

11216 32ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE POSTGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CMN SIGLO XXI  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA

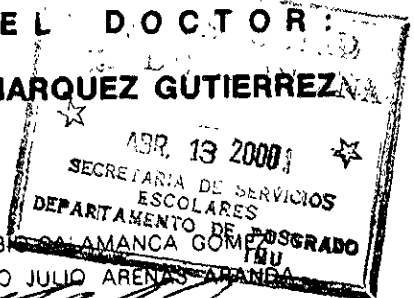
## ESTUDIO GENETICO DEL GEN AFECTADO EN ATAXIA TELANGIECTASIA. DETECCION DE HETEROCIGOTOS Y ASESORAMIENTO GENETICO

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN GENETICA MEDICA

PRESENTA EL DOCTOR MIGUEL ARTURO MARQUEZ GUTIERREZ

2783211



I. S. S. C. M. T. H. HOSPITAL DE PEDIATRIA JUL. 12 1999 DEPTO. DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

TUTOR: DOCTOR FABIAN CALAMANCA GOMEZ  
COTUTOR: DOCTOR DIEGO JULIO ARENAS ARANBA

*[Handwritten signature]*

FEBRERO 1999

SECRETARIA DE SERVICIOS ESCOLARES



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**A MI ESPOSA ANA RUTH Y A MIS HIJAS MARIA AMANDA Y CLARA DE ASIS QUIENES LLENAN MI VIDA DE ALEGRIA Y ME ALIENTAN PARA LA SUPERACION PROFESIONAL.**

**A MIS PADRES Y HERMANOS POR EL APOYO MORAL Y ECONOMICO QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO.**

**A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS QUIENES TIENEN MI ADMIRACION Y AGRADECIMIENTO POR SIEMPRE.**

## INDICE

	Página
1.Resumen-----	1
2.Antecedentes-----	3
3.Planteamiento del problema-----	9
4.Hipótesis-----	9
5.Justificación-----	10
6.Objetivos Generales-----	10
7.Objetivos Particulares-----	10
8.Métodos-----	11
8.1 Obtención de la muestra-----	11
8.2 Aislamiento del DNA Genómico-----	11
8.3 Electroforesis en geles de agarosa al 1%-----	13
8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%-----	14
8.5 Amplificación del DNA por PCR-----	15
9. Resultados-----	17
10. Discusión-----	30
11. Bibliografía-----	31
12. Anexo-----	37

## 1. RESUMEN

La Ataxia Telangiectasia es una entidad genética con patrón de herencia autosómico recesivo, es considerada uno de los síndromes de inestabilidad cromosómica; se caracteriza por ataxia cerebelar progresiva, inmunodeficiencia celular y humoral, telangiectasias oculocutáneas e hipersensibilidad a la radiación ionizante con tendencia al cáncer en al menos un tercio de los afectados, leucemias y linfomas a edad temprana y tumores sólidos a mayor edad.

Tiene una frecuencia de afectados estimada de 1 en 30 a 100 mil nacidos vivos. La frecuencia de heterocigotos es de 0.5%, en ellos se observa también hipersensibilidad a la radiación ionizante y tendencia a presentar neoplasias como cáncer de mama, neuroblastomas y gliomas.

La proteína codificada por el gen ATM (Ataxia, Telangiectasia, Mutado), responsable de la entidad cuando está mutado, tiene función cinasa y participa en el control del ciclo celular al parecer como sensor para la reparación de los rompimientos de doble cadena del DNA inducidos por radiación ionizante y radicales libres de oxígeno. También participa en la reparación de los rompimientos que pueden surgir durante el procesamiento de genes para inmunoglobulinas y para receptores de linfocitos T así como en recombinación meiótica.

El propósito del estudio es identificar portadores del gen afectado en familias de la población mexicana para realizar un asesoramiento genético más adecuado, encaminado hacia la prevención de una excesiva exposición a agentes mutagénicos como la radiación ionizante que precipitaría en ellos la aparición de neoplasias, así como hacia un seguimiento que permita la detección temprana y oportuna de las mismas.

Para definir el estado de portador en los familiares de pacientes con ataxia telangiectasia se utilizaron dos marcadores de tipo VNTR altamente polimórficos (uno intragénico, localizado en un intrón y el otro a sólo un centimorgan del extremo 3' del gen). Los fragmentos génicos fueron amplificados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de DNA genómico y sometidos a electroforesis en geles de acrilamida para definir el tamaño de los fragmentos.

Se estudiaron cuatro familias con al menos un afectado y de siete heterocigotos probables se definió el estado de portador en dos, el de no portador en cuatro y en uno no fue posible hacerlo con estos dos marcadores.

Los marcadores de tipo VNTR utilizados en el presente estudio permiten definir con alta precisión el estado de heterocigocidad en los familiares de pacientes con Ataxia Telangiectasia.

## 2. ANTECEDENTES

La Ataxia-Telangiectasia (AT) es una entidad genética con patrón de herencia autosómico recesivo, es considerada uno de los síndromes de inestabilidad cromosómica. Se caracteriza por: ataxia temprana y progresiva, inmunodeficiencia celular y humoral, telangiectasias oculocutáneas, sensibilidad a la radiación ionizante y riesgo de presentar neoplasias en homocigotos y heterocigotos.<sup>1-3</sup>

Muestra efecto pleiotrópico y expresividad variable, existen formas clínicas de menor severidad o de inicio tardío. Tiene una frecuencia estimada de homocigotos de 1 en 30 a 100 mil nacidos vivos.<sup>1,4,5</sup>

Las primeras manifestaciones de la enfermedad pueden aparecer entre el primer y quinto años de vida y lo hacen indistintamente de manera progresiva; presentan ataxia truncal y posteriormente de extremidades, apraxia oculomotora, facies inexpresiva, disartria, distonía y córeoatetosis; alrededor de los ocho años de edad presentan disminución de los reflejos osteotendinosos profundos y de la sensibilidad de fibras gruesas; hacia los 10 años de edad los pacientes están confinados a una silla de ruedas para prevenir serias caídas. Después de los 20 años de edad desarrollan atrofia muscular espinal progresiva afectando principalmente manos y pies con contracturas de los dedos en flexión y en extensión. No presentan retraso

mental, sin embargo en pacientes de mayor edad se observa pérdida de la memoria reciente. Tienen una sobrevida corta, frecuentemente mueren durante la segunda década de vida.<sup>1,7</sup>

Las telangiectasias son de forma linear y aparecen de los 2 a los 10 años de edad, sobre la conjuntiva bulbar, párpados, puente nasal, mejillas, pabellones auriculares y menos frecuentemente sobre las fosas antecubital y poplíteas; se ha observado cabello gris entremezclado con el normal en niños pequeños afectados, especialmente si son de cabello obscuro, así como hipertriosis en un 10% de los casos.<sup>1</sup>

Manifiestan en grado variable inmunodeficiencia celular (anergia, lento rechazo al injerto) y humoral (ausencia o disminución de los niveles de IgG2, IgA e IgE); se observa hipoplasia del timo por diferenciación anormal del tejido linfóide. Existe alteración en los receptores de linfocitos T.<sup>8,9</sup>

Se ha reportado Diabetes Mellitus observándose disminución en número y afinidad de receptores para la insulina y se han detectado anticuerpos antireceptor para esta hormona.<sup>10,11</sup>

Se observan niveles altos de antígeno carcinoembrionario, cirrosis e hipoplasia del hígado con niveles altos de alfa-fetoproteína (AFP) en 95% de los pacientes. Aunque la relación precisa no se conoce, se sugiere alteración en el receptor de AFP.<sup>1,12</sup>



