



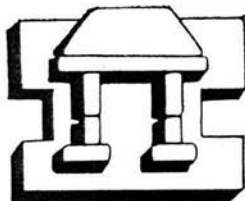
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

ANALISIS MOLECULAR EN 4 EXONES DEL GEN DE
FIBROSIS QUISTICA EN PACIENTES MEXICANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
ELIZABETH HERNANDEZ URZUA



IZTACALA

MEXICO, D.F.

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA SOFIA OROZCO O.

ABRIL, 2002



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.



U.N.A.M. CAMPUS

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco y la asesoría de la M. en C. Margarita Chávez Saldaña.

IZT.

La Tesis se realizó con el apoyo de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ) y el CONACYT, proyecto No. 5105-M.

DEDICATORIA

A Mis Padres *Francisca y Guillermo*

Por el apoyo que siempre me han dado ante cualquier situación y momento sobre todo el que me brindaron para llegar hasta este momento, por la paciencia que siempre me han tenido, por todo su amor y sus consejos, y en especial por enseñarme a ser humilde y ayudar a quien lo necesita.

A Mi Gran Amor Daniel

Por todo su amor, por su amistad, por su gran paciencia, por sus consejos, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por los momentos de felicidad que me ha hecho valorar, por el apoyo que me ha brindado para este momento.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Francisca y Guillermo, gracias por su amor y por el apoyo incondicional que siempre me han dado.

A Daniel Caballero, mi gran amor, gracias por su paciencia, por enseñarme a valorar todos los buenos momentos y por ayudarme para llegar hasta esto, por confiar en mí.

A mis hermanas, Verónica, Adriana y Guillermina y a mi sobrino Maximiliano, gracias por su compañía, su apoyo y su amor.

A la Doctora Lorena Orozco, gracias por sus conocimientos y consejos en la realización de este trabajo y por brindarme la oportunidad de aprender a su lado.

A los miembros de la Comisión Dictaminadora de este trabajo, Dr. Sergio Vaca Pacheco, Dra. Martha Martínez García, Dr. Diego Arenas Aranda y el M. en C. Ramón V. Moreno Torres, gracias por sus comentarios a este trabajo de tesis.

A los compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, gracias por los conocimientos que me brindaron.

Al Dr. Jorge Membrillo Hernández, gracias por su paciencia y por todos sus buenos conocimientos, y sobre todo por su amistad que me ha brindado.

A la familia Caballero Muñoz, Sr. Francisco Caballero, Sra. Eva Muñoz, Francisco, Antonio, Fabiola, Alfredo, Concepción, Daniel Azeem, Christian y Karla Noemí, gracias por su amor y amistad.

A mis compañeras y amigas del laboratorio del Dr. Jorge Membrillo Hernández, Martha, Marcela, Greta, Georgina, MariTrini, Paola, gracias por su amistad y su apoyo.

A la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística por el apoyo que brindo para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Manifestaciones clínicas.....	4
Gen FQ.....	4
La proteína CFTR.....	6
Mutaciones en el gen CFTR.....	13
Bases moleculares de la disfunción del canal CFTR.....	15
Correlación genotipo-fenotipo.....	19
ANTECEDENTES.....	20
OBJETIVOS.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
Estrategia general.....	24
1.- Cuantificación e integridad de DNA.....	26
2.- Búsqueda dirigida de 4 mutaciones más frecuentes.....	26
3.- Análisis de SSCP.....	29
RESULTADOS.....	34
1.- Integridad del DNA.....	34
2.- Búsqueda dirigida de 4 mutaciones más frecuentes.....	34
3.- Análisis de SSCP.....	41
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
APÉNDICE.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gen de la fibrosis quística.....	5
Figura 2	Proteína CFTR.....	8
Figura 3	Función de la CFTR.....	12
Figura 4	La mutación $\Delta F508$	14
Figura 5	Clasificación de las mutaciones del gen FQ.....	18
Figura 6	La técnica de SSCP.....	30
Figura 7	Integridad del DNA.....	34
Figura 8	Mutación $\Delta F508$	35
Figura 9	Mutación G542X.....	36
Figura 10	Mutación N1303K.....	37
Figura 11	Mutación $\Delta I507$	39
Figura 12	Exón 7 (SSCP).....	42
Figura 13	Exón 11(SSCP).....	42
Figura 14	Exón 13a (SSCP).....	43
Figura 15	Exón 17b(SSCP).....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Distribución de la mutaciones más frecuentes ...	22
Tabla 2	Secuencia de oligonucleótidos para PSM.....	28
Tabla 3	Enzimas de restricción para PSM.....	29
Tabla 4	Secuencia de oligonucleótidos para SSCP.....	32
Tabla 5	Estandarización de la técnica de SSCP.....	33
Tabla 6	Resultados del análisis de PSM.....	40
Tabla 7	Resultados del análisis de SSCP.....	44

RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva que se presenta con una incidencia de 1 en 2,000 a 3,000 recién nacidos vivos en la población caucásica. Esta enfermedad se caracteriza por afección pulmonar crónica, insuficiencia pancreática y elevación de cloruros en sudor. El gen responsable de la FQ se localiza en el cromosoma 7 en la banda q31, consta de 250 Kb y codifica para una proteína de 1,480 aminoácidos llamada proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ (CFTR), la cual es un canal de cloro. Hasta la fecha se han caracterizado más de 950 mutaciones diferentes en el gen FQ, siendo la $\Delta F508$ la mutación más frecuente a nivel mundial (70%). Esta alteración es una delección del codón 508 que codifica para la fenilalanina y generalmente en estado homocigoto causa un cuadro clínico grave. La frecuencia de las mutaciones FQ es muy variable en las distintas poblaciones siendo la mutación $\Delta F508$ la más frecuente a nivel mundial (70%). En las poblaciones hispanas varía de 29% en Chile hasta 62% en Argentina. En la población caucásica, realizando la búsqueda dirigida de las 4 mutaciones más frecuentes a nivel mundial se logra la identificación de cerca del 85% de los alelos afectados. Sin embargo en México, en el Instituto Nacional de Pediatría realizando una búsqueda dirigida de las mutaciones más frecuentes a nivel mundial, o en poblaciones hispanas se logró identificar cerca del 57% de los alelos afectados; por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar el rastreo de las mutaciones presentes en el resto de los cromosomas afectados. En el estudio se analizaron 87 pacientes no relacionados con diagnóstico clínico de

FQ, los cuales previamente se sometieron a la búsqueda dirigida de las cuatro mutaciones más frecuentes en la población mexicana. En aquellos pacientes que presentaron al menos un alelo sin caracterizar, se realizó un análisis en los exones 7, 11, 13a y 17b del gen FQ, sitios considerados con mayor susceptibilidad a presentar mutaciones. Este análisis se realizó mediante la técnica de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP). En este estudio se pudieron detectar 21 pacientes con cambio conformacional: 4 en el exón 7, 8 en el exón 11, 3 en el exón 13a y 19 en el exón 17b. Después de caracterizar estas mutaciones mediante secuenciación se logrará detectar cerca del 60% de los alelos afectados. Sin embargo es necesario analizar el total de exones que conforman este gen para la detección y caracterización de nuevas mutaciones o mutaciones poco frecuentes, así como la detección de los polimorfismos presentes en nuestra población.

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la población caucásica con una incidencia de 1 en 2,000 a 3,000 recién nacidos vivos (1).

Desde el siglo XVII existen reportes de niños con íleo meconial asociados con síntomas típicos pulmonares y pancreáticos, sin embargo a principios de 1930 se hizo la primera descripción de la FQ. En 1936 Fanconi reportó un síndrome con alteraciones pancreáticas y en 1938 Anderson describió esta enfermedad en Inglaterra, denominándola "fibrosis quística del páncreas". Farber, en 1945 le dio el nombre de "Mucoviscidosis" a la enfermedad de las glándulas exocrinas con secreciones mucosas viscosas y espesas. En esta misma década Anderson y Hodges después de haber analizado los árboles genealógicos de varias familias afectadas describieron a la FQ como una enfermedad autosómica recesiva. Paul Di Sant' en 1953 observó exceso de sodio y cloro en el sudor de estos pacientes lo cual condujo a Gibson y Cooke a desarrollar el método de la iontoforesis por estimulación con pilocarpina para determinar las concentraciones de cloruros en el sudor de los pacientes. En 1968 Holsclaw y Schwachman observaron varones con FQ con obstrucción de vasos deferentes y tubos seminíferos y en 1975 Oppenheimer observó pacientes de con FQ que presentaban insuficiencia pancreática (2).

