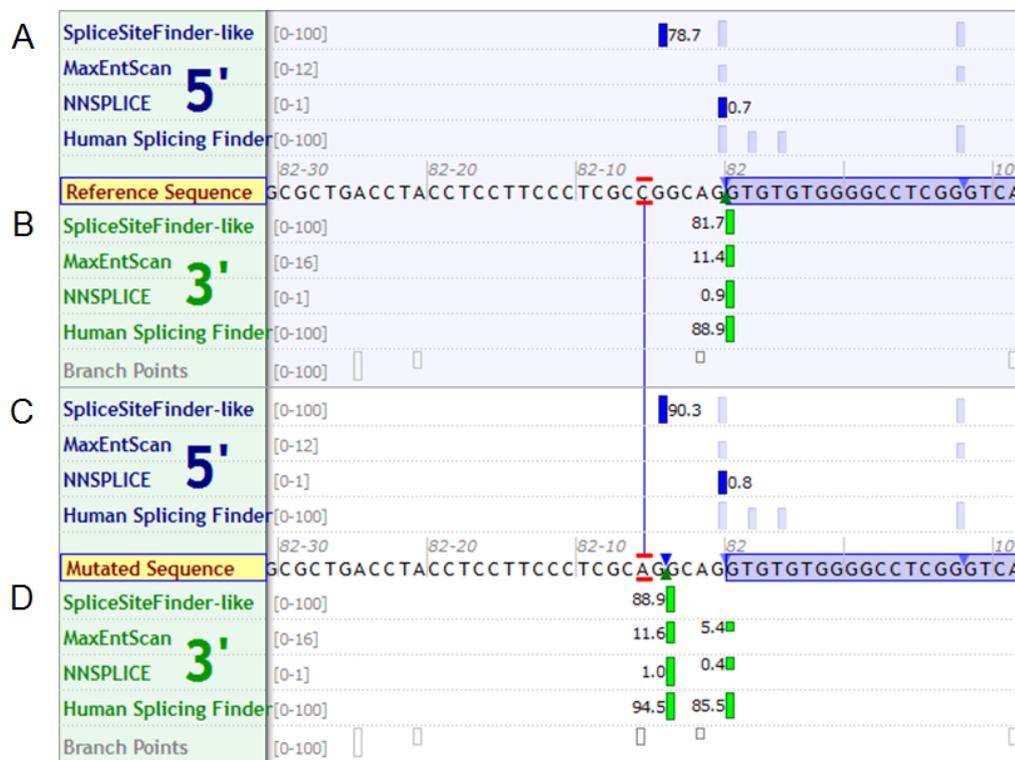


Fig. 15. Nuevo sitio de corte y empalme predicho por la mutación c.82-6C>A mediante el software Alamut 2.0. A y B- Sitios donador y aceptor en la secuencia silvestre. C y D- Sitios donador y aceptor predichos en la secuencia mutada. El cambio está señalado en rojo.

El nuevo sitio de corte y empalme predicho inserta un nuevo codón en la secuencia de aminoácidos y recorre el marco de lectura una base, lo que tiene como consecuencia la aparición de un codón de paro prematuro en la posición p.72 (Fig. 16).

p.24 **LRAK**VCGA SGQFELEILSMQNVNGLQNGNCCGGARNPGDRKCTRDECDTYFKV p.76
 p.24 **LRAK** AGVWGLGSRVVGDPVHAERERGAERELLRRRPEPGRPQVHPRRV*HILQS p.77

Fig. 16. Alteración de la secuencia de aminoácidos por el corrimiento del marco de lectura y aparición de un codón de paro prematuro (*). Secuencia obtenida por el software Transeq. La secuencia de aminoácidos superior corresponde al alelo silvestre y la inferior al alelo mutado.

El corrimiento del marco de lectura se localiza en el dominio del péptido señal y el codón de paro aparece después de éste. El análisis de esta región mediante el software SignalP 4.0 permitió visualizar que el codón de paro no interrumpe el sitio de corte del péptido señal (*S-score*), sin embargo el patrón de corte podría ser alterado (*Y-score* y *C-score*) y por ende el péptido podría ser procesado de diferente manera (Fig. 17). Lo anterior no tendría mayor repercusión considerando que se trata de un péptido trunco sin los dominios de interacción con Notch y la región transmembranal indispensable para anclarse en membrana, por lo que probablemente la aparición del codón de paro prematuro sería la consecuencia principal asociada al fenotipo.

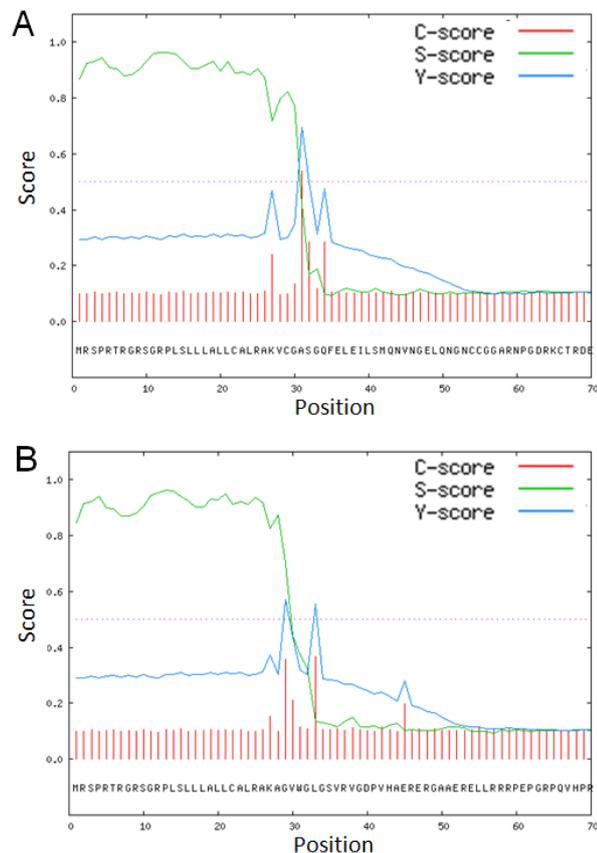


Fig. 17. Patrón de corte y localización del péptido señal. A- Secuencia silvestre. B- Secuencia con mutación.

- p.Trp128X.

Mutación sin sentido en el paciente J3 previamente reportada (HGMD #CM030050). Corresponde a una transición cuyo producto es una proteína trunca que pierde los dominios DSL, EGF y transmembranal, los cuales son indispensables para la interacción con el receptor tipo Notch y para anclarse a la membrana, respectivamente (Röpke et al, 2002) (Fig. 18).

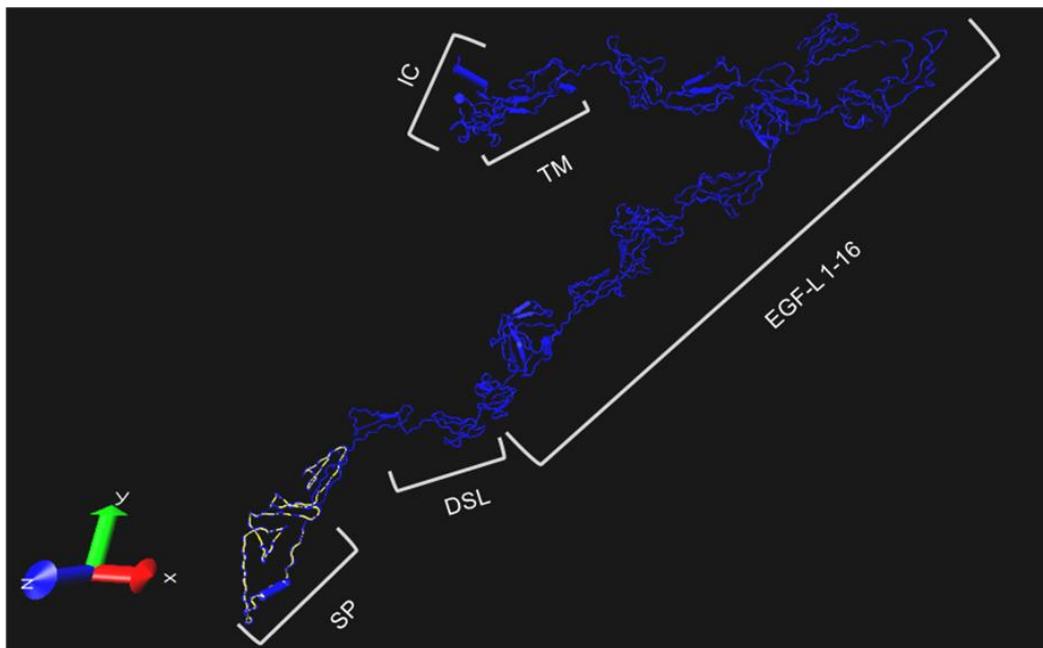


Fig. 18. Alineamiento de los modelos en caricatura del péptido precursor de JAGGED1 (azul) y del péptido con la mutación p.Trp128X (amarillo) mediante el software VMD. IC- parte intracelular de la proteína.

Para establecer los dominios que se pierden a nivel estructural de las mutaciones sin sentido se realizó un modelado *in silico* por homología del péptido precursor de la proteína funcional JAGGED1 mediante el software I-TASSER, el cual es uno de los programas ganadores de un concurso de modelado (CASP) por producir modelos muy cercanos a los determinados experimentalmente (Rodríguez-Sotres et al, 2011). Sin embargo es importante considerar las limitaciones que tienen los modelos *in silico* y que el modelo presentado únicamente cumple con la validación por el gráfico de Ramachandran, por lo que el modelo presentado únicamente se utilizará con fines ilustrativos. Una vez

obtenida la estructura, se realizó un alineamiento estructural mediante el software VMD de los modelos en caricatura del péptido completo y el fragmento del péptido trunco para visualizar los dominios que se pierden de acuerdo a la base de datos de Uniprot.

El software Alamut 2.0 establece que el transcrito producido podría ser degradado por el sistema de degradación del mensajero mediado por mutaciones sin sentido (*nonsense mediated decay*) al igual que en los casos posteriores. Sin embargo de acuerdo a lo establecido por Nagy et al, 1998, este mecanismo se ha observado experimentalmente en mamíferos sólo cuando el nucleótido involucrado se encuentra a más de 50 nucleótidos río arriba del sitio donador de corte y empalme. Debido a que el cambio observado está 5 nucleótidos río arriba de la porción final del exón, es probable que el transcrito producido no sea blanco de esta degradación y se produzca una proteína trunca incapaz de anclarse en la membrana y por lo tanto no activar la vía de Notch.

Debido a que no se tienen las características clínicas a detalle, no se puede establecer una comparación entre el caso del presente estudio y el reportado en la literatura.

- c.694+1G>C.

Mutación en el intrón 4-5 del paciente J11. Esta transversión se encuentra ubicada en un sitio altamente conservado en vertebrados (99%) además de que el alelo silvestre corresponde al nucleótido +1 del sitio donador de corte y empalme consenso (tipo clásico o por intrones “spliceosómicos”). Por lo tanto podría alterar la maduración del transcrito que da lugar al precursor de la proteína funcional, tal y como se ha reportado para el nucleótido en la posición siguiente río abajo (Onouchi et al, 1999). De acuerdo al análisis mediante el software Alamut 2.0, se pierde por completo el sitio donador de corte y empalme (Fig. 19) y debido a que no se encuentra un sitio crítico al menos en un radio de 200 nucleótidos se establece que es probable que se pierda por

completo el exón 4, produciendo una proteína sin el dominio DSL indispensable para la interacción con Notch y activación de la vía.