Un tercio de los pacientes con AT desarrollan alguna neoplasia durante su vida, el 80% son linforreticulares, la más frecuente es el Linfoma de Células B, le sigue la Leucemia Linfocítica Crónica de células T; el 20% restante incluye los tumores sólidos y se presentan en pacientes de mayor edad.<sup>13,14</sup>

Los pacientes presentan hipogonadismo y esterilidad; se ha observado una sinapsis cromosómica anormal y subsecuente fragmentación, deteniéndose la meiosis en cigoteno y paquiteno de la profase I. En cultivos de linfocitos se ha observado aberrante segregación cromosómica.<sup>18,24</sup>

Los linfocitos AT presentan blastogénesis defectuosa con resistencia a la dosis normal de fitohemaglutinina por defecto en la señalización de citoplasma a núcleo, requiriendo doble dosis de la misma y 72 horas en cultivo; en 10 a 15% de las metafases se observan acortamientos teloméricos, inestabilidad cromosómica y un alto índice de mutaciones somáticas con rompimientos y rearrreglos cromosómicos, produciendo translocaciones e inversiones de los cromosomas 2, 7, 14 y 22, principalmente. Los sitios de rompimiento corresponden a los loci donde se localizan genes miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas y genes que codifican para receptores de células T.<sup>1,15-17</sup>

El gen responsable de la enfermedad es el gen ATM (Ataxia, Telangiectasia, Mutado) localizado en 11q22-q23,<sup>20-22</sup> abarca 150 kilobases de DNA genómico, codifica un transcrito de 13 kilobases con 66 exones, tiene un

marco de lectura abierto de 9168 nucleótidos con empalme alternativo en el extremo 3'. El transcrito codifica una proteína con actividad de cinasa, que consta de 3056 aminoácidos, con un peso molecular de 350 kilodaltones, localizada en el núcleo y citoplasma. Se ha detectado mRNA del gen ATM en todos los tejidos hasta ahora analizados. <sup>2,19,46</sup>

La función putativa del producto del gen ATM es la de interactuar como sensor de los rompimientos de doble cadena del DNA, activando mediante fosforilación a productos génicos que participan en la cascada de reparación. Los dobles rompimientos del DNA pueden surgir en el procesamiento de genes para inmunoglobulinas y receptores de células T, en recombinación meiótica y mitótica, en daño oxidativo por radicales libres de oxígeno y posterior a exposición a radiación ionizante o a radiomiméticos. <sup>23,26,27</sup>

En células AT se ha observado estrés oxidativo crónico con daño a macromoléculas como DNA, proteínas y lípidos; el neurotransmisor óxido nítrico producido en grandes cantidades alrededor de las células de Purkinje explicaría la degeneración e hipoplasia del vermis cerebelar que se ha observado en estudios postmórtem. <sup>7,25,34,35</sup>

Se sugiere que ATM interviene en la perpetuación telomérica. Los fibroblastos AT muestran senescencia posterior a un número limitado de ciclos celulares, así como fusión y acortamiento teloméricos con actividad

telomerasa normal, provocando la formación de anillos y cromosomas dicéntricos.<sup>28,29</sup>

Se ha observado inducción deficiente de p53 posterior a radiación ionizante en fibroblastos AT, progresando el ciclo celular a pesar del daño al DNA. Durante la replicación la proteína RPA (proteína A de la replicación) también llamada hSSB (proteína de unión a la hebra sencilla de DNA) mantiene separadas ambas cadenas de DNA, normalmente ATM fosforila a la subunidad P34 de RPA deteniendo la replicación en caso de daño al genoma (ver fig. 1). En células de pacientes AT se observa una lenta fosforilación de dicha subunidad ocasionando una síntesis de DNA radiorresistente<sup>30-33</sup>.

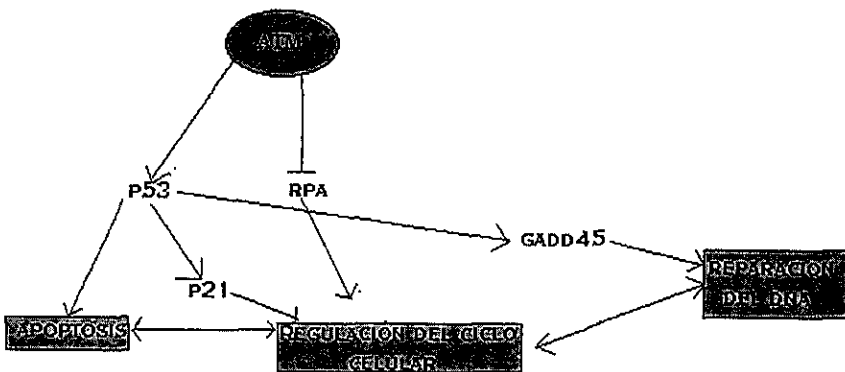


Figura 1: Función de la proteína ATM en la reparación de los rompimientos de ambas cadenas del DNA ocasionado por agentes genotóxicos y durante el procesamiento de genes de Ig y de receptores de linfocitos T. Las flechas indican inducción, mientras que la línea truncada indica inhibición. ATM=proteína del gen mutado en ataxia telangiectasia, p21= proteína inducida por p53 y que inhibe la progresión del ciclo celular, GADD45=producto del gen GADD45 asociado a reparación del DNA, RPA= proteína A de la replicación.

El estudio molecular del gen ATM en pacientes con ataxia telangiectasia ha revelado que la gran mayoría de ellos son heterocigotos compuestos, esto es, ambos genes anormales tienen mutaciones diferentes (lo que explicaría la expresión variable en la entidad), además el 75% de ellas crean un codón de terminación prematuro que rompe el marco de lectura del transcrito del gen, originando una proteína truncada.<sup>36-38</sup>

Se ha observado pérdida de heterocigocidad de la región 11q22-23 en el 47% de los tumores primarios de mama y de pulmón, lo que sugiere al gen ATM como un probable gen tumor supresor.<sup>39-41</sup>

El diagnóstico de la enfermedad antes de la aparición de las telangiectasias resulta difícil; en pacientes con sospecha de la enfermedad el estudio de gabinete más adecuado es la Resonancia Magnética, ya que la Tomografía Axial Computada podría causar mutaciones somáticas que condicionarían la aparición de neoplasias.<sup>1,42</sup>

La frecuencia de heterocigotos es alta (0.5%), el riesgo de cáncer en ellos es mayor que en los no portadores, siendo de 2.3 para el varón y de 3.9 para la mujer. Las neoplasias más frecuentemente asociadas en portadores son cáncer de mama, neuroblastomas y gliomas.<sup>30</sup> Los estudios radiológicos como mamografías, así como las dosis convencionales utilizadas en radioterapia, podrían ocasionar daños variables en el genoma de los heterocigotos y acelerar el desarrollo de neoplasias.<sup>6,14</sup>

Las diversas pruebas disponibles para detectar heterocigotos como la prueba de micronúcleos en células exfoliativas de mucosa oral y los ensayos de radiación en linfocitos y fibroblastos, no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad.<sup>39,40</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos hasta ahora empleados para la detección de heterocigotos no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad.

Debido a que los heterocigotos presentan un alto riesgo de desarrollar neoplasias respecto a la población no afectada, es necesario identificarlos para en forma oportuna detectar posibles neoplasias y para prevenir en ellos una excesiva exposición a la radiación ionizante que precipitaría en ellos la aparición de las mismas.

Las técnicas moleculares para identificar heterocigotos en Ataxia Telangiectasia no han sido aun aplicadas en familias de la población mexicana.

### 4. HIPOTESIS

La aplicación de diversas metodologías moleculares como el uso de marcadores altamente polimórficos (VNTR) dentro y fuera del gen ATM permite identificar heterocigotos en más del 80% de los probables heterocigotos.