En 1980 Knowles y colaboradores describieron alteraciones eléctricas del epitelio pulmonar respiratorio registrado en pacientes FQ, asociado con anomalías en el transporte de sodio y cloro. Posteriormente Quinton y colaboradores, en 1993 demostraron la impermeabilidad del cloro en los conductos de las glándulas sudoríparas de pacientes con FQ observando así el defecto básico de la FQ (secreción de cloro) el cual es la alteración en el transporte de agua y electrolitos en las células epiteliales(1, 2, 3).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

El defecto básico de la FQ es la alteración en el transporte de agua y electrolitos en las células epiteliales, provocando la producción de secreciones mucosas viscosas con gran capacidad de adherencia que ocasionan la obstrucción en diferentes órganos tales como el pulmón, páncreas, intestino, glándulas sudoríparas y obstrucción de conductos deferentes en el 90% de los varones con FQ. En el pulmón, estas mucosidades espesas conducen a infecciones pulmonares crónicas recurrentes, cuyos agentes etiológicos son *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aerus*. La afección pulmonar es la causa de mortalidad más frecuente. El 85% de los pacientes con FQ presentan insuficiencia pancreática, en tanto que del 10 al 20% de los recién nacidos presentan ileo meconial (1). En las glándulas sudoríparas se presentan niveles elevados de cloruros en sudor (> 60 mEq/l), siendo actualmente la prueba diagnóstica para la FQ (4), la elevación de los cloruros en el sudor de los pacientes se debe a la falla en la absorción del cloro en los conductos de las glándulas sudoríparas. Además pueden presentar otras manifestaciones como la cirrosis hepática, que es desarrollada en el 2 al 5% de los pacientes (5).

GEN FQ.

En 1989, se clonó y secuenció el gen responsable de la FQ mediante clonación posicional (6). Este gen se localiza en el cromosoma 7 en la banda q31, mide 250 kilobases (Kb) y consta de 27 exones (7) (Figura 1). La región promotora se caracteriza por un alto contenido de G-C (aproximadamente 65%), no presenta caja TATA ni caja CCAAT, y tiene una gran similitud al promotor de genes con expresión constitutiva (housekeeping); sin embargo su expresión es variable. El transcrito mide 6.5 Kb y se detecta en una gran variedad de tejidos, especialmente en el pulmón, páncreas, glándulas

sudoríparas, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales, tracto reproductor e intestino (8).

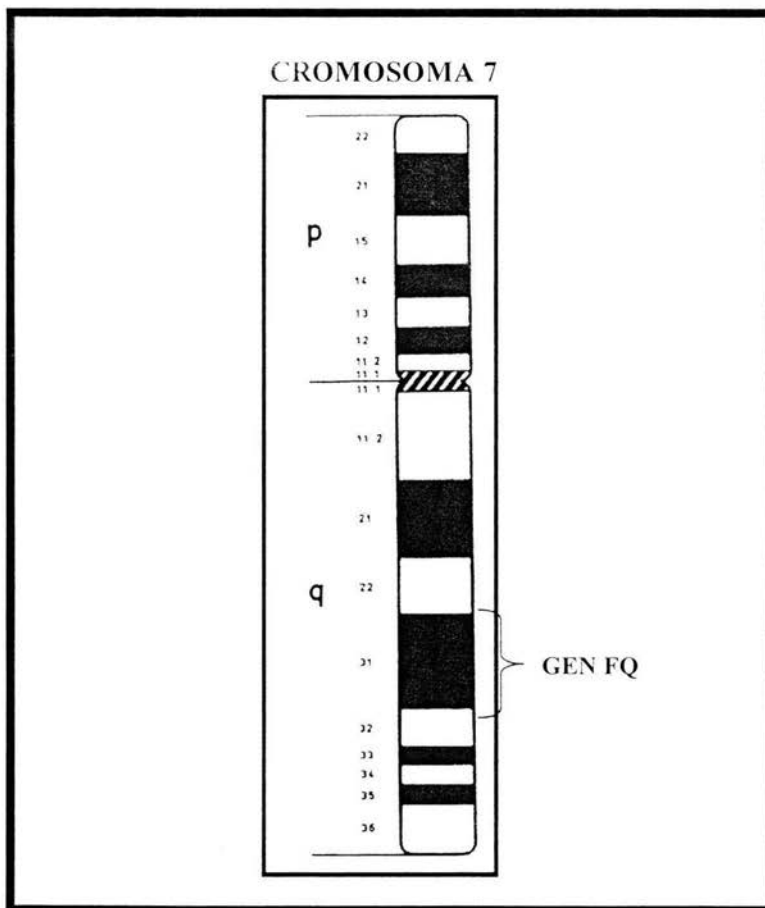


Figura 1. Localización del Gen FQ en el Cromosoma 7. Esquema del cromosoma 7 marcando la región q31 en donde se localiza el gen de la FQ.

PROTEÍNA CFTR.

El gen de la FQ codifica una glicoproteína de 1,480 aminoácidos que debido a su papel fisiológico es denominada proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ (CFTR del inglés Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), considerada un canal de cloro (9) dependiente de AMPc. Por análisis de cristalográfico se ha visto que la proteína madura, totalmente glicosilada pesa aproximadamente 170 kd (5, 10).

Por su estructura la proteína CFTR se encuentra muy relacionada con la familia de las proteínas de unión a nucleótidos, conocidas como proteínas ABC cassettes o también llamada ATPasas. Estas son proteínas integrales de membrana y contienen varios dominios estructurales y funcionales: dos dominios transmembranales (TMD's 1 y 2), conformado cada uno de estos por seis segmentos hidrofóbicos (TM's 1 al 12), dos dominios de unión a nucleótidos (NBD's 1 y 2) y dos sitios de glicosilación. Los TM's están ligados uno con otro por asas citoplasmáticas. Al parecer sólo los sitios de glicosilación están expuestos hacia la superficie exterior (11).

Los miembros de esta familia utilizan la energía liberada durante la hidrólisis de ATP en los NBD's para transportar activamente los substratos a través de la membrana celular. Una de las características comunes de esta familia de proteínas es su homología en las secuencias de los NBD's.

La CFTR además presenta un dominio, exclusivo de esta proteína, que interacciona con ATP, el dominio regulador (R), este dominio tiene varios sitios de fosforilación indispensables para la apertura y cierre del canal, mediados por Proteincinasa A (PKA) o Proteincinasa C (PKC) (10, 3). Esta proteína es considerada por su función como el único transportador para actuar como un canal iónico dentro de los miembros de esta familia. (3, 10, 11, 12, 13) (Figura 2).

La estructura compleja de la CFTR ha sugerido más de una función para la proteína, donde sus dominios pueden estar involucrados en la regulación de estas diferentes funciones tanto independientemente como por interacción dominio-dominio. Una de estas funciones es actuar como un canal de cloro, ayudando a regular la conductividad de Cl^- y Na^+ en las células epiteliales (5). Tabcharani y colaboradores (14) dieron evidencia para considerar a esta proteína como un poro multiiónico regulando directa o indirectamente otros canales endógenos de cloro estimulados por AMPc (15).