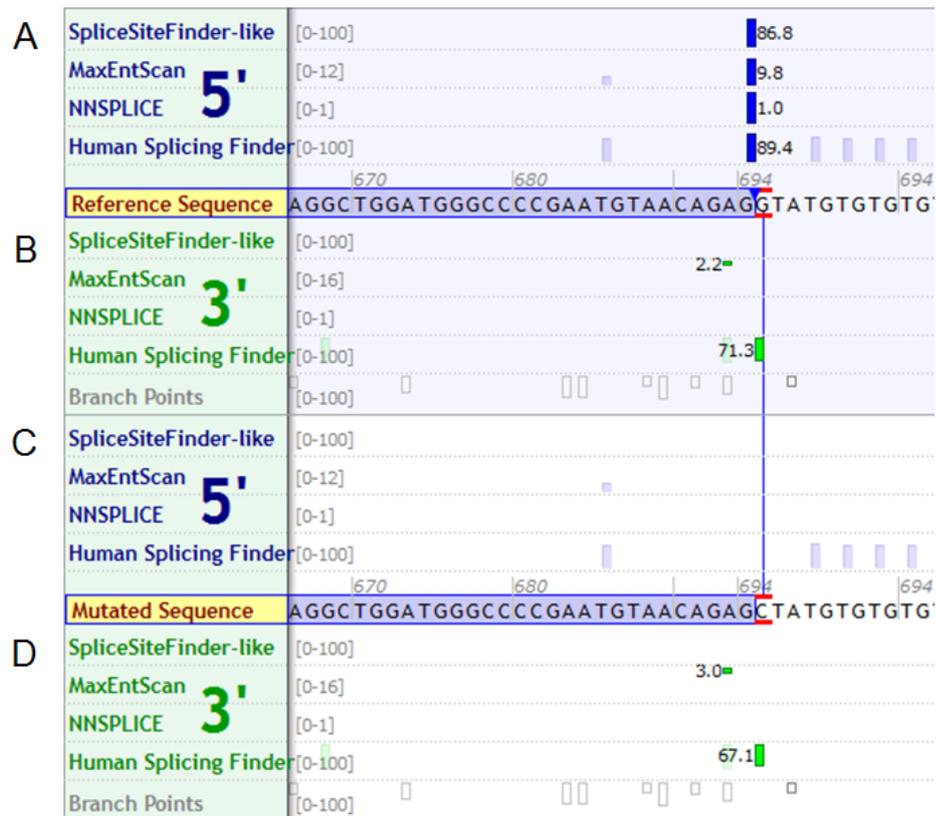


Fig. 19. Eliminación del sitio donador de corte y empalme predicho por la mutación c.694+1G>C mediante el software Alamut 2.0. A y B- Sitios donador y aceptor en la secuencia silvestre. C y D- Sitios donador y aceptor predichos en la secuencia mutada. El cambio está señalado en rojo.

A diferencia de las otras 6 mutaciones identificadas esta mutación intrónica no conduce a un codón de paro prematuro, por lo que todos los dominios se encuentran presentes menos el DSL (incluyendo el necesario para anclarse en membrana).

Esto puede reflejarse en la severidad del fenotipo (considerando las alteraciones renales), ya que a diferencia de la heterogeneidad fenotípica observada en los otros casos (con 3 o más sistemas afectados), el paciente con esta mutación sólo tiene dos sistemas afectados (los más frecuentes, hígado y corazón), lo cual coincide con la única correlación entre el genotipo y fenotipo reportada en la literatura, en la que se asocia una mutación en la posición +2 del mismo sitio de

corte y empalme con menor severidad en el fenotipo respecto a otros tipos de mutación (Onouchi et al, 1999). Sin embargo no puede establecerse una comparación directa entre ambos estudios debido a lo siguiente: las mutaciones no se encuentran en el mismo nucleótido, ambos pacientes no cumplen con las mismas características clínicas (se reportan facies característica y vértebras en forma de mariposa en el paciente de la literatura) y que el fondo genético es distinto.

- p.Gln291X.

Mutación sin sentido no reportada en el paciente J10. Se trata de una transición que tiene como consecuencia la aparición de un codón de paro prematuro en la secuencia codificada por el exón 6, por lo que se pierden los dominios tipo EGF indispensables para la unión con el receptor tipo Notch (DOS) y el dominio transmembranal indispensable para anclarse a la membrana y activar la vía de Notch (Fig. 20). El transcrito producido parece no ser blanco de degradación debido a que el cambio se localiza a 16 nucleótidos río arriba del sitio donador de corte y empalme.

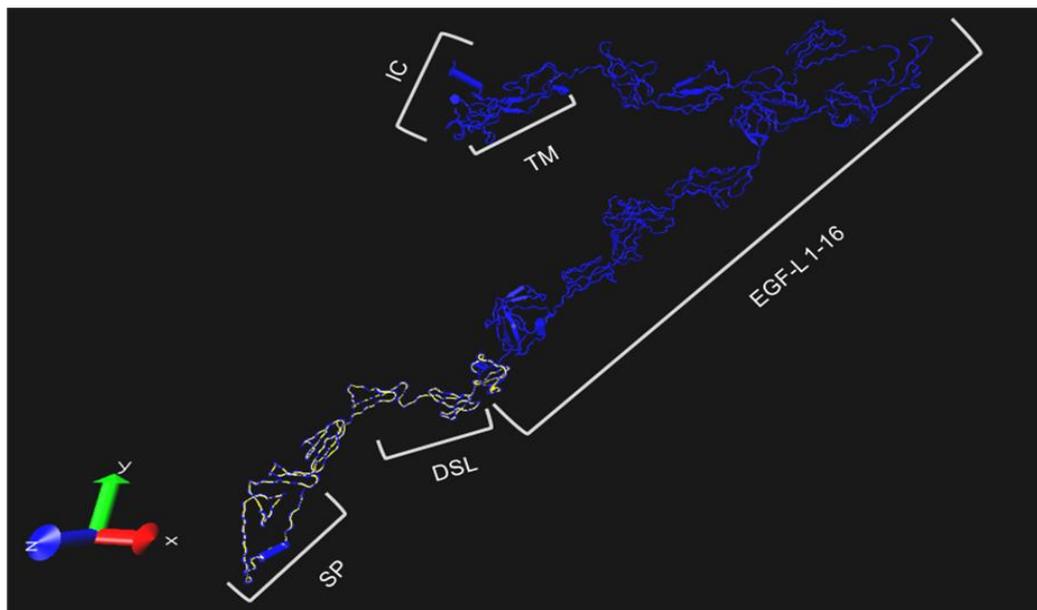


Fig. 20. Alineamiento de los modelos en caricatura del péptido precursor de JAGGED1 (azul) y del péptido con la mutación p.Gln291X (amarillo) mediante el software VMD.

- p.Gln539X.

Mutación sin sentido no reportada en el paciente J1. Esta transición conduce a una proteína trunca a partir de la secuencia codificada por el exón 13. De acuerdo a mutaciones sin sentido reportadas en regiones cercanas (Röpke et al, 2003) se establece como posible mecanismo la pérdida del dominio transmembranal y parte de los dominios EGF posteriores al dominio DOS, dentro de los cuales se encuentra el número 12 que es indispensable para interactuar con el receptor (Fig. 21). Debido a que la mutación se encuentra a más de 50 nucleótidos río arriba del sitio donador de corte y empalme, el transcrito podría ser blanco del mecanismo de degradación del mensajero por mutación sin sentido como lo establece el software Alamut 2.0.

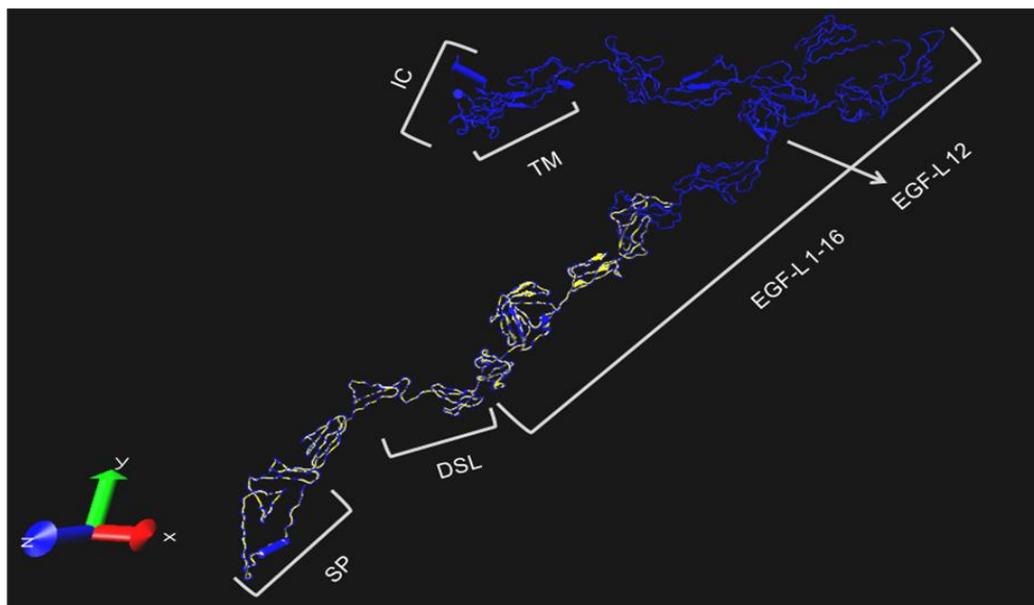


Fig. 21. Alineamiento de los modelos en caricatura del péptido precursor de JAGGED1 (azul) y del péptido con la mutación p.Gln539X (amarillo) mediante el software VMD.

- p.Cys572fs.

Inserción de una base en el paciente J9 previamente reportada (HGMD #CI062270). Se recorre el marco de lectura provocando la aparición de un codón de paro prematuro un triplete río abajo de donde se localiza la inserción (Fig. 22).

p.561 SHLKDHCRTPPC**E**VIDSCTVAMASND p.586
p.561 SHLKDHCRTPPL***L**SD*QLHSGHGFQR p.586

Fig. 22. Alteración de la secuencia de aminoácidos por el corrimiento del marco de lectura y aparición de un codón de paro prematuro (*). Secuencia obtenida por el software Transeq. La secuencia de aminoácidos superior corresponde al alelo silvestre y la inferior al alelo mutado.

De acuerdo a lo reportado por Warthen et al, 2006, se establece como posible mecanismo la pérdida del dominio transmembranal y parte de los dominios EGF (incluyendo el número 12), que como ya fue mencionado son requeridos para activar la vía de Notch (Fig. 23). No se detallan las características clínicas del individuo con esta mutación en el estudio de la literatura, por lo que no se puede realizar una comparación con el individuo del presente estudio con la misma mutación.

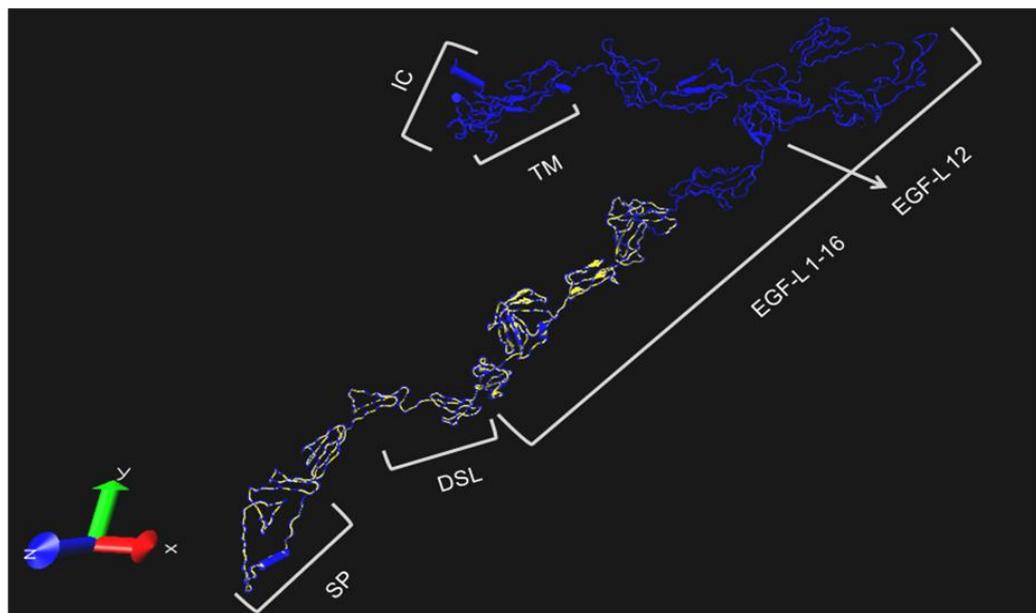


Fig. 23. Alineamiento de los modelos en caricatura del péptido precursor de JAGGED1 (azul) y del péptido con la mutación p.Cys572fs (amarillo) mediante el software VMD.