Las diversas pruebas disponibles para detectar heterocigotos como la prueba de micronúcleos en células exfoliativas de mucosa oral y los ensayos de radiación en linfocitos y fibroblastos, no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad.<sup>39,40</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos hasta ahora empleados para la detección de heterocigotos no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad.

Debido a que los heterocigotos presentan un alto riesgo de desarrollar neoplasias respecto a la población no afectada, es necesario identificarlos para en forma oportuna detectar posibles neoplasias y para prevenir en ellos una excesiva exposición a la radiación ionizante que precipitaría en ellos la aparición de las mismas.

Las técnicas moleculares para identificar heterocigotos en Ataxia Telangiectasia no han sido aun aplicadas en familias de la población mexicana.

### 4. HIPOTESIS

La aplicación de diversas metodologías moleculares como el uso de marcadores altamente polimórficos (VNTR) dentro y fuera del gen ATM permite identificar heterocigotos en más del 80% de los probables heterocigotos.

Las diversas pruebas disponibles para detectar heterocigotos como la prueba de micronúcleos en células exfoliativas de mucosa oral y los ensayos de radiación en linfocitos y fibroblastos, no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad.<sup>39,40</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos hasta ahora empleados para la detección de heterocigotos no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad.

Debido a que los heterocigotos presentan un alto riesgo de desarrollar neoplasias respecto a la población no afectada, es necesario identificarlos para en forma oportuna detectar posibles neoplasias y para prevenir en ellos una excesiva exposición a la radiación ionizante que precipitaría en ellos la aparición de las mismas.

Las técnicas moleculares para identificar heterocigotos en Ataxia Telangiectasia no han sido aun aplicadas en familias de la población mexicana.

### 4. HIPOTESIS

La aplicación de diversas metodologías moleculares como el uso de marcadores altamente polimórficos (VNTR) dentro y fuera del gen ATM permite identificar heterocigotos en más del 80% de los probables heterocigotos.

## 5. JUSTIFICACION

La definición de heterocigocidad para esta enfermedad es de suma importancia para prevenir serios efectos posteriores a la radiación. Dado que las técnicas hasta ahora empleadas para la detección de portadores no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad, es necesario recurrir al diagnóstico molecular con marcadores genéticos altamente polimórficos en los familiares de pacientes con ataxia telangiectasia, lo que permitirá realizar un adecuado asesoramiento genético a los heterocigotos.

## 6. OBJETIVOS GENERALES

Identificar heterocigotos mediante el uso de marcadores de tipo VNTR en los familiares de primer grado de los pacientes estudiados.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES

Diagnosticar desde el punto de vista clínico a pacientes afectados por AT.

Identificar mediante los marcadores D11S2179, y D11S1778 a los heterocigotos en las familias estudiadas.

Proporcionar asesoramiento genético a las familias estudiadas y seguimiento a los heterocigotos identificados.



## 5. JUSTIFICACION

La definición de heterocigocidad para esta enfermedad es de suma importancia para prevenir serios efectos posteriores a la radiación. Dado que las técnicas hasta ahora empleadas para la detección de portadores no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad, es necesario recurrir al diagnóstico molecular con marcadores genéticos altamente polimórficos en los familiares de pacientes con ataxia telangiectasia, lo que permitirá realizar un adecuado asesoramiento genético a los heterocigotos.

## 6. OBJETIVOS GENERALES

Identificar heterocigotos mediante el uso de marcadores de tipo VNTR en los familiares de primer grado de los pacientes estudiados.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES

Diagnosticar desde el punto de vista clínico a pacientes afectados por AT.

Identificar mediante los marcadores D11S2179, y D11S1778 a los heterocigotos en las familias estudiadas.

Proporcionar asesoramiento genético a las familias estudiadas y seguimiento a los heterocigotos identificados.

## **5. JUSTIFICACION**

La definición de heterocigocidad para esta enfermedad es de suma importancia para prevenir serios efectos posteriores a la radiación. Dado que las técnicas hasta ahora empleadas para la detección de portadores no precisan con exactitud la condición de heterocigocidad, es necesario recurrir al diagnóstico molecular con marcadores genéticos altamente polimórficos en los familiares de pacientes con ataxia telangiectasia, lo que permitirá realizar un adecuado asesoramiento genético a los heterocigotos.

## **6. OBJETIVOS GENERALES**

Identificar heterocigotos mediante el uso de marcadores de tipo VNTR en los familiares de primer grado de los pacientes estudiados.

## **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

Diagnosticar desde el punto de vista clínico a pacientes afectados por AT.

Identificar mediante los marcadores D11S2179, y D11S1778 a los heterocigotos en las familias estudiadas.

Proporcionar asesoramiento genético a las familias estudiadas y seguimiento a los heterocigotos identificados.

## 8. METODOS

### 8.1 Obtención de la Muestra.

Bajo previo consentimiento de los padres (firma de carta de consentimiento descrita en anexo 1), se obtuvieron de 5-6 mililitros de sangre periférica del caso índice, sus padres y hermanos pertenecientes a 4 familias mexicanas con al menos un hijo afectado con Ataxia-Telangiectasia, diagnosticadas en CMN Siglo XXI y La Raza, IMSS. Los padres y abuelos de cada familia analizada son mexicanos por nacimiento.

### 8.2 Aislamiento del DNA Genómico Humano.

Mediante el método descrito en 1992 por Kempter <sup>43</sup> se obtuvo DNA genómico, a partir de sangre periférica de los miembros de las cuatro familias analizadas.

A 6 ml de sangre periférica se agregaron 1.25ml de EDTA al 0.5% (pH 7.6) como anticoagulante, se dividió la muestra en dos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, a partir de aquí las muestras se trabajaron de manera independiente y en forma idéntica. Se tomó con una pipeta Pasteur la capa de leucocitos (capa blanca) de la superficie del paquete (interfase), sin importar que hubiera eritrocitos contaminantes, esta fase se pasó a un tubo limpio y esterilizado (Corex o Falcon), se agregaron a cada tubo de 30 a 40 ml del amortiguador para lisis de eritrocitos RCLB (Tris-HCl 10mM pH 7.6, cloruro de magnesio 5mM y cloruro de sodio 10mM); el

tubo se cubrió con parafilm, se agitó fuertemente y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla de leucocitos, se repitió este paso 2 veces o hasta tener una pastilla de leucocitos blanca.

Se resuspendió la pastilla de leucocitos en 886  $\mu$ l de NaCl 5mM, se agitó fuertemente con pipeta Gilson y la muestra se pasó a un tubo eppendorff esterilizado. Se agregaron a la muestra 46  $\mu$ l de SDS al 10% y 308  $\mu$ l de NaCl saturado, agitando fuertemente en cada paso con el fin de lisar las células. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos para remover las proteínas precipitadas en la solución, se tomó el sobrenadante y se pasó a 2 tubos Eppendorff, se le realizaron dos extracciones fenólicas (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1). El DNA, presente en la fase acuosa, se precipitó con 1 volumen de isopropanol a 4°C; tras centrifugar a 10000 rpm 10 minutos y decantar el sobrenadante se obtuvo la pastilla de DNA que se lavó con etanol al 70% en 2 ocasiones, la pastilla de DNA se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 500  $\mu$ l de agua desionizada esterilizada. Se separó en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Para determinar la concentración y el grado de pureza del DNA se resuspendieron 4  $\mu$ l del DNA en 400  $\mu$ l de agua destilada en una celdilla de cuarzo y se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 260 y 280 nanómetros. Considerando que una densidad óptica de DNA bicatenario es

igual a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se calculó la concentración del DNA de cada individuo. Para establecer el grado de pureza de la solución de DNA se determinó el cociente 260/280.