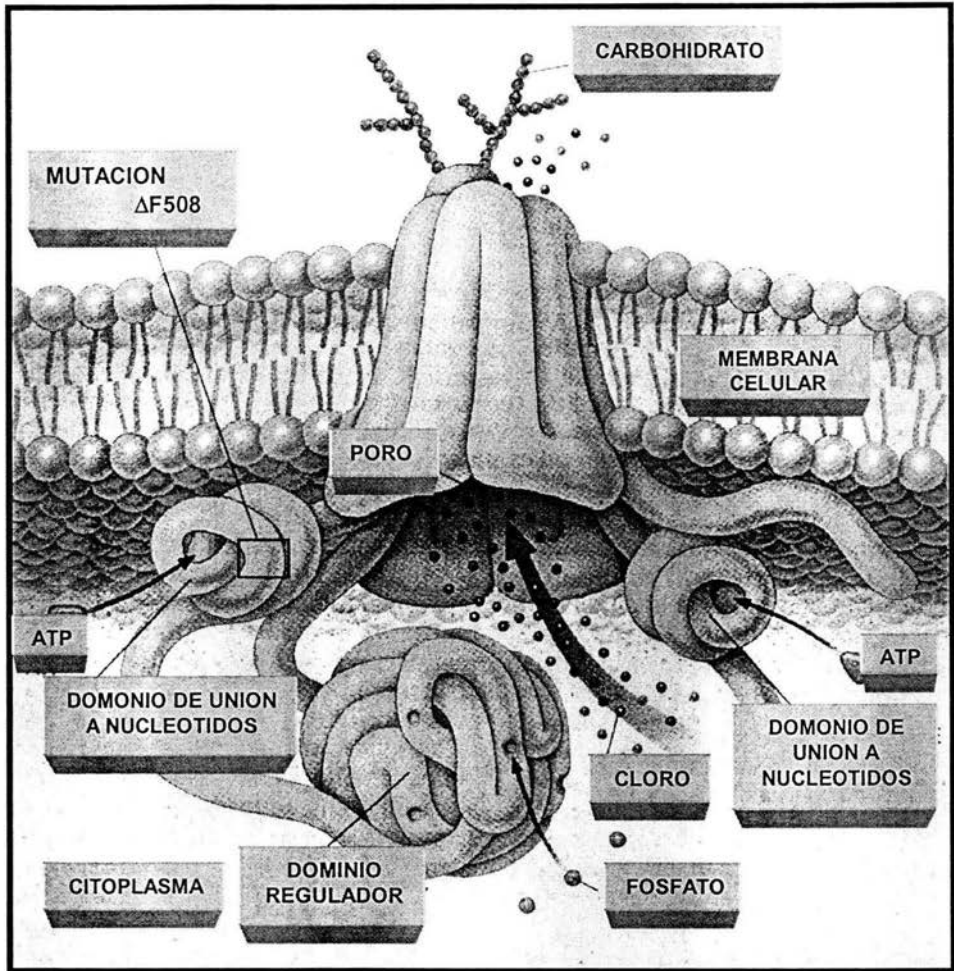


Figura 2. Proteína CFTR. Esquema de la proteína CFTR señalando los dominios que la conforman, dos dominios transmembranales o TM's, dos dominios de unión a nucleótido o NBD's y el dominio regulador, además su ubicación dentro de la célula. Tomada de Welsh y Smith, 1995.

DOMINIOS TRANSMEMBRANALES DE CFTR.

Se ha demostrado que los dominios transmembranales (TMD's) forman el poro del canal a través del cual pasan los iones por la membrana. Se ha sugerido que de los doce segmentos transmembranales (TM's) que forman estos dominios TM5, TM6 y TM12 son los que delimitan la superficie del poro en contacto con el medio hidrofílico (16). Anderson y colaboradores (17) alteraron varios aminoácidos en los TMD's y evaluaron sus efectos en la función del canal CFTR, sugiriendo que cualquier cambio de aminoácidos en esta región que conforma el canal, modifica las fuerzas eléctricas en el poro influenciando una alteración en la selectividad iónica del mismo. Por lo tanto sugirieron que los residuos de TMD1 juegan un papel importante en la conducción y selectividad filtrante del poro CFTR.

Los TM's están ligados unos con otros por 4 asas citoplasmáticas y 6 asas extracelulares las cuales varían de 55 a 65 aminoácidos de largo. Los dos sitios de glicosilación de CFTR se encuentran localizados en residuos de asparagina (N894 y N900) ubicados en la cuarta asa extracelular (11).

DOMINIOS DE UNIÓN A NUCLEÓTIDO DE CFTR.

Los dominios de unión a nucleótidos (NBD's) están involucrados en la apertura y cierre del canal por unión e hidrólisis de ATP, presentan secuencias homólogas conservadas a las de otras proteínas de unión de ATP, incluyendo un sitio Walker A y B y un sitio Linker C. Los sitios A y B son conocidas en algunas proteínas de unión a nucleótido, incluyendo las adenilcinasas, ATPsintetasas y en todas las miembros de la superfamilia de las ATPasas, sin embargo el sitio C llega a ser una característica única de las ATPasas (18).

NBD2 comparte un 29% de homología con NBD1 por estas razones se conforman de una manera muy similar. Además NBD2 hidroliza ATP en menor proporción que NBD1 demostrando que no contribuyen a la regulación del canal de la misma manera (19, 20).

Las mutaciones en NBD1 sólo disminuyen la probabilidad de apertura mientras que las mutaciones en NBD2 o en ambos prolongan la frecuencia de la actividad. Además de su papel en la regulación de la función del canal de cloro los NBD's pueden permitir a CFTR interactúa con otras proteínas (16).

DOMINIO REGULADOR DE CFTR.

El dominio regulador (R), exclusivo de esta proteína, es codificado por el exón 13 del gen FQ y se localiza en la parte citoplasmática de la membrana apical. Esta región presenta una alta proporción de aminoácidos polares (30%) y varios sitios de fosforilación que son importantes para el funcionamiento del canal.

El dominio R en estado inactivo o de desfosforilación mantiene al canal cerrado, mientras que su fosforilación provoca un cambio conformacional asociado con la apertura del canal (21). Este dominio presenta diez sitios fosforilables mediados por PKA, ocho serinas, una treonina y una serina que se localiza antes del NBD1, cambiando su conformación (13).

La activación de CFTR es un proceso que incluye dos pasos: la fosforilación del dominio R por PKA y la unión e hidrólisis de ATP a los NBD's. Se ha propuesto que NBD1 se fosforila después de una fosforilación parcial que sufre el dominio R y permite la apertura del canal, mientras que la fosforilación completa del dominio R conduce a la fosforilación de NBD2 causando el cierre del canal. La dinámica molecular de apertura y cierre del

canal puede ser controlada por las interacciones dominio-dominio entre los tres dominios citoplasmáticos de la proteína y las asas intracelulares altamente conservados (5) (Figura 3).

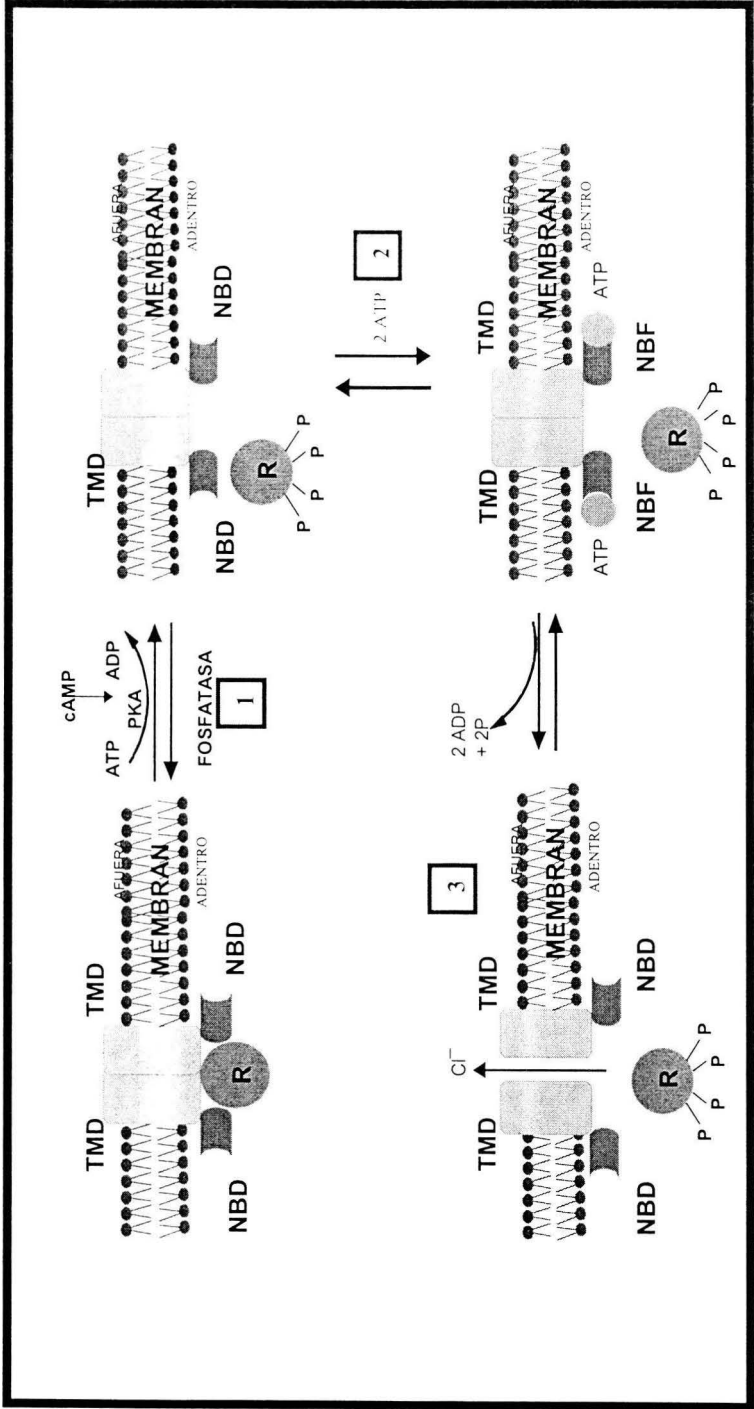


Figura 3. Función de CFTR. La figura muestra el modelo de la función la proteína CFTR. El canal está cerrado cuando no existe fosforilación del dominio R. 1) El cAMP estimula la PKA para fosforilar uno o más residuos de serina en el dominio R. 2) El canal CFTR esta listo para unir ATP. Proceso que inducen un cambio conformacional de la proteína. 3) Canal de cloro abierto. Tomado de Collins 1992.