- p.Cys855X.

Mutación sin sentido no reportada en el paciente J2. Corresponde a una transversión cuyo producto es una proteína trunca que pierde la última parte de los dominios EGF y el dominio transmembranal (Fig. 24) tal y

como se ha reportado para una mutación del mismo tipo que se localiza en el codón siguiente (Röpke et al, 2002). En este caso a pesar de que la proteína posee los dominios claves de interacción con el receptor Notch, es incapaz de interactuar con éste debido a que no posee el dominio transmembranal y por lo tanto no puede translocarse en la membrana para activar la vía.

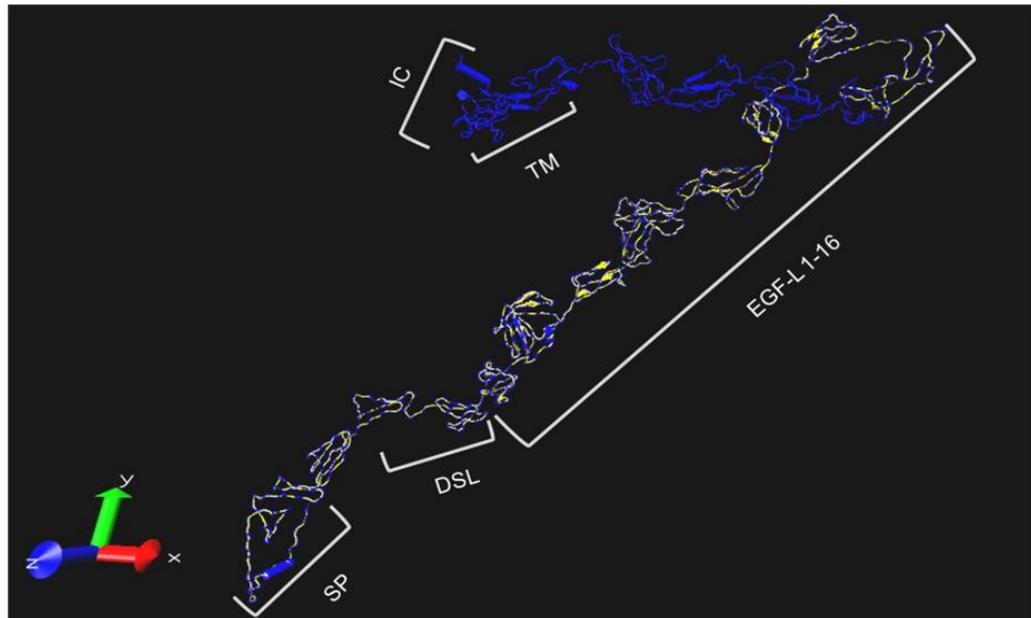


Fig. 24. Alineamiento de los modelos en caricatura del péptido precursor de JAGGED1 (azul) y del péptido con la mutación p.Cys855X (amarillo) mediante el software VMD.

El total de mutaciones identificadas corresponden al 63.6% de la población total de pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Alagille. La heterogeneidad de la población de estudio en cuanto a las características clínicas de inclusión repercutió directamente en el total de mutaciones encontradas (Fig. 25), ya que de acuerdo a un par de estudios recientes (Subramaniam et al, 2011; Guegan et al, 2011), el porcentaje de mutaciones encontradas en pacientes diagnosticados varía dependiendo del número de características clínicas consideradas (desde el 20% para una característica hasta 86% para las cinco características).

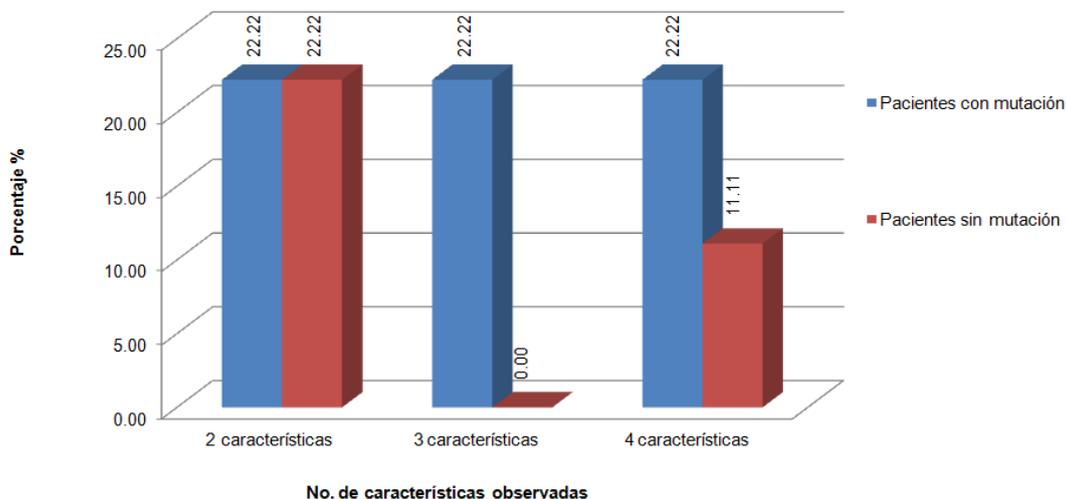


Fig. 25. Porcentaje de mutaciones detectadas en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Alagille.

La distribución del porcentaje de mutaciones encontradas de acuerdo a las características clínicas de inclusión mostró una mayor prevalencia cuando se consideraron de 3 a 4 características, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Subramaniam et al, 2011; Guegan et al, 2011) ya que mientras mas características clínicas sean consideradas existe mayor probabilidad de encontrar una mutación.

Las mutaciones no mostraron preferencia de aparición a lo largo del gen *JAG1*, lo cual concuerda con la literatura ya que se ha establecido que no hay puntos calientes en los cuales se haya detectado la mayor cantidad de mutaciones (Spinner et al, 2010). Esto es de gran importancia en el diagnóstico molecular de la enfermedad, ya que la búsqueda de mutaciones se debe realizar a lo largo de todo el gen para asegurar el diagnóstico.

Por otra parte, se ha establecido que en general el 66% de las mutaciones observadas en otros estudios se localizan en los exones 1 a 6, 9, 12, 17, 20, 23 y 24 (Warthen et al, 2006), lo cual no concuerda con los resultados obtenidos ya que las mutaciones encontradas se localizan a lo largo del gen, con excepción de la última parte (después del exón 21). Esto puede deberse al menor tamaño de la muestra del presente estudio respecto al de Warthen et al, 2006, sin embargo tampoco existe una concordancia en la presencia de mutaciones en una región en particular en los distintos estudios en los que se

ha considerado un tamaño de muestra mayor al presente (Subramaniam et al, 2011; Guegan et al, 2011).

El porcentaje del tipo de mutaciones encontradas en el presente estudio es similar a lo reportado en la literatura (Spinner et al, 2010), ya que considerando únicamente las mutaciones puntuales, la mayor parte corresponden a mutaciones sin sentido (57.1%), mientras que el resto corresponden a mutaciones que alteran el corte y empalme (28.6%) y una inserción (14.3%). La ausencia de mutaciones de sentido equivocado puede deberse al tamaño de la muestra en comparación con otros estudios, ya que éstas corresponden al menor porcentaje en la literatura (11%), por lo que la probabilidad de detectarlas disminuye considerablemente respecto a los otros tipos de mutaciones.

En general no se observó una correlación entre el genotipo y el fenotipo, ya que los sistemas y órganos afectados varían de manera independiente del sitio donde se localice la mutación (Tabla 16), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Röpke et al, 2003; Warthen et al, 2006; Spinner et al, 2010). Esto puede ser debido a que en todas las mutaciones que tienen como consecuencia un codón de paro prematuro (6 mutaciones) se pierde el dominio transmembranal (independientemente de los dominios que se pierden a partir del sitio donde se observó la mutación), por lo que el péptido producido sería incapaz de translocarse en la membrana y participar como ligando para activar la vía. El mecanismo molecular propuesto para estas mutaciones es la haploinsuficiencia, ya que la proteína silvestre es incapaz de compensar la variante trunca. La mutación restante que no conlleva a un codón de paro prematuro fue discutida anteriormente.

Los polimorfismos identificados tanto en pacientes como en controles correspondieron a los ya reportados en la literatura (dbSNP), sin embargo no existe ningún reporte de éstos en población mexicana (Tabla 18). Los polimorfismos se observaron, al igual que las mutaciones, distribuidos a lo largo del gen *JAG1* (Fig. 14), por lo que considerando éstos tampoco se pudo establecer la presencia de puntos calientes en el gen.

Tabla 18. Análisis de los polimorfismos encontrados en pacientes y controles.

Variante (dbSNP)	Genotipo (n=61)			Frec. Alélica		Frec. Alélica +		Observaciones
	GG	GA	AA	G	A	G	A	
rs1051415				0.92 0.08		0.86 0.14		1 paciente y 9 controles heterocigotos. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg^. Frecuencia similar a la observada en población europea, asiática, afroamericana y euroamericana.
	0.84 0.16					 Europea (1000 G) 0.92 0.08 Asiática (1000 G) 0.97 0.03 Afroamericana (ESP) 0.89 0.11 Euroamericana (ESP) 0.63 0.37		
rs79338570				0.99 0.01		0.95 0.05		Paciente J8 heterocigoto. Polimorfismo con posible asociación al fenotipo clínico.
	0.99 0.01 0.00					 Africana (1000 G) 0.9 <0.01 Euroamericana (ESP)		
rs74464347				0.90 0.10		0.91 0.09		1 paciente y 11 controles heterocigotos. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg^. Frecuencia similar a población africana.
	0.80 0.20					 Africana (1000 G)		
rs2273060				0.45 0.55		0.64 0.36		Pacientes y controles. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg^. Frecuencia similar a la reportada en población de ancestría mexicana que habita en Los Ángeles, y mayor respecto a otras poblaciones. Polimorfismo con posible asociación al fenotipo clínico.
	0.25 0.41 0.34 Presente estudio Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP 0.16 0.44 0.40			 Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP 0.38 0.62		 Europea (HAPMAP) 0.58 0.42 Asiática (HAPMAP) 0.56 0.44 Africana (HAPMAP)		

Tabla 18. Análisis de los polimorfismos encontrados en pacientes y controles (continuación).

Variante (dbSNP)	Genotipo (n=61)			Frec. Alélica		Frec. Alélica +		Observaciones
	CC	CT	TT	C	T	C	T	
rs1801138								Pacientes y controles. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg [^] . Frecuencia similar a la reportada en población de ascendencia mexicana que habita en Los Ángeles y mayor respecto a población europea.
	0.70	0.23	0.07	0.82	0.18	0.97	0.03	
	Presente estudio			Presente estudio		Europea (HAPMAP)		
	0.72	0.20	0.08	0.82	0.18	0.76	0.24	
	Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP			Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP		Asiática (HAPMAP)		
rs10485741								Pacientes y controles. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg [^] . Frecuencia similar a las reportadas en población de ascendencia mexicana que habita en Los Ángeles y en población europea.
	0.82		0.18	0.91	0.09	0.89	0.11	
	Presente estudio			Presente estudio		Europea (HAPMAP)		
	0.80	0.20	0.00	0.90	0.10	0.95	0.05	
	Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP			Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP		Asiática (HAPMAP)		
rs1131695								Pacientes y controles. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg [^] . Frecuencia similar a las reportadas en población de ascendencia mexicana que habita en Los Ángeles y en población italiana (Toscani). Probable influencia europea, sin embargo habría que considerar la influencia amerindia y española directamente para comprobarlo (no hay reportes en ambas poblaciones para este polimorfismo).
	0.20	0.56	0.24	0.48	0.52	0.40	0.60	
	Presente estudio			Presente estudio		Toscani, Italia (HAPMAP)		
	0.20	0.38	0.42	0.39	0.61	0.71	0.29	
	Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP			Mexicana (Los Ángeles) HAPMAP		Asiática (HAPMAP)		
					0.66	0.34	Africana (HAPMAP)	

Tabla 18. Análisis de los polimorfismos encontrados en pacientes y controles (continuación).