### **8.3 Electroforesis en geles de agarosa al 1%.<sup>47</sup>**

Para estimar la integridad del DNA aislado, así como de los productos amplificados por PCR, se preparó un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X (Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM y EDTA). La solución se disolvió mediante calentamiento en horno de microondas por un minuto y se dejó enfriar en baño María hasta que las burbujas salieran de la solución. A esta solución de agarosa se le agregaron 2.5 $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (a una concentración de 1mg/ml) y fue vertida en un carro de cámara de electroforesis, colocándose uno o dos peines para tener 10 ó 20 pozos. El gel se mantuvo 30 minutos a 4° C hasta solidificar, se retiraron los peines cuidadosamente y se colocó el carro en la cámara de electroforesis con 300 mililitros de buffer TBE 1X. De cada alícuota de DNA se mezcló un microlitro con 2  $\mu\text{l}$  de colorante de corrida (azul de bromofenol 0.1%, cianol xileno 0.1% y EDTA 10mM). En el caso de los productos de PCR de cada alícuota se tomaron 5 $\mu\text{l}$  y se mezclaron con 2.5  $\mu\text{l}$  de colorante de corrida. La mezcla se colocó cuidadosamente en un pozo del gel y se corrió durante 50 minutos a 100 volts. Una vez terminada la electroforesis el gel se observó a

través de un transiluminador de onda corta (260 nm) y se obtuvo una fotografía con el sistema de Imagen Digital IS-1000 .

#### **8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% .<sup>47</sup>**

Previamente lavados con Dextran y secados vidrios, peine y separadores se les bañó con Etanol absoluto y se secaron nuevamente, se aplicó Sigmacot a uno de los vidrios y se colocaron los separadores entre ambos vidrios sujetándolos con pinzas, la parte inferior fue sellada con tela adhesiva.

En un vaso de precipitado de 100 mililitros se mezclaron: 10 ml de acrilamida al 40%, 10 ml de TBE 1X (0.089 M Tris-borato y 0.089 M ácido bórico) y 30 ml de agua desionizada, se agitó la solución y se añadieron 400  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 30  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',-tetrametiletildiamina). La solución se depositó rápidamente cuidando de que no se formaran burbujas y se colocó un peine de 15 espacios. Una vez polimerizada la acrilamida, se retiró cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva de la parte inferior y se colocó en la cámara sujetando con pinzas, se llenó de buffer TBE 1X verificando que no hubiera fuga del mismo y se lavaron los pozos, se tomaron 8  $\mu$ l de los productos de amplificación y se mezclaron con 4  $\mu$ l de colorante de corrida depositándose en cada uno de los pozos, se mezcló también 0.4  $\mu$ l de marcador de peso molecular (escalera de 50 ó 123 pb) (Gibco- BRL) con 3.5  $\mu$ l de colorante de corrida, como control se puso una alícuota de un tubo con todos los componentes de la reacción de PCR a

excepción de DNA. Se corrió durante 4 horas y media a 150 volts y al terminar la electroforesis se desarmó cuidadosamente el sistema sumergiendo el gel en un recipiente con una solución de 0.5mg/ml de bromuro de etidio durante 5 minutos. El gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta y se le tomó fotografía mediante el sistema de Imagen Digital IS-1000 de Alpha Innotech Corporation.

### 8.5 Amplificación del DNA por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)<sup>45</sup>.

Se amplificaron 100 nanogramos de DNA genómico de cada uno de los miembros de las familias estudiadas, utilizando los marcadores de tipo VNTR D11S2179 y D11S1778, el primero contenido en el intrón 34 y el segundo a un centimorgan (cM) del extremo 3' del gen ATM <sup>44,45</sup>

La secuencia de los oligonucleótidos y los productos de amplificación de los 2 marcadores están descritos a continuación.

Oligonucleótidos del marcador D11S2179.

5'-TAGGCAATACAGCAAGACCCTG-3'

5'-GCACTGGAATACGATTCTAGCAC-3'

El marcador amplifica un repetido dinucleotídico de CA<sub>(n)</sub> y los fragmentos varían de 130 a 144 pb.

Oligonucleótidos del marcador D11S1778.

5'-TAACCTGCTACACAGTGTTCGTT-3'

5'-GCTTCAGCAGAGAAGCCAT-3'

El marcador amplifica un repetido dinucleotídico de CA<sub>(n)</sub> y los fragmentos varían de 138 a 160pb.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 2.5  $\mu$ l de solución amortiguadora Cetus 10x (Tris-HCl pH 8.3 100mM, KCl 500mM), 1.5 mM de cloruro de magnesio, 0.2 mM de cada oligonucleótido, 25pmol de cada dNTP, 5% de DMSO, 2.5 unidades de Taq polimerasa (Gibco-BRL), en un volumen final de 25 $\mu$ l.

La amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc) bajo las siguientes condiciones:

Para el marcador D11S2179: desnaturalización inicial a 96°C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 96°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 70°C por 30 segundos y posteriormente una extensión final a 70°C por 10 minutos.

Para el marcador D11S1778: desnaturalización inicial 96°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 96°C por 30 segundos, 56.5°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y posteriormente una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

En la reacción se incluyó como control un tubo con los mismos reactivos pero sin DNA. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% para verificar la presencia de los mismos y



posteriormente en geles de poliacrilamida al 12% para definir el tamaño de los fragmentos.

## 9. RESULTADOS

Se obtuvo DNA de 18 individuos, pertenecientes a cada una de las cuatro familias estudiadas, el método de extracción fue adecuado, la concentración obtenida fue entre 200 y 300 ng/ $\mu$ l y como podemos observar en la Figura 2 el DNA de cada individuo no presenta degradación.

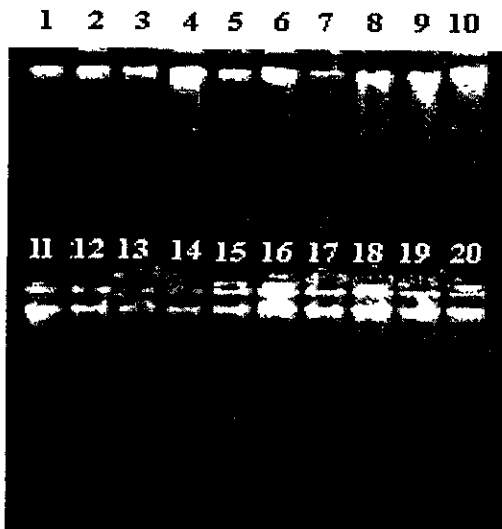


Figura 2. DNA genómico de individuos afectados por Ataxia Telangiectasia y sus familiares, así como de dos individuos no relacionados utilizados como control. Un microlitro de DNA de cada uno de los individuos se sometió a electroforesis en geles de agarosa, como se describe en material y métodos.

posteriormente en geles de poliacrilamida al 12% para definir el tamaño de los fragmentos.

## 9. RESULTADOS

Se obtuvo DNA de 18 individuos, pertenecientes a cada una de las cuatro familias estudiadas, el método de extracción fue adecuado, la concentración obtenida fue entre 200 y 300 ng/ $\mu$ l y como podemos observar en la Figura 2 el DNA de cada individuo no presenta degradación.