MUTACIONES EN EL GEN CFTR.

Hasta la fecha se han identificado más de 950 mutaciones diferentes como responsables de la FQ (22). Estas mutaciones son de diversa naturaleza, así, el 50% son mutaciones sentido erróneo o missense que provocan un cambio de un aminoácido por otro, el 22% son deleciones o inserciones que corren el marco de lectura (frameshift), en tanto que el 18% mutaciones son sin sentido o nonsense, mutaciones puntuales que producen codones de terminación, además de estas se han detectado mutaciones que producen una alteración en el splicing anormal (8%) (23).

Por otro lado la distribución de las mutaciones no parece ser al azar, éstas se han detectado predominantemente en sitios especiales (hotspots), dentro de los exones 4, 7, 11, 17b y 20 (24).

De todas las mutaciones descritas la más importante por su frecuencia es la mutación $\Delta F508$, que es una deleción de tres pares de bases en el exón 10 que elimina el codón de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína localizado en el dominio NBD1 (Figura 4). Existe una gran heterogeneidad en el espectro de mutaciones en el gen FQ en las diversas poblaciones. En el caso de la mutación $\Delta F508$ esta presente en el 66% de los cromosomas a nivel mundial, sin embargo su frecuencia varía dependiendo del origen étnico. Va desde un 85% en la población caucásica hasta el 17% en la población de Túnez (25, 23). En poblaciones hispanas varían del 29% en Chile, 62% en Argentina (26), en la población mexicana se ha detectado con una frecuencia cercana al 40% (27, 28).

La mayoría de las mutaciones del gen FQ son poco comunes, aunque algunas son frecuentes en ciertas poblaciones. Por ejemplo, la segunda mutación más frecuente a nivel mundial (G542X) que se encuentra en el 3.4 % de los cromosomas FQ, presenta una frecuencia de 25% en las Islas Canarias

y del 8% en toda España. En México presenta una frecuencia del 6.2% de los cromosomas FQ, similar a lo reportado en hispanos (29).

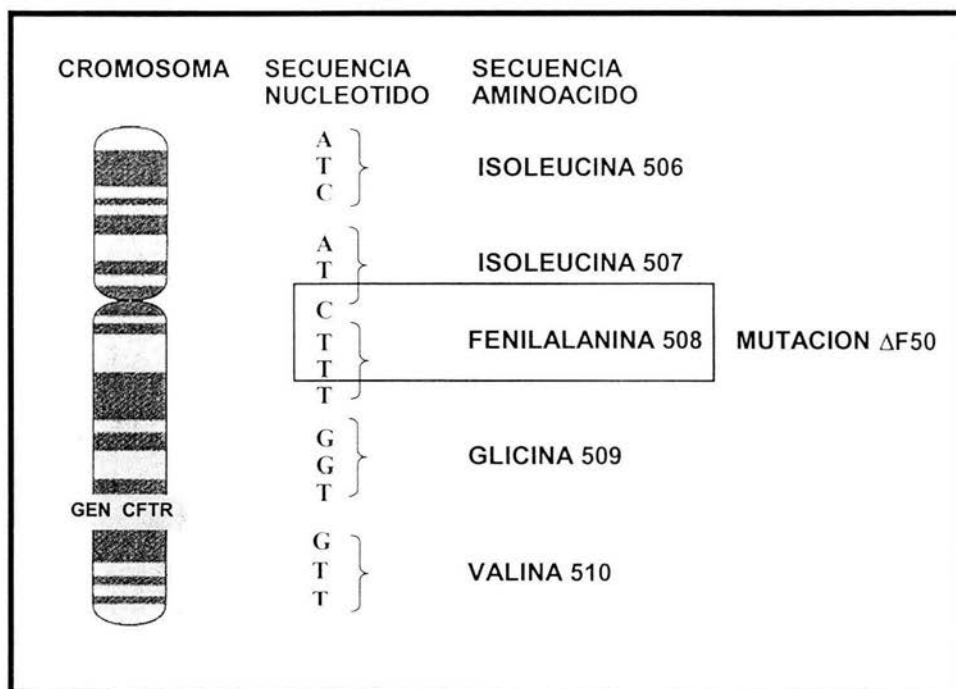


Figura 4. Mutación Δ F508. A la izquierda se muestra un esquema del cromosoma 7 en donde se señala la ubicación del gen CFTR. A la derecha se muestra parcialmente la secuencia nucleotídica y de aminoácidos donde se localiza la mutación Δ F508. Tomada de Welsh y Smith, 1995.

BASES MOLECULARES DE LA DISFUNCIÓN DEL CANAL CFTR.

Para entender más acerca de la fisiopatología de la FQ las mutaciones se han clasificado en cinco clases generales de acuerdo a la manera en como afectan a la proteína (Figura 5):

Clase I. Mutaciones que afectan la biosíntesis de la proteína.

El 50% de las mutaciones en el gen CFTR pertenece a esta clase. En ella se encuentran mutaciones que impiden que se sintetice la proteína CFTR completamente, debido a que se producen codones de terminación (18%), corrimiento del marco de lectura (22%), o splicing anormal (8%) (23).

Clase II. Mutaciones que afectan la maduración de la proteína.

Estas mutaciones generan un bloqueo en el proceso de maduración de la CFTR que conduce a la acumulación de la proteína completamente sintetizada en el retículo endoplásmico, impidiendo que alcance la membrana apical por lo que es degradada rápidamente. Una mutación representativa de esta clase es la mutación $\Delta F508$, que a diferencia de la proteína CFTR normal, la cual tiene una vida media de aproximadamente 24 horas, $\Delta F508$ tiene una vida media de aproximadamente 0.5 horas.

El atrapamiento de la proteína $\Delta F508$ en el retículo endoplásmico parece depender de la temperatura ya que este es reversible a temperaturas subfisiológicas (23° a 30°C). Bajo estas condiciones esta proteína puede pasar al aparato de Golgi para su glicosilación completa y alcanzar la membrana plasmática donde recupera su función de canal de cloro. Teniendo en cuenta que es la mutación más frecuente a nivel mundial estas observaciones aportan posibilidades para el tratamiento de esta enfermedad (23).

Clase III. Mutaciones que afectan la regulación del canal de cloro.

Las mutaciones de esta clase parecen no afectar el proceso de biosíntesis de la proteína ya que se encuentran localizadas en la membrana apical, sin embargo la regulación del canal (apertura y cierre) se ve alterada. Estas mutaciones están presentes en los sitios que codifican para los dominios NBD's o para el dominio regulador (R) que son los que intervienen en estas funciones. El grado de alteración puede variar desde la pérdida grave de la función (G551D), disminución en la respuesta a la estimulación por ATP (S1255P), hasta una leve reducción de la actividad del canal (G551S, G11244E y G1349D) (23).

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

Estas mutaciones afectan a los segmentos transmembranales de la CFTR por lo que, aunque la regulación es adecuada existe una conductancia anormal del canal. Algunas de estas mutaciones en TMD1 se asocian a formas leves de la enfermedad FQ (30). El segundo grupo de los segmentos transmembranales en TMD2 de CFTR ha sido mucho menos estudiado. Sin embargo se conoce un gran número de mutaciones con sentido erróneo (missense) localizadas en el asa 4 entre los segmentos TM10 (exón 17a) y TM11 (exón 17b) de CFTR (31, 32).

Tabacharani y colaboradores (33) demostraron que TM5 y TM6 pueden limitar el poro del canal y que por ejemplo la mutación R347P en TM6 que conduce al cambio de una arginina por una prolina en la posición 347 altera la conductancia y convierte a CFTR en un canal iónico simple. Esta mutación principalmente ocurre de forma natural en pacientes FQ con enfermedad pulmonar leve, demostrándose con esto, que estas mutaciones afectan directamente al poro del canal (34). Ejemplos de otras mutaciones son: R117H en TM2 y la G314E en TM5 (23).

Clase V. Mutaciones que causan reducción en la síntesis de la proteína.

Las mutaciones incluidas en esta clase reducen la transcripción de CFTR. Estas pueden presentarse en la región promotora, o ser mutaciones puntuales que conducen a splicing alternativo o sustitución de aminoácidos que causan una maduración parcial de la proteína. Los alelos con estas mutaciones pueden transcribir una pequeña cantidad de mRNA, o productos de splicing anormal con función ineficiente de CFTR. Estudios bioquímicos recientes muestran que estas proteínas mutantes, aunque se encuentran en baja cantidad, son canales de cloro con regulación y conducción casi normal (23)..