Variante (dbSNP)	Genotipo (n=61)			Frec. Alélica		Frec. Alélica +		Observaciones
	CC	CT	TT	C	T	C	T	
rs45575136								Pacientes y controles. Población no en equilibrio de Hardy-Weinberg^.
	0.84		0.16	0.86	0.14	0.98	0.02	
rs1801140								Pacientes y controles (controles homocigotos). Población en equilibrio de Hardy-Weinberg^. Frecuencia similar a la reportada en población europea.
	0.79	0.18	0.03	0.88	0.12	0.88	0.12	
rs5622558								Pacientes y controles. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg^. Frecuencia similar a la población europea.
	0.95		0.05	0.98	0.02	0.72	0.28	
rs2273059								Pacientes y controles. Población en equilibrio de Hardy-Weinberg^. Frecuencia mayor respecto a otras poblaciones.
	0.79		0.21	0.89	0.11	0.98	0.02	

Tabla 18. Análisis de los polimorfismos encontrados en pacientes y controles (continuación).

Variante (dbSNP)	Genotipo (n=61)			Frec. Alélica		Frec. Alélica +		Observaciones
rs71334418	TT	T-	--	T	-	T	-	Pacientes y controles.
	0.36	0.43	0.21	0.57	0.43	ND		Población no en equilibrio de Hardy-Weinberg [^] . Frecuencia no reportada en otras poblaciones.
rs1051419	TT	TC	CC	T	C	T	C	Pacientes y controles.
	0.11	0.25	0.64	0.24	0.76	0.37 0.63	0.57 0.43	Población en equilibrio de Hardy-Weinberg [^] . Frecuencia similar a la reportada en población europea.
rs1051421	CC	CT	TT	C	T	C	T	Pacientes y controles.
	ND			ND		0.61 0.39		ND. Único caso en el que el patrón cromatográfico no permitió la identificación del polimorfismo.

+ Frecuencia reportada en distintas poblaciones (dbSNP).

[^] P > 0.05, 1 grado de libertad.

NA-No Aplica. ND-No Determinado.

La mayoría de los polimorfismos identificados fueron variantes sinónimas (71.4%), mientras que el resto fueron variantes en regiones intrónicas (Tabla 17). Esto fue influenciado directamente porque el análisis se centró en las regiones exónicas y sitios intrónicos contiguos (para buscar mutaciones que alteren el sitio de corte y empalme).

En la mayoría de los casos, la frecuencia alélica de los polimorfismos encontrados fue similar en pacientes y controles, con dos excepciones que se mencionarán mas adelante. De acuerdo a la cantidad de alelos mutados no

hubo diferencia entre controles y pacientes, tanto en variantes intrónicas como exónicas (Fig. 26). Lo anterior, permitiría desechar la hipótesis en la que se establece una posible asociación entre el número de alelos mutados (polimorfismos) y el fenotipo, ya que como se muestra en la figura 26 los dos controles incluidos mostraron tener mayor cantidad de alelos mutados que los pacientes, aunque también hay que considerar que no se conoce en qué alelo está cada cambio (podría haber haplotipos de riesgo). Sin embargo, tal como se observa en los pacientes, los controles mostraron una heterogeneidad en la cantidad alelos mutados. En la mayoría de los casos, la cantidad de alelos mutados en exones fue mayor que los la observada en intrones, sin embargo esto también puede deberse a que el análisis se centra en las regiones exónicas.

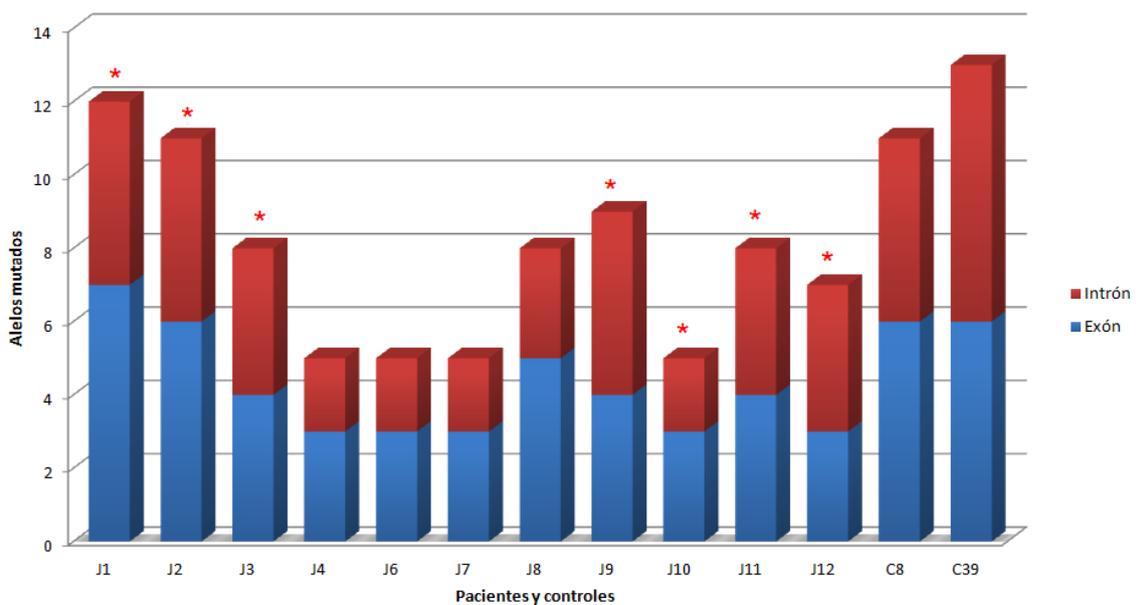


Fig. 26. Alelos mutados observados en pacientes y controles. Los alelos mutados corresponden únicamente a polimorfismos, aquellos pacientes en los que se encontró una mutación están marcados con un asterisco. Cada color corresponde a variantes intrónicas (rojo) y exónicas (azul).

La frecuencia alélica de las variantes encontradas fue similar a la obtenida por el proyecto HapMap en población que habita en los Ángeles con ancestría mexicana (no reportada en todos los polimorfismos), sin embargo no se pueden hacer comparaciones directas como población mexicana. En la base de datos del HapMap se establece que los individuos analizados tienen al menos tres

abuelos nacidos en México, sin embargo tampoco se establece la región de origen de dichos ancestros.

Por otra parte, las frecuencias reportadas de polimorfismos en la base de datos del dbSNP consideran distintas poblaciones de acuerdo al proyecto o estudio realizado, por lo que en algunos casos se hizo la comparación con la población disponible. Como se puede observar en la Tabla 18, la frecuencia de los polimorfismos reportados en el presente estudio fue similar a distintas poblaciones dependiendo de la información disponible.

Las poblaciones del HapMap (europea, asiática y africana) se consideraron para hacer una comparación entre los resultados del presente estudio y los observados en distintas poblaciones, aunque esto se realizó en 6 polimorfismos en los que coincidieron con la misma población reportada (Fig. 27). En la mayoría de estos polimorfismos se observó una frecuencia similar a lo reportado en población europea, y a su vez ambas fueron similares con la frecuencia reportada en población con ancestría mexicana, sin embargo esto no se presentó en todos los casos. Esto puede deberse a que la población mexicana actual es una mezcla compleja con influencia de distintas poblaciones, siendo la población europea la que puede tener mayor influencia respecto a las poblaciones asiática y africana (no observado en todos los casos). Sin embargo para conocer la influencia de las distintas poblaciones en población mexicana es necesario establecer la frecuencia de esos polimorfismos en población española y amerindia.

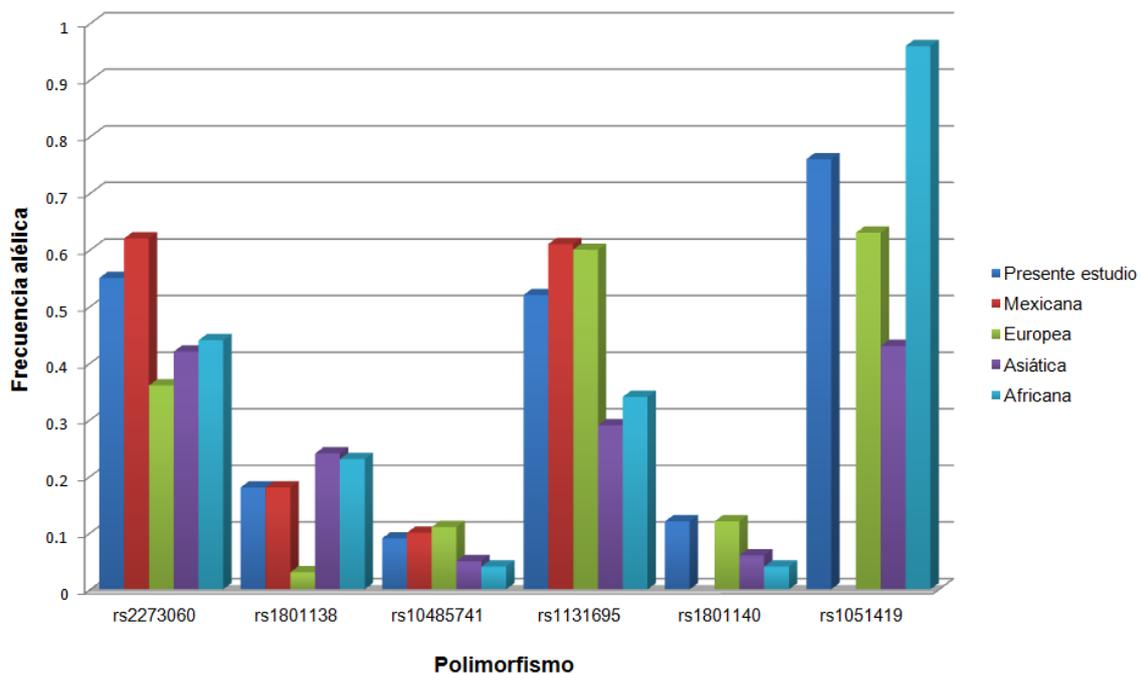


Fig. 27. Frecuencia alélicas de polimorfismos en el presente estudio y otra poblaciones. Las poblaciones corresponden a las reportadas en el HapMap. Para los dos últimos polimorfismos no se encontró frecuencia en población de los Ángeles con ancestría mexicana.

La variante sinónima rs79338570 corresponde a un polimorfismo de un solo nucleótido reportado en población africana y euroamericana con una frecuencia alélica del 5% y menor del 1%, respectivamente (Tabla 18). En la población mexicana del presente trabajo (no reportada previamente) también se obtuvo una frecuencia baja, sin embargo quedó en el límite para ser considerada polimorfismo (1%) además de haber sido encontrada únicamente en el paciente J8, lo que podría sugerirla como variante de riesgo en dicho paciente. Sin embargo, tomando en cuenta que se trata de una mutación sinónima que en un punto de vista conservador no produce un cambio en la proteína y que se encuentra reportada en poblaciones sanas de diferente origen étnico, se puede descartar su asociación con el fenotipo clínico de la enfermedad.

Por otra parte, considerando que se ha establecido la asociación de mutaciones sinónimas a distintas enfermedades, se calculó la diferencia entre el índice de utilización relativa de los codones sinónimos que codifican para serina en este polimorfismo (TCC y TCT). El valor obtenido corresponde a 0.03, lo que indica que no hay un cambio significativo entre la tasa de traducción respecto a cada uno de los codones (Sauna et al, 2011).