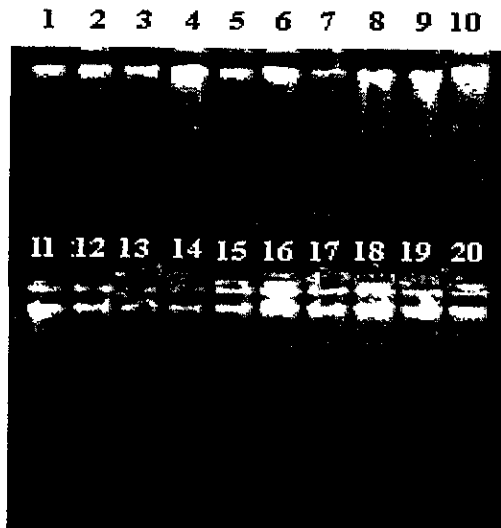


Figura 2. DNA genómico de individuos afectados por Ataxia Telangiectasia y sus familiares, así como de dos individuos no relacionados utilizados como control. Un microlitro de DNA de cada uno de los individuos se sometió a electroforesis en geles de agarosa, como se describe en material y métodos.

En la Figura 3 podemos observar que el tamaño de los amplificados es conforme al esperado; se procedió así a la amplificación del DNA del resto de los individuos de las familias estudiadas.

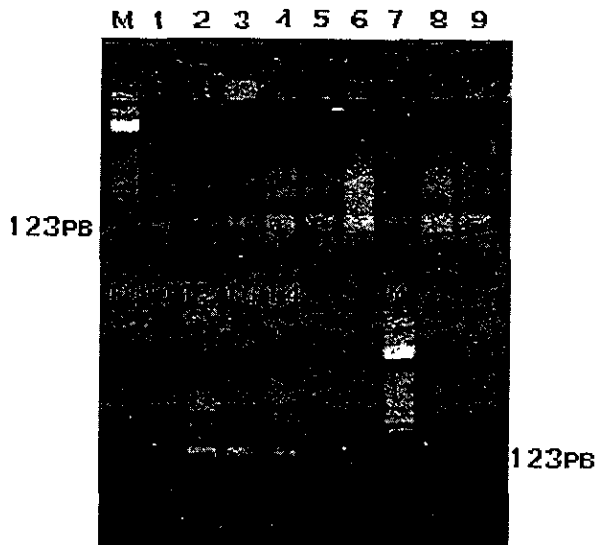


Figura 3. Amplificación del marcador D11S2179. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado como se comenta en métodos. Observamos algunos de los productos amplificados sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%. M= marcador de peso molecular, escalera de 123 pb.

Familia 1 (Figs. 4 y 5). Ambos padres (heterocigotos obligados) en edad apta para la concepción, no refieren consanguinidad ni endogamia. El propósito de 10 años de edad inició con sintomatología neurológica progresiva desde los 2 años de edad, deambula solamente con ayuda, las telangiectasias oculocutáneas aparecieron a los 3 y medio años de edad y desde entonces manifiesta infecciones respiratorias de repetición, el diagnóstico se apoyó con determinación de niveles bajos de IgG e IgA y elevación de alfafetoproteína en el suero del afectado. Tiene un hermano de 15 años de edad quien no presenta sintomatología neurológica, telangiectasias ni mayor susceptibilidad a infecciones.

En la Figura 4 (pág. 20) se muestran los productos de la amplificación del marcador D11S2179 de esta familia en un gel de acrilamida. Ambos padres (I-1, I-2) son heterocigotos con alelos idénticos. El hijo afectado (II-2) es homocigoto respecto al marcador (esto es, tiene dos alelos idénticos) y son los alelos que están segregando con los genes anormales de los padres (los que en este caso avanzan menos en el gel por tener un mayor número de repetidos CA), mientras que el hijo sano (II-1) fue homocigoto para los alelos con menor número de repetidos CA (los que avanzaron más en el gel), por lo anterior el individuo II-1 es no portador. Igualmente en la Figura 5 (pág. 21) se muestran los productos de la amplificación del marcador D11S1778, y en ella podemos observar que ambos padres son heterocigotos para el marcador

(esto es, tienen dos alelos distintos), idénticos entre ellos, que el hijo sano (homocigoto para el marcador por tener sus dos alelos idénticos) ha heredado los alelos que segregan con el gen normal (en este caso los que avanzan mayor distancia por tener un menor número de repetidos) y que el hijo afectado (también homocigoto para el marcador, esto es, con dos alelos idénticos) ha heredado los alelos con mayor número de ellos y que avanzaron menos en el gel, estos alelos segregan con el gen anormal.

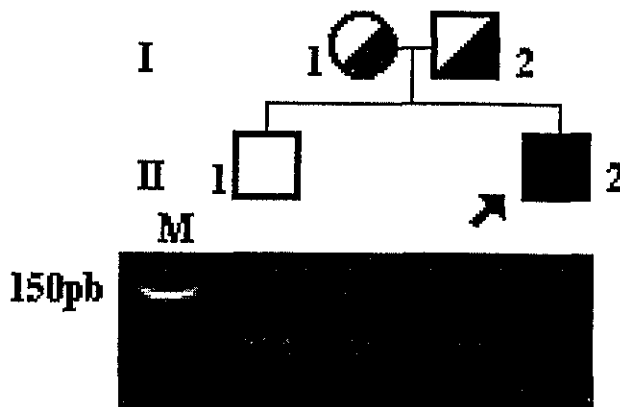


Fig. 4. Determinación de portadores en la Fam. 1 con el marcador D11S2179. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escalera de 50 pb. Ver texto en pág. 19.

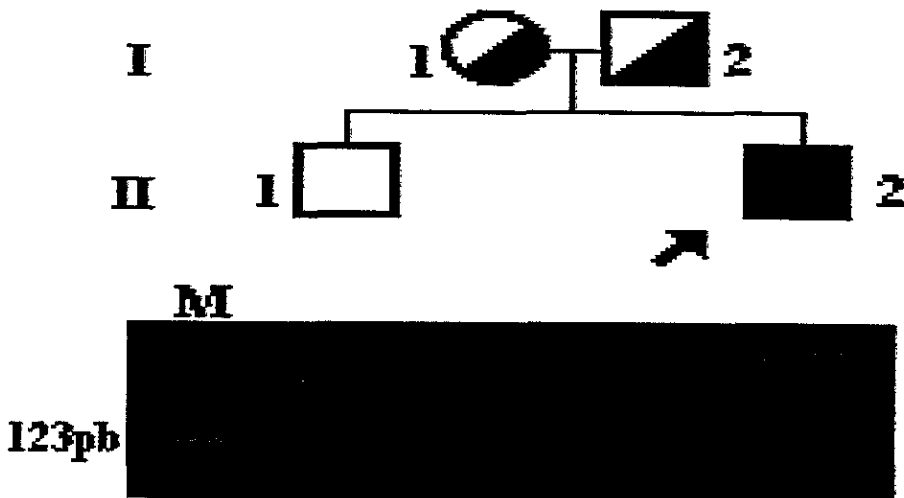


Fig. 5. Determinación de portadores en la Fam. 1 con el marcador D11S1778. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escalera de 123 pb. Ver texto en pág. 19 y 20.

Familia 2 (Figs. 6 y 7). Padre fallecido hace 10 años por alcoholismo crónico y Cirrosis Hepática; la madre (heterocigota obligada) niega consanguinidad o endogamia. La descendencia con tres afectados (II-1, II-2 y II-3), el mayor (II-1) fallecido a los 2 años de edad por complicaciones respiratorias, la hermana (II-2) falleció a los 22 años de edad por la misma causa, el propósito (II-3) de 24 años de edad que inició sintomatología neurológica progresiva a los 2 y medio años de edad, con telangiectasias oculocutáneas desde los 4 años de edad, e infecciones respiratorias de repetición desde los 2 años de edad, imposibilitado para la deambulación desde los 12 años de edad, con antecedente de osteoma en mano izquierda a los 17 años, tiene determinaciones bajas de IgG, IgA e IgE así como niveles altos de Alfafetoproteína en suero. El hermano sano (II-4) tiene 19 años de edad y no presenta sintomatología neurológica, telangiectasias o mayor susceptibilidad a infecciones.