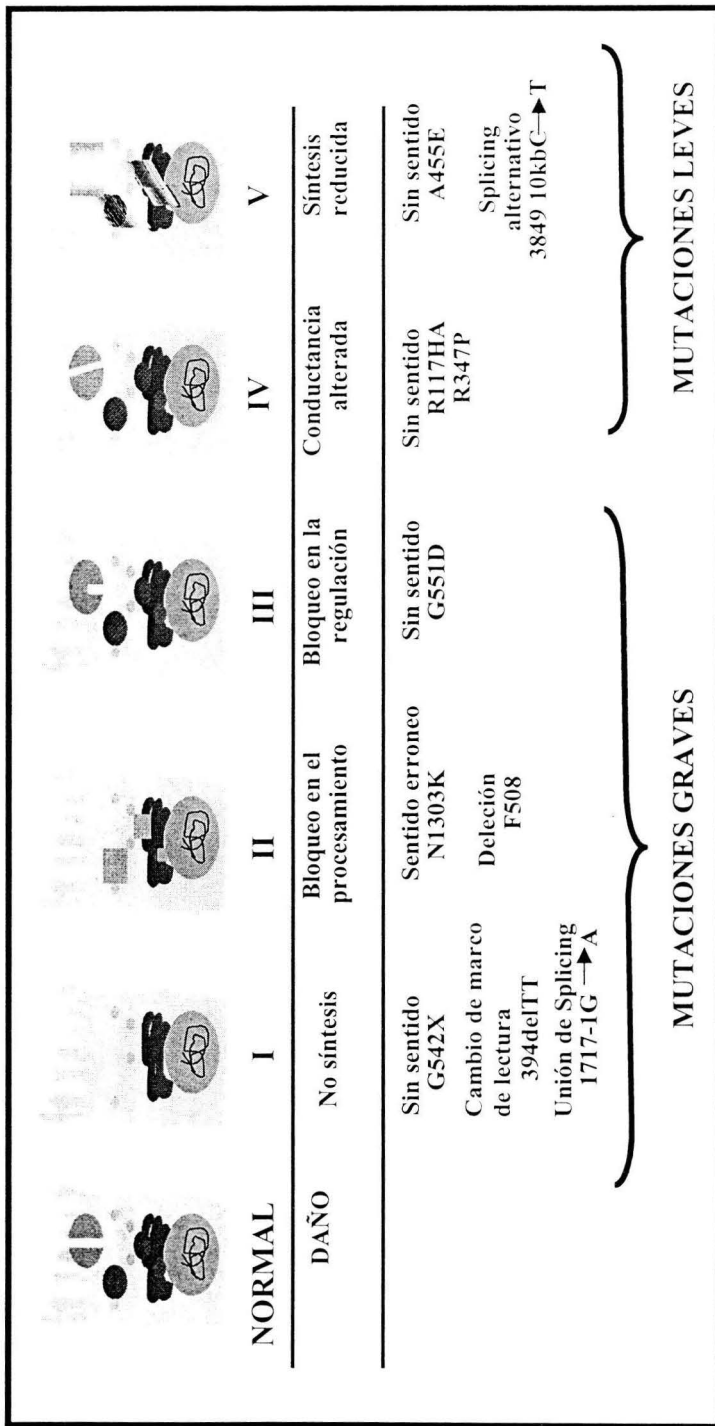


Figura 5. Clasificación de la Mutaciones del Gen FQ. Esquema del daño molecular del canal CFTR en las células epiteliales de acuerdo con las diferentes clases de mutaciones del gen FQ. Tomada de Zielenski y Tsui, 1995.



U.N.A.M. CAMPUS

CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO

Debido al espectro de las consecuencias moleculares de las mutaciones FQ (genotipo) y de acuerdo a las manifestaciones clínicas (fenotipo) de los pacientes, la clasificación general de las mutaciones se divide en graves (clases I, II y III) y leves o moderadas (clases IV y V) (35). Estudios de correlación genotipo-fenotipo en esta enfermedad tienen el propósito de encontrar la relación que existe entre las características clínicas (fenotipo) más comunes entre los pacientes de FQ y el tipo de mutaciones (genotipo).

IZT.

Las manifestaciones pulmonares generalmente son las más frecuentes, y son la principal causa de muerte de estos pacientes, sin embargo estas manifestaciones también están influenciadas por factores ambientales y otros factores genéticos (como genes modificadores), por lo que hasta ahora la función pancreática es la correlación más directa con el genotipo de los pacientes con FQ. Los pacientes insuficientes pancreáticos (IP) generalmente son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones graves, mientras que los pacientes con suficiencia pancreática (SP) presentan al menos una mutación leve en uno de sus cromosomas, así las mutaciones leves son dominantes sobre las graves. (10, 35).

Se conocen pocas mutaciones asociadas a un fenotipo leve, los pocos pacientes con este fenotipo se diagnosticaron en edad adulta presentando niveles normales o intermedios de cloruros en sudor (40-60 mEq/l) y un buen nivel nutricional.

Como tratamiento convencional de la FQ se ofrece fisioterapia torácica, además de algunos antibióticos y suplementos de vitaminas liposolubles y enzimas pancreáticas. Sin embargo el descubrimiento del gen y el conocimiento del defecto básico bioquímico ampliaron el conocimiento sobre la fisiopatológica de la FQ, impulsando a la búsqueda de nuevas e innovadoras



U.N.A.M. CAMPUS

terapias para el tratamiento de ésta enfermedad, como la terapia génica que es la que promete mayores expectativas para la cura de los pacientes con FQ (22). Existen 4 diferentes tipos de estrategias para intentar reparar la pérdida de la función de la CFTR: 1) reemplazar la CFTR mutante con CFTR silvestre, 2) alterar el procesamiento de la CFTR mutante para facilitar su llegada y retención en la membrana apical, 3) incrementar la actividad de los canales mutantes localizados en la membrana apical al alterar la regulación del canal y 4) estimular otros canales de cloro apicales regulados por diferentes vías (10).

ANTECEDENTES

A pesar de los grandes avances para conocer las bases fisiopatológicas de la FQ no se ha logrado caracterizar las mutaciones presentes en todos los cromosomas de los pacientes con FQ. En la población caucásica la búsqueda dirigida de las 5 mutaciones más frecuentes a nivel mundial (Tabla 1) se logró caracterizar cerca del 85% de los alelos afectados (7, 36).

En contraste en las poblaciones latinoamericanas, existe poca información acerca de las mutaciones en el gen FQ y su frecuencia. La mutación $\Delta F508$ fue reportada en estas poblaciones por abajo del 45%, variando de 29% en Chile, 62% en Argentina (26).

En el Instituto Nacional de Pediatría se realizó la búsqueda dirigida de 12 mutaciones, cinco de éstas fueron más frecuentes a nivel mundial ($\Delta F508$, G542X, N1303K, G551D, R553X), el resto son mutaciones frecuentes en hispanos (2869insG, R1162X, 3120+1G-A), y mutaciones con una frecuencia baja a nivel mundial pero detectadas al menos una vez en la población mexicana ($\Delta I507$, S549N, 2055del9-A y 1924del7) (28, 37). En dicho estudio se analizaron 128 cromosomas y se demostró que la frecuencia de $\Delta F508$ es de alrededor del 39% (27), frecuencia que ubica a México como una de las

poblaciones con más baja frecuencia, después de los judíos Askhenazi (30%) y la población chilena (29%) (23). Por otro lado la mutación G542X se detectó en un 6.0% (38), frecuencia más alta que la reportada a nivel mundial (3.4%) (39) y muy similar a la reportada en poblaciones hispanas (8%) (29, 40).

La $\Delta I507$ y N1303K fueron detectadas con una frecuencia del aproximadamente el 2% (41) y 3.0% respectivamente. El resto de las mutaciones se detectaron en menos del 1%.

Con este análisis se logró caracterizar cerca el 57% de las mutaciones en nuestros pacientes por lo que en este trabajo se implementaron las metodologías moleculares necesarias para identificar y caracterizar nuevas mutaciones o mutaciones de baja frecuencia y para detectar a los portadores de la enfermedad con el fin de ofrecer un asesoramiento genético de certeza y establecer nuevas estrategias de prevención y pronóstico de la enfermedad.