El análisis de esta variante sinónima mediante el software Alamut 2.0 estableció que se crea un sitio de unión al factor de regulación del corte y empalme SRp55 (Fig. 28), el cual está implicado en la determinación del corte y empalme alternativo y otros mecanismos de maduración del mRNA (Long et al, 2009). Esto podría afectar el equilibrio que existe entre el corte y empalme del transcrito que codifica para el precursor de JAGGED1 y aquel que codifica para el péptido que no participa en la vía de Notch (Ensembl). Sin embargo se requiere de evidencia experimental para comprobar esta teoría.



Fig. 28. Sitio de unión a SRp55 generado por el polimorfismo rs79338570. A- Factores reguladores del corte y empalme en la secuencia silvestre. B- Factores reguladores del corte y empalme en la secuencia con el polimorfismo. El cambio nucleotídico está señalado en rojo.

El polimorfismo rs2273060 a diferencia de los casos anteriores, mostró una frecuencia alélica significativamente mayor en los pacientes ($p < 0.05$) que la obtenida en controles (0.82 y 0.45, respectivamente), lo cual podría sugerir una asociación de esta variante con el fenotipo clínico de la enfermedad. Sin embargo es importante considerar que el tamaño de la muestra de los pacientes es muy pequeño y que para hacer una comparación estadísticamente válida se requiere de un mayor tamaño de muestra.

Para establecer si pudiera estar asociada esta variante con el fenotipo observado en los pacientes se realizó la prueba de *Odds Ratio* (OR) mediante una tabla de 2 x 2 (Tabla 19). El genotipo homocigoto para el polimorfismo mostró un valor de OR mayor a 1.0, por lo que se puede establecer que este genotipo pudiera estar asociado a las características clínicas observadas en los

pacientes, así como el genotipo TT en controles pudiera tener un efecto protector (el cual está ausente en los pacientes). Debido a que las características clínicas de los pacientes son heterogéneas (de 2 a 4 sistemas afectados), se puede proponer como fenotipo en común la colestasis biliar (y en menor grado las cardiopatías congénitas), ya que éste fue utilizado como criterio indispensable y mínimo para la inclusión al diagnóstico clínico. Esta alteración hepática (y probablemente la que involucra al corazón) podría ser por lo tanto la característica a la cual esté asociado el polimorfismo, sobre todo en aquellos pacientes en los que no se encontró mutación (en caso de que no tuvieran mutaciones en *NOTCH2* o aberraciones cromosómicas que involucren ambos genes asociados). Debido a que la enfermedad se caracteriza por tener expresividad variable, tampoco se descarta que este polimorfismo pudiera repercutir en los otros sistemas. Además, de acuerdo al mecanismo molecular de la enfermedad, la significancia estadística disminuye considerando que el fenotipo de los pacientes con mutación se debe a ésta más que al polimorfismo rs2273060, a menos que ambas variantes en cada caso contribuyeran al fenotipo. Esto sólo puede comprobarse aumentando el tamaño de la muestra, sobre todo en aquellos individuos en los que no se encontró mutación.

Tabla 19. Odds ratio en pacientes y controles del polimorfismo rs2273060.

Genotipo	Proporción (#)	Valor P	O. R.	95% I.C.
	Pacientes/Controles			
TT	0 (11), 15 (50)	0.04*	0.11	0.00, 1.94
CT	4 (11), 21 (50)	0.36	0.78	0.20, 3.04
CC	7 (11), 14 (50)	0.01*	4.50	1.14, 17.79

Por otra parte, se ha reportado que el polimorfismo rs2273061, localizado 158 nucleótidos río arriba del polimorfismo rs2273060, está asociado a defectos en el sistema óseo en distintas poblaciones, el cual es una de las características clínicas del síndrome de Alagille (Kung et al, 2010). El análisis mediante el software GLIDERS demostró que ambos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento en poblaciones europea, asiática y africana (Tabla 20), por lo que se puede asumir que ambos alelos se heredan de manera conjunta. Este software muestra los resultados de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) generados a partir de distintas plataformas de

microarreglos, los cuales son recolectados en una base de datos junto con su respectivo análisis (Gabriel et al, 2007).

Tabla 20. Análisis mediante el software GLIDERS para los polimorfismos rs2273060 y rs2273061.

Población	Frecuencia alélica rs2273060 / rs2273061	r ²	P	Plataforma
Europea	0.36 / 0.37	0.96	<0.001	Illumina
Asiática	0.40 / 0.42	0.49	<0.001	Illumina
Africana	0.44 / 0.43	0.98	<0.001	Illumina

El estudio de Kung et al, 2010, demostró mediante el ensayo de retardo (EMSA) que el alelo mutado del polimorfismo rs2273061 altera el sitio de unión a c-Myc (factor de transcripción con probable función reguladora positiva de *JAG1*) y que el genotipo homocigoto correlaciona con una disminución en la expresión de *JAG1* en células mononucleares periféricas (30 veces respecto al control). Esto puede justificar la asociación observada entre el genotipo homocigoto mutante para el polimorfismo rs2273060 y el fenotipo de los pacientes con síndrome de Alagille (con sus respectivas limitaciones), considerando que ambas variantes alélicas se encuentran en desequilibrio de ligamiento y que tendrían como consecuencia una menor activación de la vía de Notch debido a la menor cantidad de ligando JAGGED1. Sin embargo, para asegurar si existe dicha asociación es necesario confirmar experimentalmente que se encuentran en desequilibrio de ligamiento en población mexicana y que la variante mutada del polimorfismo rs2273060 disminuya los niveles de expresión de *JAG1* respecto a la variante silvestre.

Finalmente considerando que para el análisis por secuenciación directa de los 30 amplicones se hubieran obtenido 2196 secuencias para pacientes y controles (incluyendo la confirmación de los cambios con el oligonucleótido antisentido), se disminuyó la cantidad de muestras analizadas por secuenciación alrededor de un 81.5%, lo cual disminuye los costos aproximadamente en la misma proporción tomando en cuenta que cada reacción de secuenciación tiene un costo al menos de \$200.00 M.N. (mediante secuenciación directa en el equipo ABI 310 de Applied Biosystems®). Lo anterior coincide con lo reportado en la literatura (Xiao et al, 2001), ya que se

establece que disminuye los costos hasta 10 veces respecto al análisis por secuenciación directa, dependiendo de la cantidad de fragmentos estudiados y qué tan polimórfico sea el gen de interés. Esto demuestra la importancia de utilizar la técnica de dHPLC como tamizaje previo a secuenciar en la identificación de mutaciones en el gen *JAG1* en pacientes con sospecha de síndrome de Alagille, considerando que en general una mutación presente en un fragmento de 30 es la responsable de la enfermedad y el abatimiento de costos y tiempos de análisis. La aplicación directa de lo anterior significa la posibilidad de otorgar el diagnóstico molecular de la enfermedad y proporcionar el asesoramiento genético pertinente.

XIII. Conclusiones.

La identificación de 5 mutaciones distintas de las 348 ya reportadas resalta la complejidad de los cambios en *JAG1* asociados al síndrome de Alagille.

La frecuencia alélica de los polimorfismos encontrados en pacientes y controles sugirió la posible asociación de los polimorfismos rs79338570 y rs2273060 con la enfermedad.

La expresividad variable observada en el fenotipo clínico y la presencia de mutaciones a lo largo de los 26 exones de *JAG1* denotan la relevancia del análisis por dHPLC.

XIV. Perspectivas.

Una vez que han sido identificadas las mutaciones, para proporcionar el asesoramiento genético correspondiente se debe establecer si se trata de variantes *de novo* o heredadas. Si bien es posible en base a la clínica diagnosticar si alguno de los padres está o no afectado (asumiéndose entonces que en caso de estar afectado es debido a la presencia de una mutación similar a la encontrada en el paciente), una opción es ofrecer el diagnóstico molecular al secuenciar la muestra de DNA de ambos padres en el fragmento donde se identificó el cambio.

Se propone establecer experimentalmente el efecto de cada una de las mutaciones encontradas mediante mutagénesis dirigida (transfectando en líneas celulares humanas debido a que JAGGED1 es una proteína transmembranal altamente conservada en mamíferos) y/o ratones *knockout*, además de considerar las muestras de tejidos disponibles de los pacientes.

Para este fin, se puede realizar una caracterización bioquímica y molecular tanto en los modelos mencionados como en las biopsias disponibles embebidas en parafina y/o células mononucleares aisladas de sangre periférica de los pacientes. En general las técnicas que se pueden emplear son: inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para observar la presencia y cantidad relativa de los péptidos producidos y morfología en los tejidos que pudieran estar afectados, microscopía electrónica acoplada a inmunohistoquímica para localizar a nivel subcelular los péptidos producidos, citometría de flujo para determinar la cantidad de péptido funcional producido, cromatografía de afinidad para establecer la cantidad de péptido que se puede unir al receptor tipo Notch (respecto al péptido funcional), cuantificación de la expresión relativa del transcrito funcional y de los genes blanco de la vía de Notch y finalmente, electroforesis y secuenciación del cDNA para detectar alteraciones en el corte y empalme.

Respecto a los polimorfismos identificados con posible asociación, se propone aumentar el tamaño de la muestra tanto en pacientes y controles para comprobar si existe dicha asociación con el fenotipo, sobre todo en aquellos pacientes en los que no se establezca la presencia de una mutación en *JAG1*. Se pueden caracterizar ambos polimorfismos de manera bioquímica y molecular al igual que las mutaciones. Además, se puede demostrar experimentalmente si el polimorfismo rs2273060 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo rs2273061 en población mexicana.

XV. Bibliografía.

Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, Stanger BZ, Jacquemin P, Pierreux CE, Clotman F, Lemaigre FP. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology*. (2009) 136 (7): 2325-33.

Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum. Mutat.* (1999) 14 (4): 333-9.

Arnon R, Annunziato R, Miloh T, Suchy F, Sakworawich A, Hiroshi S, Kishore I, Kerkar N. Orthotopic liver transplantation for children with Alagille syndrome. *Pediatr. Transplant.* (2010) 14 (5): 622-8.

Arvay JL, Zemel BS, Gallagher PR, Rovner AJ, Mulberg AE, Stallings VA, Haber BA. Body composition of children aged 1 to 12 years with biliary atresia or Alagille syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2005) 40 (2): 146-50.

Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D, Seidman J.G, Smith J.A, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol I. Massachusetts Genetal Hospital Harvard Medical School. Wiley Interscience (1991).

Bales CB, Kamath BM, Munoz PS, Nguyen A, Piccoli DA, Spinner NB, Horn D, Shults J, Leonard MB, Grimberg A, Loomes KM. Pathologic Lower Extremity Fractures in Children With Alagille Syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2010) 51 (1): 66-70.

Boyer J, Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, Gonzales M, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. Expression of mutant JAGGED1 alleles in patients with Alagille syndrome. *Hum. Genet.* (2005) 116 (6): 445-53.

Boyer-Di Ponio J, Wright-Crosnier C, Groyer-Picard MT, Driancourt C, Beau I, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. Biological function of mutant forms of JAGGED1 proteins in Alagille syndrome: inhibitory effect on Notch signaling. *Hum. Mol. Genet.* (2007) 16 (22): 2683-92.

Chen L, Al-Awqati Q. Segmental expression of *Notch* and *Hairy* genes in nephrogenesis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* (2005) 288 (5): F939-52.

Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development.* (2007) 134 (4): 801-11.

Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N, Pierreux CE, Van der Smissen P, Dietz HC, Courtoy PJ, Rousseau GG, Lemaigre FP. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev.* (2005) 19 (16): 1849-54.

Cornell RA, Eisen JS. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* (2005) 16 (6): 663-72.

D'Angelo A, Bluteau O, Garcia-Gonzalez MA, Gresh L, Doyen A, Garbay S, Robine S, Pontoglio M. Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development* (2010) 137 (9): 1573-82.

Decaens T, Godard C, de Reynies A, Rickman DS, Tronche F, Couty JP, et al. Stabilization of betacatenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. *Hepatology* (2008) 47 (1): 247–58.