En la Figura 6 (pág 23) se muestran los productos de amplificación del marcador D11S2179 de esta familia en un gel de acrilamida. Se observa que el hermano sano (II-4) comparte uno de sus dos alelos con uno de los dos alelos de la madre (I-2) y del hijo afectado(II-3), en quienes sus dos alelos son idénticos (homocigotos para el marcador), el alelo que no comparte con ellos está segregando con el gen normal del padre (I-1) pues no lo tiene el propósito, el otro alelo (heredado de la madre) podría corresponder ya sea al

alelo que segrega con el gen normal o al que segrega con el gen anormal. En la Figura 7 (pág. 24) se muestran los productos de amplificación del marcador D11S1778 en donde se observa que tampoco es informativo, el hijo sano (II-4) comparte uno de sus alelos con el del hijo enfermo (II-3) y con la madre (I-2), quienes tienen un solo alelo, sin poder definir cual de los dos alelos de la madre es el que ha heredado, si el que segrega con el gen normal o el que lo hace con el gen anormal. Por lo anterior no fue posible definir el estado de portador del individuo II-4 con ninguno de los dos marcadores.

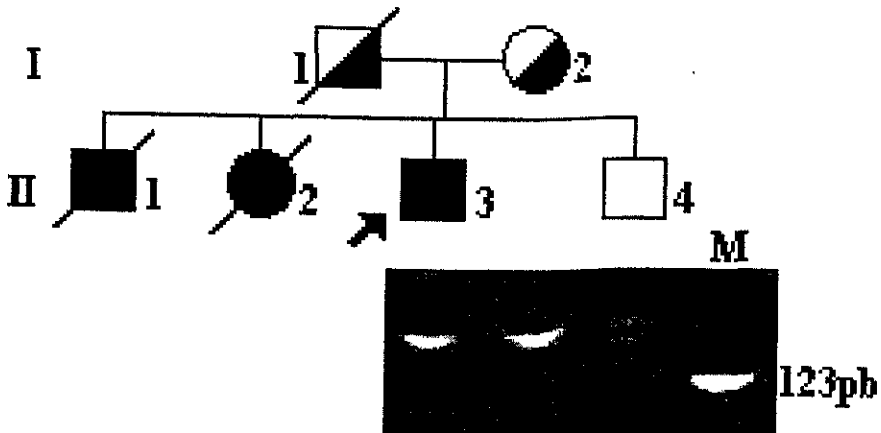


Fig. 6. Determinación de portadores en la Fam. 2 con el marcador D11S2179. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escalera de 123 pb. Ver texto en pág. 22.



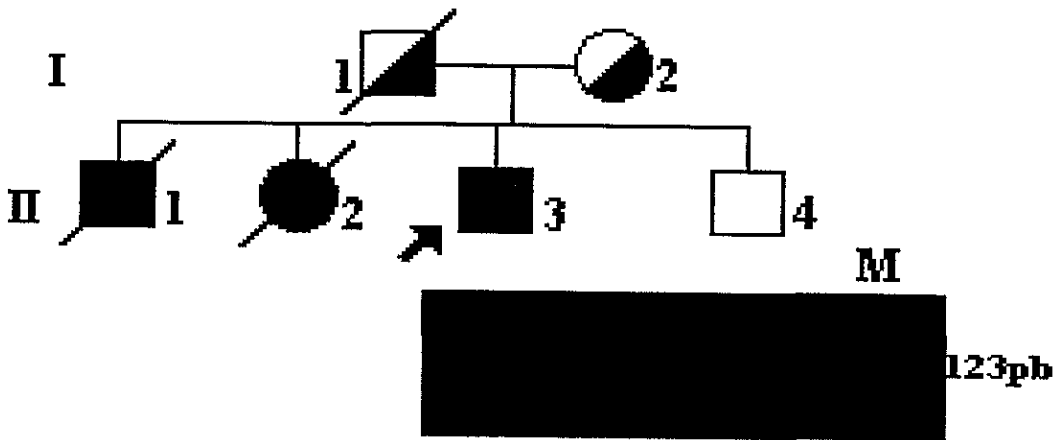


Fig. 7. Determinación de portadores en la Fam 2 con el marcador D11S1778. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escalera de 123 pb. Ver texto en pág. 23.

Familia 3 (Fig. 8). Padres (heterocigotos obligados) en edad apta para la reproducción, niegan consanguinidad o endogamia. Tienen 5 hijos, todos varones, el propósito es el mayor de ellos, de 10 años de edad, quien inició sintomatología neurológica progresiva a los 5 años de edad y telangiectasias oculocutáneas ocho meses después, infecciones respiratorias frecuentes desde los 5 y medio años de edad, niveles bajos de IgG e IgA y niveles altos de Alfetoproteína en suero, deambula sólo con ayuda. Ninguno de sus cuatro hermanos presenta síntomas neurológicos, telangiectasias ni mayor susceptibilidad a infecciones.

En la Figura 8 (pág. 26) se muestran los productos de la amplificación del marcador D11S2179 de esta familia en un gel de acrilamida.. Ambos padres (I-1, I-2) comparten un alelo y son los que el propósito (II-1) heredó (los que segregan con los genes anormales de los padres), los individuos asintomáticos II-2 y el II-4 comparten uno de sus alelos con el propósito, por lo que son portadores. Ya que los individuos asintomáticos II-3 y II-5 no comparten ninguno de sus dos alelos con el propósito, no son portadores. Por otra parte todos los miembros de la familia resultaron homocigotos para el marcador D11S1778 por lo que no fue informativo en esta familia (dato no mostrado).

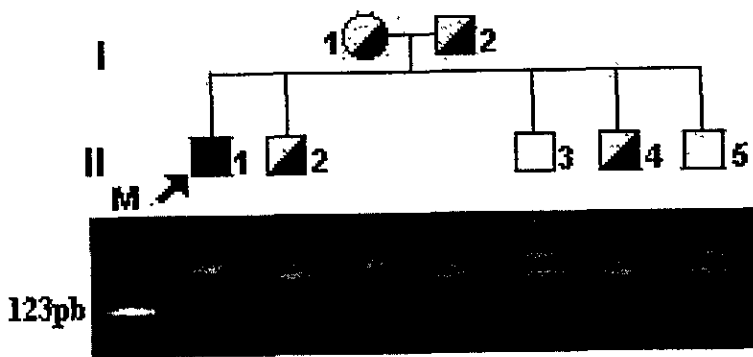


Fig.8. Determinación de heterocigotos en la Fam. 3 con el marcador D11S2179. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escala de 123 pb. Ver texto en pág. 25.

Familia 4 (Figs. 9 y 10). Padres (heterocigotos obligados) en edad apta para la reproducción, niegan consanguinidad, hay antecedente de endogamia. La propósita (II-1) de 16 años de edad, inició sintomatología neurológica progresiva a los 3 años de edad, las telangiectasias oculocutáneas aparecieron a los 4 y medio años de edad, con cuadros repetitivos de infecciones respiratorias desde los 3 años de edad, aun deambula con ayuda, se determinaron niveles bajos de IgG, IgA e IgE y niveles altos de alfafetoproteína en suero. El hermano sano (II-2) tiene 14 años de edad no presenta síntomas neurológicos, telangiectasias ni mayor susceptibilidad a infecciones.