	ΔF508 (%)	G542X (%)	G551D (%)	N1303K (%)	G551D (%)
Norte de Europa	70.3	2.11	1.7	1.0	1.9
Sur de Europa	55.0	3.6	0.5	2.5	0.5
Norte de América	66.1	2.2	2.0	1.2	2.0
Centro y Sur de América	45.1	5.0	0.1	1.4	0.1
Australia	89.2	2.2	4.5	0.9	5.9
Asia	28.4	4.4	0.0	4.8	-
África	68.2	1.7	-	1.6	-
Total	66.0	2.4	1.6	1.3	1.6

Tabla 1. Distribución de las Mutaciones más Frecuentes a Nivel Mundial

OBJETIVO GENERAL.

Identificar las mutaciones presentes en los 4 exones con mayor índice de mutaciones en el gen FQ en un grupo de pacientes mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Detectar las cuatro mutaciones más frecuentes en el gen FQ en un grupo de pacientes con diagnóstico clínico de FQ.
2. Determinar la frecuencia de las mutaciones presentes en pacientes mexicanos con FQ y compararla con lo descrito en la literatura.
3. Analizar los exones 7, 11, 13a y 17b del gen CFTR mediante la técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)

MATERIAL Y MÉTODOS

ESTRATEGIA GENERAL

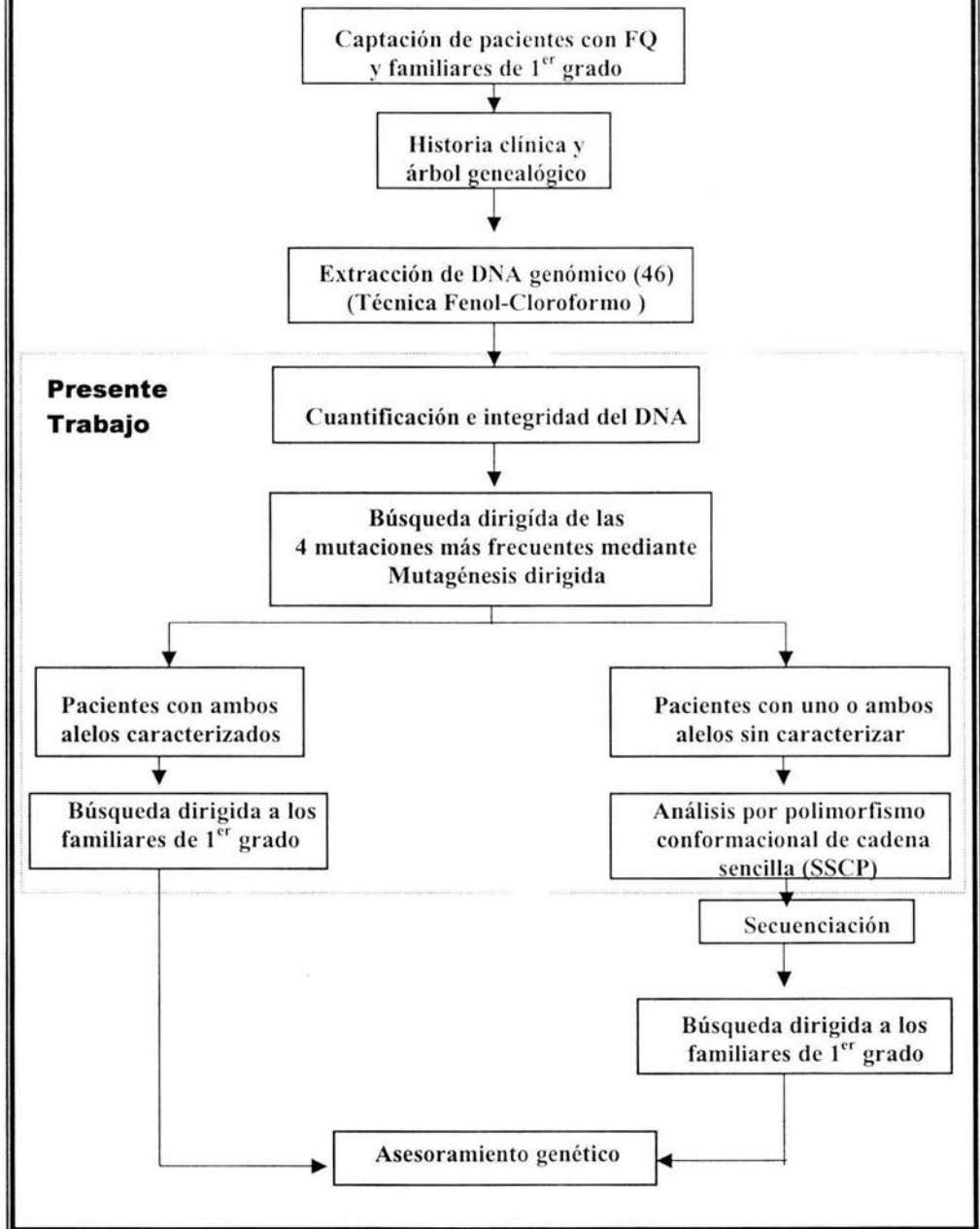
Criterios de Inclusión

Para la realización del presente trabajo se contó con un banco de DNA de pacientes con diagnóstico clínico de FQ, del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría (INP). Los criterios de inclusión para la formación del banco de DNA se basó en la presencia de al menos dos de las siguientes parámetros: 1) cuantificación de cloruros en sudor mayor a los 60 mEq/l (43), 2) afección pulmonar grave con infecciones recurrentes y persistentes especialmente por *Pseudomona aeruginosa* y 3) insuficiencia pancreática valorando la concentración de grasa en heces mayor a 7g/d (44). Los pacientes se captaron de la consulta externa del INP y de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ).

Criterios de Exclusión

Se excluyeron pacientes transfundidos en los últimos tres meses, así como pacientes con padecimientos infecto contagiosos por razones de seguridad del personal de laboratorio.

ESTRATEGIA GENERAL



1. CUANTIFICACION E INTEGRIDAD DE DNA.

El DNA obtenido del banco fue midiendo la densidad óptica a una longitud de onda (λ) de 260 nm y sustituyendo los datos obtenidos en la siguiente fórmula (45):

$$[\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{DO}_{260})(F)(\text{Factor de dilución})$$

donde:

DO_{260} : Densidad óptica a una λ de 260 nm

F: Constante equivalente a 0.05 (1 D.O.) = 50 μg de DNA

Factor de dilución: Equivalente a 1:250 μl

La integridad del DNA se evaluó con electroforesis en geles de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. La integridad fue considerada óptima cuando se observó una banda nítida de alto peso molecular.

2. Búsqueda dirigida de las 4 mutaciones más frecuentes en México.

La búsqueda dirigida de las cuatro mutaciones más frecuentes descritas previamente en nuestra población (ΔF508 , G542X , N1303K y ΔI507) (28) se llevó a cabo mediante técnica de mutagénesis sitio dirigida (PSM) mediada por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para llevar a cabo esta metodología se sintetizaron un par de oligonucleótidos (Tabla 2) donde se introdujo una mutación en uno de ellos, los cuales flanquean la secuencias en donde se encuentran cada una de las mutaciones mencionadas. Así, el producto de amplificado por PCR lleva una mutación puntual intencional que crea un sitio de restricción para una enzima específica en el alelo normal o en el alelo mutado, lo que permite distinguirlos uno del otro para (46). Después de

la digestión, se realizó una electroforesis de los fragmentos en geles de poliacrilamida al 9.2%.

La búsqueda de estas mutaciones se realizó primero en todos los casos índice y posteriormente en los familiares de primer grado de aquellos pacientes informativos para alguna de las mutaciones.

La amplificación por PCR para el análisis de estas mutaciones se realizó en un termociclador (Gene-Amp 9600, Perkin Elmer) bajo las condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°	5 minutos	1
94°	20 segundos	} 30
55°	20 segundos	
72°	30 segundos	
72°	10 minutos	

La mezcla de reacción para las amplificaciones de cada mutación contenía 2 U de Taq polimerasa, amortiguador para la Taq polimerasa (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 25 mM de MgCl₂, 400 μM de dNTPs, 200 ng de cada oligonucleótido correspondiente y 1 μg del DNA de los pacientes todo en un volumen final de 25 μl. Posteriormente se verificó la presencia y tamaño de los amplificados con electroforesis en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio.

MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN	SECUENCIA
		5'.....3'
ΔF508	Exón 10	F*GCACCATTAAAGAAAATAT <u>G</u> AT R CATTACAGTAGCTTACCCA
G542X	Exón 11	F CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT R*CACTCAGTGTGATTCCACCTT <u>C</u> AC
N1303K	Exón 21	F GAAATATTTTACAATACAATAAGGG R*CTCCACTGTTCATAGGGATC <u>T</u> AA
ΔI507	Exón 10	F*GCCTGGCACCATTAAAGAAA <u>G</u> ATC R CTAACCGATTGAATATGGAGCC

Tabla 2. Secuencia de Oligonucleótidos empleados en PSM.