Dequéant ML, Pourquié O. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.* (2008) 9 (5): 370-82.

Dunwoodie SL. Reprint of mutation of the fucose-specific beta1,3 N-acetylglucosaminyltransferase LFNG results in abnormal formation of the spine. *Biochim. Biophys. Acta.* (2009) 1792 (9): 862-73.

Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC. Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the *Jagged1* gene. *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10 (2): 163-9.

El-Rassy I, Bou-Abdallah J, Al-Ghadban S, Bitar F, Nemer G. Absence of *NOTCH2* and *Hey2* mutations in a familial Alagille syndrome case with a novel frameshift mutation in *JAG1*. *Am. J. Med. Genet A.* (2008) 146 (7): 937-9.

Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, Krantz ID, Spinner NB, Piccoli DA. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology.* (1999) 29 (3): 822-9.

Geisler F, Nagl F, Mazur PK, Lee M, Zimber-Strobl U, Strobl LJ, Radtke F, Schmid RM, Siveke JT. Liver-specific inactivation of *Notch2*, but not *Notch1*, compromises intrahepatic bile duct development in mice. *Hepatology.* (2008) 48 (2): 607-16.

Giannakudis J, Röpke A, Kujat A, Krajewska-Walasek M, Hughes H, Fryns JP, Bankier A, Amor D, Schlicker M, Hansmann I. Parental mosaicism of *JAG1* mutations in families with Alagille syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* (2001) 9 (3): 209-16.

Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am. J. Pathol.* (1999) 154 (3): 785-94.

Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M. Identification of specific *BRCA1* and *BRCA2* variants by DHPLC. *Hum. Mutat.* (2000) 16 (4): 345-53.

Guarnaccia C, Dhir S, Pintar A, Pongor S. The tetralogy of Fallot-associated G274D mutation impairs folding of the second epidermal growth factor repeat in *Jagged1*. *FEBS J.* (2009) 276 (21): 6247-57.

Guegan K, Stals K, Day M, Turnpenny P, Ellard S. *JAG1* mutations are found in approximately one third of patients presenting with only one or two clinical features of Alagille syndrome. *Clinical Genetics* (2011). doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01749.x. Artículo en proceso de publicación.

Heritage ML, MacMillan JC, Anderson GJ. DHPLC mutation analysis of *Jagged1* (*JAG1*) reveals six novel mutations in Australian alagille syndrome patients. *Hum. Mutat.* (2002) 20 (6): 481.

High FA, Epstein JA. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat. Rev. Genet.* (2008) 9 (1): 49-61.

Hingorani M, Nischal KK, Davies A, Bentley C, Vivian A, Baker AJ, Mieli-Vergani G, Bird AC, Aclimandos WA. Ocular abnormalities in Alagille syndrome. *Ophthalmology.* (1999) 106 (2): 330-7.

Ho NC, Lacbawan F, Francomano CA, Ho V. Severe hypodontia and oral xanthomas in Alagille syndrome. *Am. J. Med. Genet.* (2000) 93 (3): 250-2.

Holla ØL, Nakken S, Mattingsdal M, Ranheim T, Berge KE, Defesche JC, Leren TP. Effects of intronic mutations in the LDLR gene on pre-mRNA splicing: Comparison of wet-lab and bioinformatics analyses. *Mol. Genet. Metab.* (2009) 96 (4): 245-52.

Jia J, Lin M, Zhang L, York JP, Zhang P. The Notch signaling pathway controls the size of the ocular lens by directly suppressing *p57Kip2* expression. *Mol. Cell. Biol.* (2007) 27 (20): 7236-47.

Jones EA, Clement-Jones M, Wilson DI. JAGGED1 expression in human embryos: correlation with the Alagille syndrome phenotype. *J. Med. Genet.* (2000) 37 (9): 658-62.

Kamath BM, Bason L, Piccoli DA, Krantz ID, Spinner NB. Consequences of *JAG1 mutations*. *J. Med. Genet.* (2003) 40 (12): 891-5.

Kamath BM, Loomes KM, Piccoli DA. Medical management of Alagille syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2010) 51(3): 319-21.

Kamath BM, Stolle C, Bason L, Colliton RP, Piccoli DA, Spinner NB, Krantz ID. Craniosynostosis in Alagille syndrome. *Am. J. Med. Genet.* (2002) 112 (2): 176-80.

Kamath BM, Schwarz KB, Hadzić N. Alagille syndrome and liver transplantation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2010) 50 (1): 11-5.

Kamath BM, Spinner NB, Emerick KM, Chudley AE, Booth C, Piccoli DA, Krantz ID. Vascular anomalies in Alagille syndrome: a significant cause of morbidity and mortality. *Circulation.* (2004) 109 (11): 1354-8.

Kiechle M, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Gerber WD, Albacht B, Fischer B, Schlegelberger B, Arnold N. Ten novel *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast and/or ovarian cancer families from northern Germany. *Hum. Mutat.* (2000) 16 (6): 529-30.

Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology.* (2004) 127 (6): 1775-86.

Komatsu H, Chao MY, Larkins-Ford J, Corkins ME, Somers GA, Tucey T, Dionne HM, White JQ, Wani K, Boxem M, Hart AC. OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol.* (2008) 6 (8): e196.

Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* (2009) 137 (2): 216-33.

Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* (2008) 3 (9): 1452-6.

Krantz ID, Colliton RP, Genin A, Rand EB, Li L, Piccoli DA, Spinner NB. Spectrum and frequency of *jagged1* (*JAG1*) mutations in Alagille syndrome patients and their families. *Am. J. Hum. Genet.* (1998) 62 (6): 1361-9.

Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. Alagille syndrome. *J. Med. Genet.* (1997) 34 (2): 152-7.

Kung AW, Xiao SM, Cherny S, Li GH, Gao Y, Tso G, Lau KS, Luk KD, Liu JM, Cui B, Zhang MJ, et al. Association of *JAG1* with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *Am. J. Hum. Genet.* (2010) 86 (2): 229-39.

Kunogi M, Kurihara M, Ikegami TS, Kobayashi T, Shindo N, Kumasaka T, Gunji Y, Kikkawa M, Iwakami S, Hino O, Takahashi K, Seyama K. Clinical and genetic spectrum of Birt-Hogg-Dube syndrome patients in whom pneumothorax and/or multiple lung cysts are the presenting feature. *J. Med. Genet.* (2010) 47 (4): 281-7.

Laufer-Cahana A, Krantz ID, Bason LD, Lu FM, Piccoli DA, Spinner NB. Alagille syndrome inherited from a phenotypically normal mother with a mosaic 20p microdeletion. *Am. J. Med. Genet.* (2002) 112 (2): 190-3.

Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* (2009) 417 (1): 15-27.

Lu F, Morrissette JJ, Spinner NB. Conditional *JAG1* mutation shows the developing heart is more sensitive than developing liver to *JAG1* dosage. *Am. J. Hum. Genet.* (2003) 72 (4): 1065-70.

Lykavieris P, Hadchouel M, Chardot C, Bernard O. Outcome of liver disease in children with Alagille syndrome: a study of 163 patients. *Gut*. (2001) 49 (3): 431-5.

McCright B, Lozier J, Gridley T. A mouse model of Alagille syndrome: *Notch2* as a genetic modifier of *Jag1* haploinsufficiency. *Development*. (2002) 129 (4): 1075-82.

McDaniel R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. *NOTCH2* mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am. J. Hum. Genet.* (2006) 79 (1): 169-73.

McElhinney DB, Krantz ID, Bason L, Piccoli DA, Emerick KM, Spinner NB, Goldmuntz E. Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a *JAG1* mutation and/or Alagille syndrome. *Circulation*. (2002) 106 (20): 2567-74.

Mozer-Glassberg Y, Hojsak I, Zevit N, Shapiro R, Shamir R. Pruritus responsive to naltrexone in a patient with cholestatic liver disease. *Isr. Med. Assoc. J.* (2011) 13 (2): 111-2.

Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* (1998) 23 (6): 198-9.

Narula P, Gifford J, Steggall MA, Lloyd C, Van Mourik ID, Mckiernan PJ, Willshaw HE, Kelly D. Visual loss and idiopathic intracranial hypertension in children with Alagille syndrome. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2006) 43 (3): 348-52.

Nischal KK, Hingorani M, Bentley CR, Vivian AJ, Bird AC, Baker AJ, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Aclimandos WA. Ocular ultrasound in Alagille syndrome: a new sign. *Ophthalmology*. (1997) 104 (1): 79-85.

Oda T, Elkahlon AG, Meltzer PS, Chandrasekharappa SC. Identification and cloning of the human homolog (*JAG1*) of the rat *Jagged1* gene from the Alagille syndrome critical region at 20p12. *Genomics*. (1997) 43 (3): 376-9.

Ogino H, Fisher M, Grainger RM. Convergence of a head-field selector Otx2 and Notch signaling: a mechanism for lens specification. *Development*. (2008) 135 (2): 249-58.

Onouchi Y, Kurahashi H, Tajiri H, Ida S, Okada S, Nakamura Y. Genetic alterations in the *JAG1* gene in Japanese patients with Alagille Syndrome. *J. Hum. Genet.* (1999) 44 (4): 235-9

Riesenberg AN, Liu Z, Kopan R, Brown NL. Rbpj cell autonomous regulation of retinal ganglion cell and cone photoreceptor fates in the mouse retina. *J. Neurosci.* (2009) 29 (41): 12865-77.

Rodríguez-Sotres R, Gaytán-Mondragón SA, Hernández-Domínguez EE, Valencia LG. Tridimensional structures predicted *in silico* from the amino acid sequence of proteins. How to know that the model is realistic? *Mensaje Bioquímico* (2011) XXXV: 143-156.

Röpke A, Kujat A, Gräber M, Giannakudis J, Hansmann I. Identification of 36 novel Jagged1 (*JAG1*) mutations in patients with Alagille Syndrome. *Hum. Mutat.* (2003) 21 (1): 100.

Rowan S, Conley KW, Le TT, Donner AL, Maas RL, Brown NL. Notch signaling regulates growth and differentiation in the mammalian lens. *Dev. Biol.* (2008) 321 (1): 111-22.

Saga Y, Takeda H. The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nat. Rev. Genet.* (2001) 2 (11): 835-45.

Saga Y. Segmental border is defined by the key transcription factor *Mesp2*, by means of the suppression of Notch activity. *Dev. Dyn.* (2007) 236 (6): 1450-5.

Samejima H, Torii C, Kosaki R, Kurosawa K, Yoshihashi H, Muroya K, Okamoto N, Watanabe Y, Kosho T, Kubota M, Matsuda O, Goto M, Izumi K, Takahashi T, Kosaki K. Screening for Alagille syndrome mutations in the *JAG1* and *NOTCH2* genes using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test.* 2007 11 (3): 216-27.

Sanderson E, Newman V, Haigh SF, Baker A, Sidhu PS. Vertebral anomalies in children with Alagille syndrome: an analysis of 50 consecutive patients. *Pediatr. Radiol.* (2002) 32 (2): 114-9.

Saravanamuthu SS, Gao CY, Zelenka PS. Notch signaling is required for lateral induction of *Jagged1* during FGF-induced lens fiber differentiation. *Dev. Biol.* (2009) 332 (1): 166-76.

Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* (2011) 12 (10): 683-91.

Scharrer U, Skrzypczak-Zielinska M, Wituszynska W, Mierzejewski M, Krause K, Cybulski C, Froster UG. A simple method of investigating mutations in *CHEK2* by DHPLC: a study of the German populations of Saxony, Saxony-Anhalt, and Thuringia. *Cancer Genet. Cytogenet.* (2010) 199 (1): 48-52.

Shapiro R, Anikster Y, Yardeni T, Korem S, Hartman K, Shamir R, Broide E, Levine A, Bujanover Y, Bercovich D. DHPLC screening for mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis patients. *J. Hum. Genet.* (2010) 55 (5): 308-13.

Shifley ET, Cole SE. The vertebrate segmentation clock and its role in skeletal birth defects. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007 Jun;81(2):121-33.