En la Figura 9 (pág. 28) se muestran los productos de la amplificación del marcador D11S2179 de esta familia en un gel de acrilamida. Ambos padres (I-1, I-2) fueron heterocigotos presentando ambos alelos en común. La hija afectada (II-1) heredó los alelos que segregan con la enfermedad (en este caso los que se avanzaron menos en el gel por tener un mayor número de repetidos CA), mientras que el hijo sano (II-2) heredó los alelos no relacionados con la enfermedad (los que se alejan mas en el gel por tener un menor número de repetidos) por lo que se define como no portador. Asimismo en la Figura 10 (pág. 29) se muestran los productos de la amplificación del marcador D11S1778 y podemos observar que ambos padres

son heterocigotos con alelos idénticos y que ambos hijos son homocigotos, la hija enferma (II-1) ha heredado en esta caso los alelos que avanzaron más en el gel (por tener un menor número de repetidos CA), mientras que el hijo sano (II-2) heredó los que avanzaron menos (alelos con mayor número de repetidos).

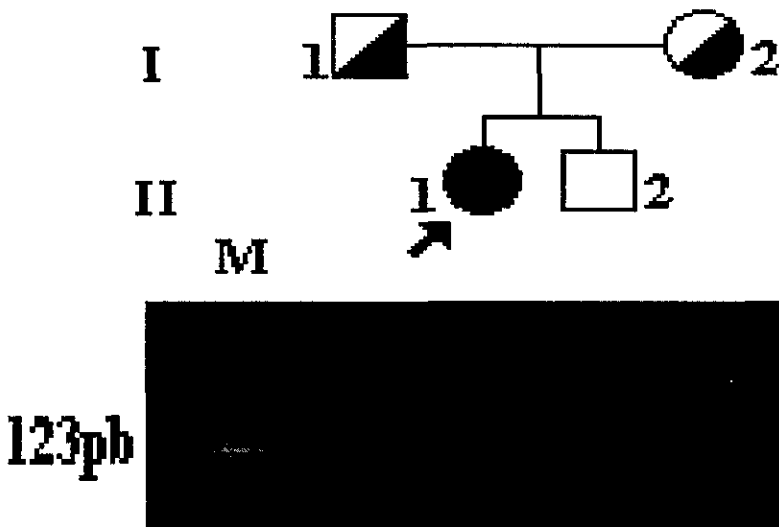


Fig. 9. Determinación de heterocigotos en la Fam. 4 con el marcador D11S2179. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escalera de 123 pb. Ver texto en pág. 27.

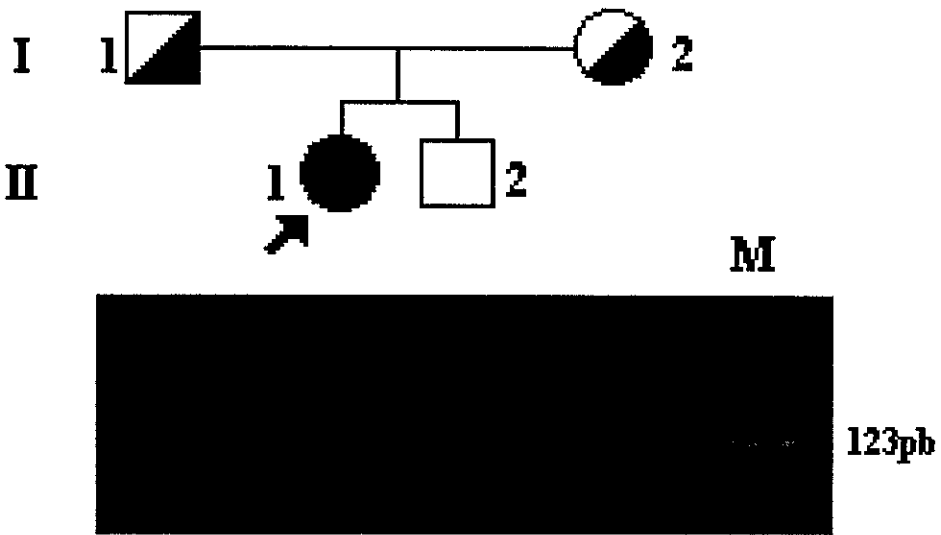


Fig.10. Determinación de heterocigotos en la Fam. 4 con el marcador D11S1778. El DNA genómico de cada individuo fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como se comenta en métodos. Observamos los productos de la amplificación sometidos a electroforesis en geles de Acrilamida al 12%. M= marcador de peso molecular, escalera de 123 pb. Ver texto en pág. 27 y 28.

## 10. DISCUSION:

El definir con precisión el estado de heterocigocidad en los familiares de estos pacientes es de gran importancia ya que los heterocigotos presentan hipersensibilidad a la radiación ionizante y un riesgo elevado de presentar cáncer; es por esto que, una vez diagnosticados los heterocigotos, el asesoramiento genético va encaminado tanto a la prevención de una excesiva exposición a la radiación ionizante que causaría daño al genoma y precipitaría la aparición de neoplasias, como hacia un seguimiento para la detección temprana y oportuna de ellas en estos individuos.

Los marcadores de tipo VNTR utilizados en el presente estudio permiten definir con alta precisión el estado de heterocigocidad en los familiares de pacientes con Ataxia Telangiectasia.

Estos marcadores fueron elegidos debido al alto porcentaje de heterocigocidad en el número de repetidos CA que se han encontrado en individuos estudiados en otros países (0.722 para D11S2179 y 0.845 para D11S1778) <sup>44</sup>; por otra parte la localización con respecto al gen fue muy importante para la elección de ellos, en el caso del marcador D11S2179 se encuentra en el intrón 34 y en el caso del marcador D11S1778 se encuentra a 1cM del extremo 3' del gen lo que significa que de cada 100 eventos de recombinación meiótica solo hay una posibilidad de que no segregue junto con el gen.

En las cuatro familias analizadas, se estudiaron siete heterocigotos probables definiendo el estado de portador en dos, el de no portador en cuatro y en uno no fue

posible hacerlo con estos dos marcadores. En este último caso ( familia 2, compuesta solamente por la madre, el hijo enfermo y el hijo sano), en que no fue posible definir el estado de heterocigocidad mediante el uso de estos dos marcadores, se podría realizar la prueba de proteína truncada tomando en cuenta que en más del 75% de los casos se han encontrado mutaciones que generan un codón de paro y producen proteínas truncadas.<sup>36-38</sup>

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Gatti RA. Ataxia-telangiectasia. *Dermatol Clin.* 1995; 13:1-6.
2. <sup>Marrell</sup> Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995; 268:1749-1753. <sub>6.12</sub>
3. Osundwa VM, Dawod ST. The occurrence of ataxia telangiectasia and common variable immunodeficiency in siblings: case report. *Ann Trop Pediatr.* 1994; 14:71-73.
4. Mc Conville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor MR. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1996; 59:320-330.
5. Klein C, Wenning GK, Quinn NP, Marsden CD. Ataxia without telangiectasia masquerading as benign hereditary chorea. *Mov Disord.* 1996; 11:217-220.
6. Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol.* 1994; 66:S177-182. <sub>Se pag 26</sub>



posible hacerlo con estos dos marcadores. En este último caso ( familia 2, compuesta solamente por la madre, el hijo enfermo y el hijo sano), en que no fue posible definir el estado de heterocigocidad mediante el uso de estos dos marcadores, se podría realizar la prueba de proteína truncada tomando en cuenta que en más del 75% de los casos se han encontrado mutaciones que generan un codón de paro y producen proteínas truncadas.<sup>36-38</sup>

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Gatti RA. Ataxia-telangiectasia. *Dermatol Clin.* 1995; 13:1-6.
- 14 2. <sup>Marrell</sup> Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, et al. A single ataxia <sup>↳ 12</sup> telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995; 268:1749-1753.
3. Osundwa VM, Dawod ST. The occurrence of ataxia telangiectasia and common variable immunodeficiency in siblings: case report. *Ann Trop Pediatr.* 1994; 14:71-73.
4. Mc Conville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor MR. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1996; 59:320-330.
5. Klein C, Wenning GK, Quinn NP, Marsden CD. Ataxia without telangiectasia masquerading as benign hereditary chorea. *Mov Disord.* 1996; 11:217-220.
- 15 6. Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol.* 1994; 66:S177-182.  
*Se p. 177-182*