Nota: Los oligonucleótidos que introducen la mutación están indicados con * y la base que introduce la mutación en el producto de amplificado está subrayada.

Una vez obtenidos los amplificados de interés se tomaron 15 µl del producto de reacción y se sometieron a una restricción con una enzima específica para cada mutación incubándolos a 37°C durante toda la noche. Posteriormente los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 9.2%, tiñéndolos con bromuro de etidio. En la Tabla 3 se muestran los tamaños de amplificado y las enzimas de restricción para cada mutación.

Mutación	Tamaño del Amplificado (pb)	Enzima de Restricción	Fragmentos de Digestión (pb)	Alelo Cortado
ΔF508	219	Mbo I	202 + 17	Normal
G542X	180	Hph I	168 + 12	Normal
N1303K	144	Dde I	123 + 21	Normal
ΔI507	181	Bgl II	157 + 24	Mutado

Tabla 3. Enzimas de Restricción Utilizadas para la PSM.

Aquellos pacientes que por la técnica de PSM resultaron con un alelo sin caracterizar se les realizó el análisis de 4 exones por la técnica de SSCP.

3. Análisis de Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP).

La técnica de SSCP se fundamenta en el principio de que las moléculas de DNA de cadena sencilla adquieren estructuras secundarias de acuerdo a su secuencia específica, por lo tanto las moléculas con una alteración adoptan conformaciones secundarias distintas y presentar un patrón electroforético distinto en geles de poliacrilamida (Figura 7) (47).

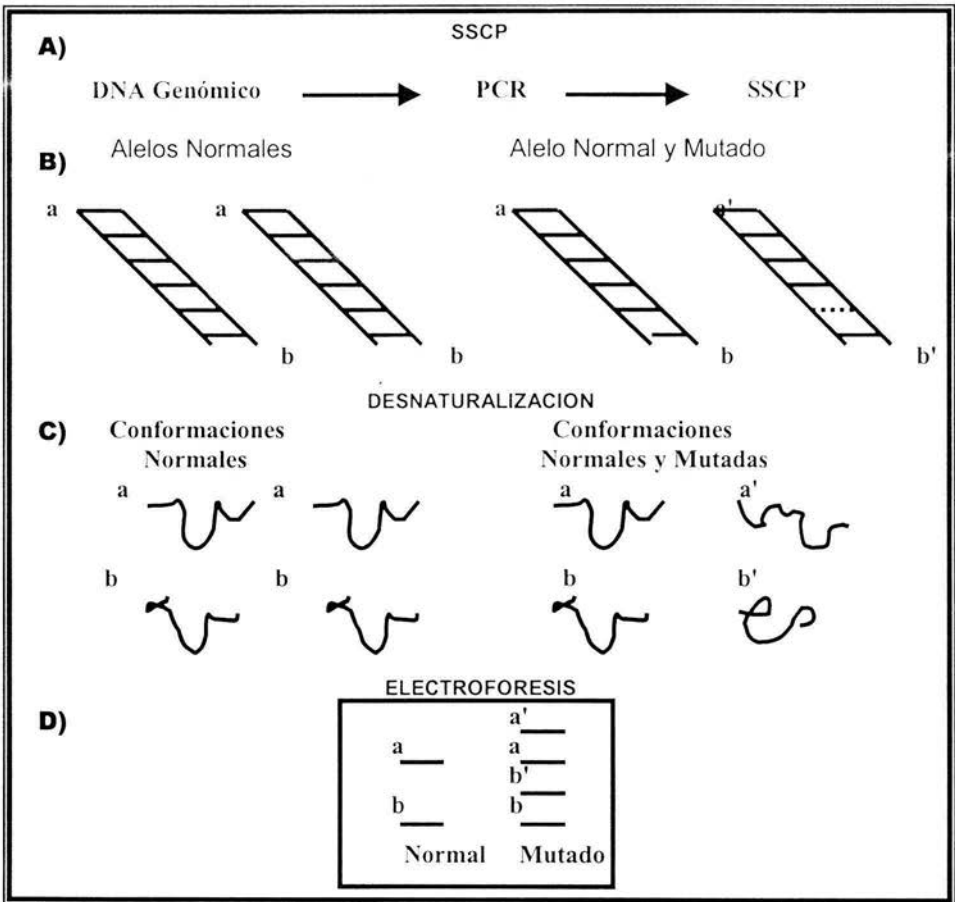


Figura 6. Técnica de SSCP. Esquema representativo de la técnica de SSCP en donde se observa que un cambio en la secuencia de DNA ocasiona una conformación secundaria diferente en la cadena de DNA y por lo tanto el patrón electroforético se ve alterado. A) a partir de DNA genómico se realiza el PCR y posteriormente la técnica de SSCP, B) se ejemplifica la presencia de dos alelos normales o un alelo normal y uno mutado en un organismo, C) las cadenas de DNA mutadas dan conformaciones diferentes a las normales y D) el patrón electroforético de las cadenas de DNA mutadas es diferente a la de las normales.

Mediante SSCP se analizaron 4 exones del gen CFTR, 7, 11 13a y 17b considerados como puntos calientes o sitios con mayor susceptibilidad a presentar mutaciones en el gen.

Para el análisis de SSCP se amplificó cada uno de los exones mencionados en las condiciones previamente descritas para PMS solo que en este caso los productos amplificados se marcaron con 1 uCi de αP^{32} . Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 4, Posteriormente a la amplificación se tomaron 3 μ l de estos amplificados y se llevaron a un volumen final de 10 μ l con solución Stop, esta mezcla se desnaturalizó a una temperatura de 94°C por 10 minutos, para después someter estas muestras a un choque térmico en un baño de hielo, para mantener separadas las cadenas de DNA.

Posteriormente las muestras se corrieron en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida, utilizado una cámara de 450mm x 35mm x 4mm acondicionada con un sistema de enfriamiento (RCB 500 Hoefer) con el propósito de mantener la temperatura constante (entre 20 y 15°C) durante el corrimiento y variando los tiempos de corrimiento de 15 a 35 horas. Para establecer las condiciones óptimas de eficiencia de los parámetros las muestra se corrieron en diferentes geles no desnaturalizantes mostrados en la Tabla 5 en donde además se muestran las diferentes condiciones de acrilamida/bis-acrilamida (crosslinking) para cada gel, así como el voltaje de corrida en la electroforesis y el tipo de amoriguador.

Posteriormente los geles se secaron a 80°C por una hora y se expusieron en placas autorradiográficas (48).

Aquellas muestras que presentaron un cambio en el patrón electroforético en el SSCP sugieren que existe un cambio en la secuencia del fragmento de DNA analizado, por lo que posteriormente deben secuenciarse

para caracterizar las posibles mutaciones o polimorfismos en la secuencia de DNA de los pacientes analizados.

EXON	SECUENCIA 5'.....3'	TAMAÑO DE AMPLIFICADO (pb)
7	F AGACCATGCTCAGATCTTCCAT R GCAAAGTTCATTAGAAGTACTGATC	410
11	F CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT R GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT	425
13 ^a	F TGCTAAAATACGAGACATATTGCA R ATCTGGTACTAAGGACAG	528
17b	F TTCAAAGAATGGCACCAGTGT R ATAACCTATAGAATGCAGCA	463

Tabla 4. Secuencia de Oligonucleótidos Empleados en SSCP.

Gel	Concentración de		Amortiguador	Volts de corrida
	Poliacrilamida (%)	% Crosslinking		
MDE				
Poliacrilamida-Sacarosa 10%	10	1.3	TBE 1X	1000-1500
Poliacrilamida-Sacarosa 10%	10	3.3	TBE 0.8X	1000-1500
Poliacrilamida-Sacarosa 10%	10	2.5	TBE 0.8X	1000-1500
Poliacrilamida-PEG 5%	12	2.5	Ac. Fórmico	1000
(Markoff <i>et al.</i> 1997)				
Poliacrilamida-Glicerol 10%	10	3.3	TBE 0.8X	1000-1500
Poliacrilamida-Sacarosa 10%	6	2.5	TBE 0.8X	1000-1500
*Acrilamida-Sacarosa 10%	6	2.5	TBE 0.5X	600

Tabla 5. Geles Empleados para Estandarizar la Técnica de SSCP

Nota. *condiciones óptimas de corrida empleadas para el análisis de los cuatro exones del gen CFTR.

RESULTADOS.