Shrivastava R, Williams A, Mikhail A, Roberts D, Richards M, Aithal V. An unusual cause of hypertension and renal failure: a case series of a family with Alagille syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2010) 25 (5): 1501-6.

Shiri-Sverdlov R, Oefner P, Green L, Baruch RG, Wagner T, Kruglikova A, Haitchick S, Hofstra RM, Papa MZ, Mulder I, Rizel S, Bar Sade RB, Dagan E, Abdeen Z, Goldman B, Friedman E. Mutational analyses of *BRCA1* and *BRCA2* in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jewish women with familial breast and ovarian cancer. *Hum. Mutat.* (2000) 16(6): 491-501.

Sieger D, Ackermann B, Winkler C, Tautz D, Gajewski M. *her1* and *her13.2* are jointly required for somitic border specification along the entire axis of the fish embryo. *Dev. Biol.* (2006) 293 (1): 242-51.

Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev. Cell.* (2010) 18 (2): 175-89.

Soumitra N, Meenakumari B, Parija T, Sridevi V, Nancy KN, Swaminathan R, Rajalekshmy KR, Majhi U, Rajkumar T. Molecular genetics analysis of hereditary breast and ovarian cancer patients in India. *Hered. Cancer Clin. Pract.* (2009) 7 (1): 13.

Sparks EE, Huppert KA, Brown MA, Washington MK, Huppert SS. Notch signaling regulates formation of the three-dimensional architecture of intrahepatic bile ducts in mice. *Hepatology.* (2010) 51 (4): 1391-400.

Spinner NB, Krantz ID, Kamath BM, Hutchinson AL. Alagille Syndrome. En: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2000 [actualizado 11 de Mayo 2010].

Stoller JZ, Epstein JA. Cardiac neural crest. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2005) 16 (6): 704-15.

Subramaniam P, Knisely A, Portmann B, Qureshi SA, Aclimandos WA, Karani JB, Baker AJ. Diagnosis of Alagille syndrome-25 years of experience at King's College Hospital. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2011) 52(1): 84-9.

Tchorz JS, Kinter J, Müller M, Tornillo L, Heim MH, Bettler B. Notch2 signaling promotes biliary epithelial cell fate specification and tubulogenesis during bile duct development in mice. *Hepatology.* (2009) 50 (3): 871-9.

Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. A Notch updated. *J. Cell Biol.* (2009) 184 (5): 621-9.

Tsai LP, Cheng CF, Hsieh JP, Teng MS, Lee HH. Application of the DHPLC method for mutational detection of the *CYP21A2* gene in congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Chim. Acta.* (2009) 410(1-2):48-53.

Tsai S, Gurakar A, Anders R, Lam-Himlin D, Boitnott J, Pawlik TM. Management of Large Hepatocellular Carcinoma in Adult Patients with Alagille Syndrome: A Case Report and Review of Literature. *Dig. Dis. Sci.* (2010) 55 (11): 3052-8.

Turnpenny PD, Alman B, Cornier AS, Giampietro PF, Offiah A, Tassy O, Pourquié O, Kusumi K, Dunwoodie S. Abnormal vertebral segmentation and the notch signaling pathway in man. *Dev Dyn.* (2007) 236 (6): 1456-74.

Turnpenny PD, Ellard S. Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur. J. Hum. Genet.* (2011) En proceso de publicación.

Wang W, Jiang J, Zhu Y, Li J, Jin C, Shentu X, Yao K. A novel mutation in the major intrinsic protein (MIP) associated with autosomal dominant congenital cataracts in a Chinese family. *Mol. Vis.* (2010) 16:534-9.

Warthen DM, Moore EC, Kamath BM, Morrissette JJ, Sanchez P, Piccoli DA, Krantz ID, Spinner NB. *Jagged1* (*JAG1*) mutations in Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate. *Hum. Mutat.* (2006) 27 (5): 436-43.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of *NOTCH1* in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. (2004) 306 (5694): 269-71.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mutat.* (2001) 17 (6): 439-74.

Yen HY, Ting MC, Maxson RE. *Jagged1* functions downstream of *Twist1* in the specification of the coronal suture and the formation of a boundary between osteogenic and non-osteogenic cells. *Dev. Biol.* (2010) 347 (2): 258-70.

Yucel H, Hoorntje SJ, Bravenboer B. Renal abnormalities in a family with Alagille syndrome. *Neth. J. Med.* (2010) 68 (1): 38-9.

Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. *Mol. Cell. Biol.* (2010) 30 (4): 886-96.

Zhang BR, Hu ZX, Yin XZ, Cai M, Zhao GH, Liu ZR, Luo W. Mutation analysis of parkin and *PINK1* genes in early-onset Parkinson's disease in China. *Neurosci. Lett.* (2010) 477 (1): 19-22.

Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, Stanger BZ. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*. (2009) 136 (10): 1727-39.

Zong Y, Stanger BZ. Molecular mechanisms of bile duct development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2011). 43 (2): 257-64.

BASES DE DATOS CONSULTADAS:

dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Ensembl (www.ensembl.org).

HGMD (www.hgmd.org).

LOVD (www.lovd.nl/).

mutDB (<http://mutdb.org/>)

Uniprot (www.uniprot.org).

SOFTWARE UTILIZADO:

Alamut: versión 2.0e (Interactive Biosoftware, Rouen, France).

GLIDERS: Lawrence R, Day-Williams AG, Mott R, Broxholme J, Cardon LR, Zeggini E. BMC Bioinformatics. (2009) 10: 367.

I-TASSER: Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat Protoc. (2010) 5(4):725-38.

SignalP 4.0: Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods (2011). 8 (10): 785-6.

Transeq: <http://oz.ifc.unam.mx/EMBOSS/transeq>.

VMD: Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. (1996) 14 (1): 33-8.

XVI. Anexos.

16.1. Metodología para clonación a partir de productos de PCR mediante el sistema pGEM®-T vector.

- Centrifugar brevemente los tubos que contengan el vector pGEM®-T y el inserto.
- Agregar las siguientes alícuotas en un tubo de 0.5 mL:
 - Buffer para ligación 2X 5.0µL
 - Vector pGEM®-T 1.0µL
 - Producto de PCR 4.1µL
 - DNA ligasa de T4 1.0µL
 - Agua desionizada c.b.p. 10.0µL
- Mezclar suavemente la reacción. Incubar durante una hora a temperatura ambiente.
- Preparar las cajas de petri con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.
- Centrifugar las reacciones de ligación brevemente y agregar 2 µL de cada reacción a un tubo de 1.5 mL en frío.
- Colocar las células competentes (JM109) en baño de hielo hasta que se descongelen y mezclarlas suavemente.
- Agregar 50 µL de las células competentes a los tubos de 1.5 mL con la reacción de ligación. Mezclar suavemente e incubar en hielo durante 20 minutos.
- Realizar un choque térmico por 45 a 50 segundos a 42°C y colocar rápidamente los tubos en hielo durante 2 minutos.
- Agregar 950 µL del medio SOC a temperatura ambiente. Incubar durante 1.5 horas a 37°C (mezclar a 150 rpm durante la incubación).
- Plaquear 100 µL de cada tubo por duplicado en el medio preparado (LB/ampicilina/IPTG/X-Gal).
- Incubar toda la noche a 37°C. Seleccionar las colonias blancas para extracción de DNA plasmídico y secuenciar con los oligonucleótidos correspondientes al fragmento de interés.

16.2. Reactivos.

- Solución de lisis para glóbulos rojos: cloruro de amonio, ácido etiléndiamino tetraacético y bicarbonato de sodio (Qiagen).
- Solución de lisis celular: Tris (hidroximetil) aminometano, ácido etilén diamino tetraacético (Qiagen).
- Solución para precipitar proteínas: acetato de amonio (Qiagen).
- Isopropanol de grado molecular.
- Etanol de grado molecular.
- Buffer TBE: Tris-boratos-EDTA (Qiagen).
- Bromuro de etidio. Mutágeno y cancerígeno. Se debe tener precaución de no tener contacto directo (vía respiratoria, oral, ocular y dérmica).
- Marcador de 50 y 100 pb: agua, glicerol y buffer de carga (Fermentas).
- Buffer de carga: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% azul de bromofenol, 0.03% cianol xileno, 60% glicerol, 60 mM EDTA (Fermentas).
- Los reactivos para la PCR (Invitrogen) se especifican en el procedimiento.
- Los reactivos para la reacción de secuenciación se especifican en el procedimiento. Se utilizó el kit para secuenciación Big Dye 3.1 Terminator (Applied Biosystems).
- Columnas para purificación (Centrisep).
- Polímero POP4 (Applied Biosystems).
- Formamida.
- Exosap-it (USB).

16.3. Equipos y otros materiales.

- Cámara para electroforesis (Deltech).
- Fuente de poder (Apparatus Corporation EC 105)
- Fotodocumentador (Kodak, Gel Logic 1500).
- Speed Vac (Thermo Savant ISS110).
- Termociclador (Techne, TC-412).
- Microcentrífuga (Eppendorf, 5415 C W/Rotor 14000 RPM).
- Sistema WAVE-MD para dHPLC (Transgenomic).
- Secuenciador ABI 301.

16.4. Tablas anexas.

Tabla A. Cálculo estadístico para obtener el tamaño de muestra de un estudio de casos y controles no relacionados. Resultados de la página OpenEpi, Versión 2, Open source calculator – SSCC (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSCC.html>).

Tamaño de la muestra para estudios de casos-controles no relacionados			
Para:	Nivel de confianza de dos lados (1-alpha)		95
	Potencia (% de probabilidad de detección)		99.99
	Razón de controles por caso		1
	Proporción hipotética de controles con exposición		0.001
	Proporción hipotética de casos con exposición:		90
	Odds Ratios menos extremas a ser detectadas		899991.00
	Kelsey	Fleiss	Fleiss con CC
Tamaño de la muestra - Casos	20	8	10
Tamaño de la muestra - Controles	20	8	10
Tamaño total de la muestra	40	16	20

Referencias

Kelsey y otros, Métodos en Epidemiología Observacional 2da Edición, Tabla 12-15
 Fleiss, Métodos Estadísticos para Relaciones y Proporciones, fórmulas 3.18&, 3.19

CC= corrección de continuidad

Los resultados se redondean por el entero más cercano

Tabla B. Distribución de Chi Cuadrado χ^2 . P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado; v = Grados de libertad (g.l.). Obtenido de http://www.cema.edu.ar/~rst/Simulacion_de_Sistemas/Teoria/tablachicuadrado.pdf