- 6 <sup>Peterson</sup> 7. Sedgwick RP, Boder E. Ataxia- Telangiectasia. In: de Jong Handbook of Clinical Neurology. Hereditary Neuropathies and Spinocerebellar Atrophies. 1991; 16:347. 6
- 8 <sup>Carbonari</sup> 8. Peterson RD, Kelly WD, Good RA. Ataxia-telangiectasia: Its association with a defective thymus, immunological-deficiency disease, and malignancy. Lancet. 1964; 1:1189. 7
- 8 <sup>Bar</sup> 9. Carbonari M, Cherchi M, Paganelli R, Giannini G, Galli G, et al. Relative increase of T cells expressing the gamma/delta rather than the alpha/beta receptor in ataxia-telangiectasia. New Engl J Med. 1990; 322: 73-76. 8
10. Blevins LS Jr, Gebhart SS. Insulin-resistant diabetes mellitus in a black woman with ataxia-telangiectasia. South Med J. 1996; 89:619-621.
- 11 <sup>Bar</sup> 11. Bar RS, Levis WR, Rechler MM, Harrison LC, Siebert C, et al. Extreme insulin resistance in ataxia- telangiectasia: defect in affinity of insulin receptors. New Engl J Med. 1978; 298:1164-1171. 9
- 11 12. Gatti RA. Ataxia-Telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. Medicine. 1991; 70:99-117. 10
13. Harnden DG. The nature of ataxia-telangiectasia: problems and perspectives. Int J Radiat Biol. 1994; 66:S13-19. 11
- 2 14. Morrell D, Cromartie E, Swift M. Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. J Natl Cancer Inst. 1986; 77:89.

12 Sedgwick  
13 Gatti

15. Aurias A, Dutrillaux B. Probable involvement of immunoglobulin superfamily genes in most recurrent chromosomal rearrangements from ataxia-telangiectasia. *Hum Genet.* 1986; 72:210-214. 14
16. Rathmell WK, Chu G. A DNA end-binding factor involved in double-strand break repair and V(D)J recombination. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:4741-48. 15
17. Kirsch IR. V(D)J recombination and ataxia-telangiectasia: a review. *Int J Radiat Biol.* 1994; 66:S97-108. 16
18. Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, Baltimore D. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 1996; 10:2411-22. 17
19. Uziel T, Savitsky K, Platzer M, Ziv Y, Helbitz T, et al. Genomic organization of the ATM gene. *Genomics.* 1996; 33:317-320. 18
20. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell-cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet.* 1995; 4:2025-32. 19
21. Chen X, Yang L, Udar N, Liang T, Uhrhammer N, Xu S, Bay JO, Wang Z, Dandekar S, Chiplunkar S, Klisak I, Telatar M, Yang H, Concannon P, Gatti RA. 20  
CAND3: a ubiquitously expressed gene immediately adjacent and in opposite transcriptional orientation to the ATM gene at 11q23.1. *Mamm Genome.* 1997; 8:129-133.

22. Byrd PJ, McConville CM, Cooper P, Parkhill J, Stankovic T, et al. Mutations revealed by sequencing the 5' half of the gene for ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:145-149.
23. Meyn S. Ataxia-Telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res.* 1995; 55:5991-6001.
24. Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T. Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci.* 1998; 111:413-23.
25. Shiloh Y. Ataxia Telangiectasia and the Nijmegen Breakage Syndrome: Related Disorders But Genes Apart. *Annu Rev Genet.* 1997; 31:635-62.
26. Zakián VA. ATM related genes: What do they tell us about functions of the human gene?. *Cell.* 1995; 82:685-7.
27. Gottlieb TM. Protein kinases and DNA damage. *Trends Biochem Sci.* 1994; 19:500-503.
28. Xia SJ, Shammass MA, Shmookler-Reis RJ. Reduced telomere length in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Mutat Res.* 1996; 364 :1-11.
29. Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, et al. Accelerated telomere shortening in ataxia-telangiectasia. *Nat Genet.* 1996; 13:350-3.
30. Hall J, Angèle S. Radiation, DNA Damage and Cancer. *Mol Med Today.* 1999; 5:157-164.

31. Xu Y, Baltimore D. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.* 1996; 10 (19): 2401-10.
32. Cheng X, Cheong N, Wang Y, Iliakis G. Ionizing radiation induced phosphorylation of RPA p34 is deficient in ataxia-telangiectasia and reduced in aged normal fibroblasts. *Radiother Oncol.* 1996; 39:43-52.
33. Beamish H, Williams R, Chen P, Lavin MF. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. *J Biol Chem.* 1996; 271:20486-93.
34. Lavin MF, Shiloh Y. The Genetic Defect in Ataxia Telangiectasia. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 177-202.
35. Jaffrey SR, Snyder SH. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Biol.* 1995; 11: 417-40.
36. Gilad S, Khosravi R, Shkedy D, Uziel T, Ziv Y, et al. Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:433-9.
37. Wright J, Teraoka S, Onengut S, Tolun A, Gatti RA, et al. A high frequency of distinct ATM gene mutations in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1996; 59:839-846.
38. Telatar M, Wang Z, Udari N, Liang T, Bernatowska-Matuszkiewicz E, et al. Ataxia-telangiectasia: Mutations in ATM cDNA detected by protein-truncation screening. *Am J Hum Genet.* 1996; 59:40-44.

39. Vorechovsky I, Rasio D, Luo L, Monaco C, Hammarstrom L, et al. The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res.* 1996; 56:2726-32.
40. Vorechovsky I, Luo L, Lindblom A, Negrini M, Webster AD, et al. ATM mutations in cancer families. *Cancer Res.* 1996; 56:4130-33.
41. Carter SL, Negrini M, Baffa R, Gullum DR, Rosenberg AL, et al. Loss of heterozygosity at 11q22-q23 in breast cancer. *Cancer Res.* 1994; 54:6270-74.
42. Sardanelli F, Parodi RC, Ottonello C, Renzetti P, Saitta S, et al. Cranial MRI in Ataxia-Telangiectasia. *Neuroradiology.* 1995; 37:77-82.
43. Kempter B. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG.* 1992; 8:7.
44. Vanagaite L. A high-density microsatellite map of ataxia-telangiectasia locus. *Hum Genet.* 1995; 95:451-454.
45. Athma P. PCR detection of the Taq 1 Restriction Fragment Length Polymorphism linked to the Ataxia-telangiectasia locus. *Clin Chem.* 1995; 41:625-626.
46. Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, et al. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene.* 1997; 14: 1911-21.
47. Sambrook, Fritsch & Maniatis. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2<sup>nd</sup> Ed. 1989.

**12. ANEXO 1**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA

Por medio de la presente dono una muestra de sangre periférica para el Banco de DONA de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, aceptando formar parte del proyecto "ESTUDIO GENETICO DEL GEN AFECTADO EN ATAXIA TELANGIECTASIA, DETECCION DE HETEROCIGOTOS Y ASESORAMIENTO GENETICO" (la información de los resultados obtenidos será confidencial y se hará a través del personal médico de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana y el hecho de no participar en el estudio no excluirá a los pacientes de la debida atención de la enfermedad).

FECHA: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL FAMILIAR: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

PARENTESCO: \_\_\_\_\_

DIRECCION: \_\_\_\_\_

TELEFONO: \_\_\_\_\_