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7083	0,5707	0,4549
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8326	1,5970	1,3863
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9462	2,6430	2,3660
4	18,4662	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0446	3,6871	3,3567
5	20,5147	18,3854	16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1319	4,7278	4,3515
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2108	5,7652	5,3481
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834	7,8061	7,2832	6,8000	6,3458
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3505	7,8325	7,3441
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4136	8,8632	8,3428
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,4732	9,8922	9,3418
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5298	10,9199	10,3410
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,5838	11,9463	11,3403
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187	14,3451	13,6356	12,9717	12,3398
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,6853	13,9961	13,3393
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217	16,4940	15,7332	15,0197	14,3389
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,7795	16,0425	15,3385
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,8244	17,0646	16,3382
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014	19,6993	18,8679	18,0860	17,3379
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,9102	19,1069	18,3376
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,9514	20,1272	19,3374
21	46,7963	43,7749	41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,9915	21,1470	20,3372
22	48,2676	45,2041	42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	23,0307	22,1663	21,3370
23	49,7276	46,6231	44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1413	26,0184	25,0055	24,0689	23,1852	22,3369
24	51,1790	48,0336	45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,1064	24,2037	23,3367
25	52,6187	49,4351	46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,2825	30,6752	29,3388	28,1719	27,1183	26,1430	25,2218	24,3366
26	54,0511	50,8291	48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1730	27,1789	26,2395	25,3365
27	55,4751	52,2152	49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2266	28,2141	27,2569	26,3363
28	56,8918	53,5939	50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6205	31,3909	30,2791	29,2486	28,2740	27,3362
29	58,3006	54,9662	52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3308	30,2825	29,2908	28,3361

v/p	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9975	0,999
1	0,3573	0,2750	0,2059	0,1485	0,1015	0,0642	0,0358	0,0158	0,0039	0,0010	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000
2	1,1957	1,0217	0,8616	0,7133	0,5754	0,4463	0,3250	0,2107	0,1026	0,0506	0,0201	0,0100	0,0050	0,0020
3	2,1095	1,8692	1,6416	1,4237	1,2125	1,0052	0,7978	0,5844	0,3518	0,2158	0,1148	0,0717	0,0449	0,0243
4	3,0469	2,7528	2,4701	2,1947	1,9226	1,6488	1,3665	1,0636	0,7107	0,4844	0,2971	0,2070	0,1449	0,0908
5	3,9959	3,6555	3,3251	2,9999	2,6746	2,3425	1,9938	1,6103	1,1455	0,8312	0,5543	0,4118	0,3075	0,2102
6	4,9519	4,5702	4,1973	3,8276	3,4546	3,0701	2,6613	2,2041	1,6354	1,2373	0,8721	0,6757	0,5266	0,3810
7	5,9125	5,4932	5,0816	4,6713	4,2549	3,8223	3,3583	2,8331	2,1673	1,6899	1,2390	0,9893	0,7945	0,5985
8	6,8766	6,4226	5,9753	5,5274	5,0706	4,5936	4,0782	3,4895	2,7326	2,1797	1,6465	1,3444	1,1042	0,8571
9	7,8434	7,3570	6,8763	6,3933	5,8988	5,3801	4,8165	4,1682	3,3251	2,7004	2,0879	1,7349	1,4501	1,1519
10	8,8124	8,2955	7,7832	7,2672	6,7372	6,1791	5,5701	4,8652	3,9403	3,2470	2,5582	2,1558	1,8274	1,4787
11	9,7831	9,2373	8,6952	8,1479	7,5841	6,9887	6,3364	5,5778	4,5748	3,8157	3,0535	2,6032	2,2321	1,8338
12	10,7553	10,1820	9,6115	9,0343	8,4384	7,8073	7,1138	6,3038	5,2260	4,4038	3,5706	3,0738	2,6612	2,2141
13	11,7288	11,1291	10,5315	9,9257	9,2991	8,6339	7,9008	7,0415	5,8919	5,0087	4,1069	3,5650	3,1118	2,6172
14	12,7034	12,0785	11,4548	10,8215	10,1653	9,4673	8,6963	7,7895	6,5706	5,6287	4,6604	4,0747	3,5820	3,0407
15	13,6790	13,0298	12,3809	11,7212	11,0365	10,3070	9,4993	8,5468	7,2609	6,2621	5,2294	4,6009	4,0697	3,4825
16	14,6555	13,9827	13,3096	12,6243	11,9122	11,1521	10,3090	9,3122	7,9616	6,9077	5,8122	5,1422	4,5734	3,9417
17	15,6328	14,9373	14,2406	13,5307	12,7919	12,0023	11,1249	10,0852	8,6718	7,5642	6,4077	5,6973	5,0916	4,4162
18	16,6108	15,8932	15,1738	14,4399	13,6753	12,8570	11,9462	10,8649	9,3904	8,2307	7,0149	6,2648	5,6234	4,9048
19	17,5894	16,8504	16,1089	15,3517	14,5620	13,7158	12,7727	11,6509	10,1170	8,9065	7,6327	6,8439	6,1673	5,4067
20	18,5687	17,8088	17,0458	16,2659	15,4518	14,5784	13,6039	12,4426	10,8508	9,5908	8,2604	7,4338	6,7228	5,9210
21	19,5485	18,7683	17,9843	17,1823	16,3444	15,4446	14,4393	13,2396	11,5913	10,2829	8,8972	8,0336	7,2889	6,4467
22	20,5288	19,7288	18,9243	18,1007	17,2396	16,3140	15,2787	14,0415	12,3380	10,9823	9,5425	8,6427	7,8648	6,9829
23	21,5095	20,6902	19,8657	19,0211	18,1373	17,1865	16,1219	14,8480	13,0905	11,6885	10,1957	9,2604	8,4503	7,5291
24	22,4908	21,6525	20,8084	19,9432	19,0373	18,0618	16,9686	15,6587	13,8484	12,4011	10,8563	9,8862	9,0441	8,0847
25	23,4724	22,6156	21,7524	20,8670	19,9393	18,9397	17,8184	16,4734	14,6114	13,1197	11,5240	10,5196	9,6462	8,6494
26	24,4544	23,5794	22,6975	21,7924	20,8434	19,8202	18,6714	17,2919	15,3792	13,8439	12,1982	11,1602	10,2561	9,2222
27	25,4367	24,5440	23,6437	22,7192	21,7494	20,7030	19,5272	18,1139	16,1514	14,5734	12,8785	11,9077	10,8733	9,8029
28	26,4195	25,5092	24,5909	23,6475	22,6572	21,5880	20,3857	18,9392	16,9279	15,3079	13,5647	12,4613	11,4973	10,3907
29	27,4025	26,4751	25,5391	24,5770	23,5666	22,4751	21,2468	19,7677	17,7084	16,0471	14,2564	13,1211	12,1278	10,9861

16.5. Carta de consentimiento informado.



Hoja 1 de 4

HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *JAG1* POR TÉCNICA DE DHPLC EN PACIENTES CON SÍNDROME DE ALAGILLE

INVESTIGADORES RESPONSABLES:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso
Investigador Principal
Departamento de Genética

Dra. Solange Heller Rouassant
Investigador Suplente
Departamento de Gastroenterología

Estimado paciente o tutor:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, el cual es una investigación que pretende conocer y entender mejor porque se presenta la enfermedad que tiene su hijo. Esta investigación estudia las características y los cambios que pudiera haber en el material hereditario que contiene la información para un desarrollo adecuado, y que al haber cambios puedan estos causar alteraciones en este desarrollo. Por ello esta investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en un futuro.

Queremos que usted sepa que participar en esta investigación es totalmente voluntario y que usted puede decidir no participar en el estudio y en este caso, no se afectaría ninguna prestación a la que tiene derecho.

Si ustedes están de acuerdo en participar y dependiendo de la edad y condiciones de su hijo, además de explicarles a ustedes las características del estudio podemos también explicarle a él o a ella, las características del estudio y solicitar también su consentimiento.

En los párrafos siguientes se describe el estudio.

FINALIDAD DEL ESTUDIO: Su hijo tiene una alteración del desarrollo que aparece como una enfermedad del hígado presente desde el nacimiento (congénita), el tipo de alteración que tiene su hijo considerando las manifestaciones clínicas es de Síndrome de Alagille. Se sospecha que estas enfermedades tienen varias causas y una de ellas tiene que ver con alteraciones en el material hereditario, este material contiene la información para desarrollarnos. A la manera en que esta arreglada la información de todas las personas se le llama gen y en el caso de las enfermedades mencionadas se piensa que un gen llamado *JAG1* podría estar alterado o con cambios y esto haría que se presentara la enfermedad. El propósito de este estudio es buscar los posibles cambios en el material genético de su hijo y saber si este gen está alterado, lo que nos ayudará a confirmar o a descartar el diagnóstico.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

Para este estudio, necesitamos tomarle a su hijo, una muestra de sangre, mediante el siguiente procedimiento:



INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, AFILIADA A LA UNAM
Dr. Márquez 162, Col. Doctores, c.p. 06720, México, D. F.
Teléfono: 52 28 99 17 www.himfg.edu.mx



1.- Con una jeringa desechable se le tomará a su hijo una muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente 1 a 3ml. Esta muestra será usada para el análisis de la molécula que contiene nuestros genes y se llama ADN, el análisis será a través de un tipo especial de ADN que se llama cDNA y ADN como tal. Una parte de esta muestra será usada para la realización del estudio de cariotipo.

2.- En caso de contar con tejido de biopsia en parafina se extraerá de aquí el ADN y se tomaría una muestra de sangre de 1ml para estudio de cariotipo.

Queremos que sepa, que no daremos a conocer ninguna información acerca de usted ni de su familia que los pueda identificar, debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación y esta sí se publicará en revistas científicas.

BENEFICIOS: Se les dará a ustedes asesoramiento genético con toda la información que llegue a integrarse. Su colaboración permitirá obtener conocimiento que tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.

RIESGOS Y MOLESTIAS: Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio por donde se le extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

COSTOS: Tanto la extracción de muestras de sangre como las pruebas y cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación, así como los resultados no tendrán ningún costo para usted.

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá usted comunicarse con los médicos del departamento de gastroenterología o genética o con el investigador principal, Dra. Verónica Morán al teléfono 52 28 99 17 ext. 1495 o al teléfono celular 04455 3075 6732. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte de los investigadores relacionados, puede usted dirigirse a la Dirección de Investigación a la ext. 1482.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlos y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio

México, DF, a _____ de _____ de _____

NOMBRE DEL PACIENTE _____

Firma (Cuando sea posible): _____

NOMBRE Y FIRMA DE LA MADRE

NOMBRE Y FIRMA DEL PADRE

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO 1

Parentesco con el paciente

Dirección

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO 2

Parentesco con el paciente

Dirección



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA AUTORIZAR LA
CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE DNA

Estimado paciente o tutor:

Nos dirigimos respetuosamente a Usted en relación a la muestra que Usted o su hijo aceptaron proporcionar para participar en el protocolo: "Búsqueda y caracterización de mutaciones en el gen *JAG1* por técnica de dHPLC en pacientes con síndrome de Alagille", del cual el investigador responsable es la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso del Departamento de Genética.

En relación a la muestra donada, es posible que una vez que la muestra de ADN o ARN haya sido analizada, podría quedar un remanente o sobrante de la misma ya que podría ser que no se hubiese ocupado todo el ADN o ARN extraído en los diferentes procesos de análisis del protocolo mencionado. Sobre este remanente queremos preguntarle si estaría Usted de acuerdo en que se conservara, la razón para conservarlo sería la posibilidad de que pudiese, en un futuro, ocuparse esta muestra para el análisis de otros genes que se conociesen ahora o que se identifiquen posteriormente y que pudiesen tener relación con la enfermedad que ahora estamos estudiando.

De aceptar Usted, estas muestras quedarían a resguardo en el Departamento de Genética, serían utilizadas únicamente en protocolos autorizados por los Comités Institucionales de Investigación, Ética y de Bioseguridad. También el investigador responsable se compromete comunicarse con Ustedes para avisarles de la inclusión de esta muestra en el nuevo protocolo y a comunicarles los resultados obtenidos una vez que se completase el nuevo estudio.

Los beneficios de participar sería el contribuir al conocimiento científico general para entender mejor los orígenes de las diferentes enfermedades y que podrían beneficiar a su vez a otros pacientes en un futuro. El análisis de las muestras no tendría ningún costo extra.

De no aceptar participar, las muestras una vez analizadas para el protocolo original, serían destruidas.

Tanto el que Usted acepte autorizar o no la conservación de las muestras, no afectará ninguna prestación a la que Usted o su hijo tengan derecho.

Cualquier duda o pregunta al respecto, podrá Usted dirigirla a la Dra. Verónica Morán del Departamento de Genética al tel. 52 28 99 17, ext 1495, o al cel 04455 3075 6732 o a la Dirección de Investigación ext. 1482.

De estar de acuerdo en que se conserven las muestras de ADN o ARN, le pedimos que firme este documento.

México, DF, a _____ de _____ de _____

NOMBRE DEL PACIENTE _____

Firma (Cuando sea posible): _____



INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, AFILIADA A LA UNAM
Dr. Márquez 162, Col. Doctores, c.p. 06720, México, D. F.
Teléfono: 52 28 99 17 www.himfg.edu.mx



NOMBRE Y FIRMA DE LA MADRE

NOMBRE Y FIRMA DEL PADRE

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO 1

Parentesco con el paciente
Dirección

NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO 2

Parentesco con el paciente
Dirección