1. Integridad del DNA

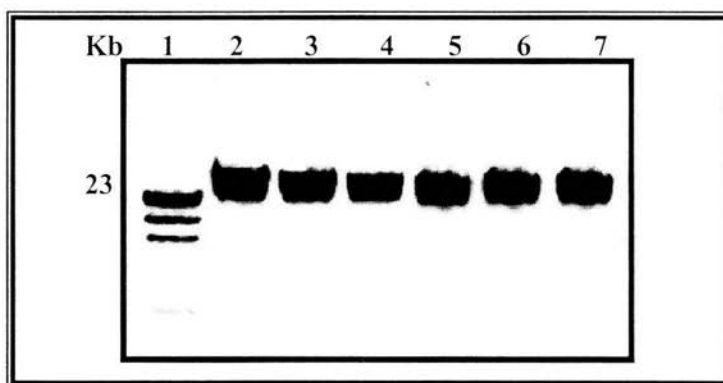


Figura 7. Integridad de DNA. DNA de linfocitos de sangre periférica en un Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de pesos moleculares λ *Hind* III, Carril 2-7: muestran la presencia de DNA integro.

2. Búsqueda Dirigida de las 4 Mutaciones más Frecuentes en México.

Δ F508:

Para el análisis de la mutación Δ F508 se obtuvo un amplificado de 219 pb que al cortar con la enzima *Mbo*I permite diferenciar los alelos normales de los mutados. Los alelos sin la mutación Δ F508 son cortados por la enzima, generando dos fragmentos uno de 202 pb y otro de 17 pb, mientras que los alelos con la mutación no son reconocidos por la enzima por lo que se obtiene solo un fragmento de 219 pb. Por lo tanto pacientes con mutaciones distintas a la Δ F508 o individuos normales presentan la banda de 202 pb, los pacientes homocigotos para la Δ F508 muestran una banda de 219 pb; en tanto que los pacientes heterocigotos compuestos con la mutación Δ F508 y los portadores

de esta misma mutación tiene la banda de 202 y 219 pb y un fragmento heteroduplex producto del rearrreglo en PCR entre las cadenas de DNA de alelos normales y mutados. (Figura 8).

Los resultados de este estudio mostraron que la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ es del 40.7%, igual a lo reportado por nuestro grupo en 2000 (40.72%) (28), encontrando 19 (16.7%) pacientes homocigotos y 45 (21.4%) pacientes heterocigotos compuestos.

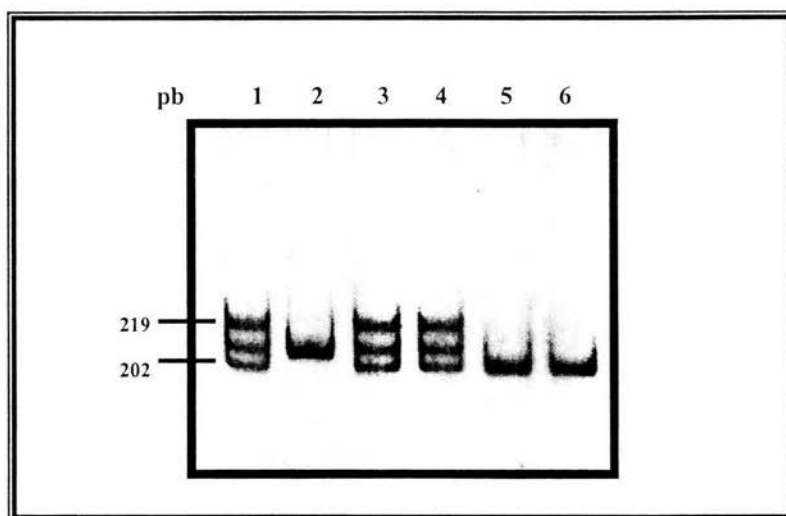


Figura 8. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por PSM. Gel de poliacrilamida al 9.2% que muestra los productos digeridos con MboI. Carril 1: control heterocigoto $\Delta F508/X$, carril 2: caso índice homocigoto $\Delta F508$ ($\Delta F508/\Delta F508$), carril 3: madre portadora ($\Delta F508/N$), carril 4: padre portador ($\Delta F508/N$), carril 5: hermano normal (N/N), carril 6: control normal (N/N).

G542X

Esta mutación se localiza en el exón 11 del gen FQ y provoca el cambio de una glicina por un codón de paro en la posición 542 de la proteína. En el análisis de esta mutación se obtuvo un producto amplificado de 180 pb, que al ser digerido con la enzima HphI se obtuvieron fragmentos de 168 y 12 pb en el alelo normal, en tanto que el alelo con la mutación G542X no fue reconocido por la endonuclease de restricción. Por lo tanto aquellos pacientes que fueron homocigotos para esta mutación presentaron sólo la banda de 180 pb mientras que aquellos que presentaron la mutación en uno de sus alelos (heterocigotos compuestos y los portadores) presentaron una banda de 168 pb y una de 180 pb (Figura 9).

El análisis de esta mutación mostró una frecuencia del 6.1%, similar a lo reportado previamente en nuestro grupo (28), encontrando 3 (2.7%) pacientes homocigotos y 9 (4.0%) pacientes heterocigotos compuestos.

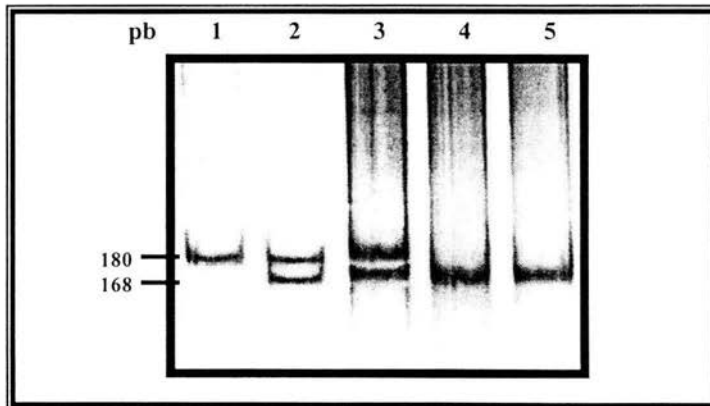


Figura 9. Análisis de la mutación G542X por PSM. Gel de poliacrilamida al 15.0% que muestra los productos de amplificación y digeridos con HphI. Carril 1: caso índice homocigoto G542X (G542X/G542X), carril 2: madre portadora (G542X/X), carril 3: padre portador (G542X/X), carril 4: hermano sano (N/N), carril 5: control normal (N/N).

N1303K

Esta mutación se localiza en el exón 21 del gen FQ y provoca el cambio de una asparagina por una lisina en el codón 1303 de la proteína. Para el análisis de la mutación N1303K el tamaño de amplificación fue de 144 pb donde el alelo normal digerido con la enzima Ddel generó dos fragmentos (123 pb y 21 pb), mientras que el alelo mutado permaneció intacto como un fragmento de 144 pb. Por lo tanto los pacientes heterocigotos compuestos y los portadores para esta mutación presentan una banda de 144 pb y otra de 123 pb (Figura 10).

La frecuencia de esta mutación fue del 2.06%, encontrando 5 pacientes heterocigotos compuestos, 2 de estos pacientes con la mutación N1303K en uno de sus alelos y el otro alelo la mutación $\Delta F508$, los otros 3 pacientes uno de sus alelos con N1303K y en el otro una mutación aún no caracterizada.

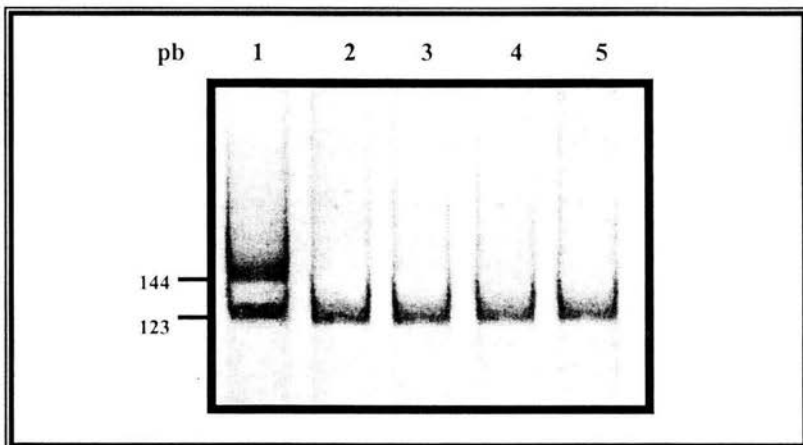


Figura 10. Análisis de la mutación N1303K por PSM. Gel de poliacrilamida al 9.2% que muestra los productos de amplificación después de la restricción con Ddel. Carril 1: control heterocigoto (N1303K/X), carril 2 al 5: pacientes con mutaciones distintas a la N1303K.

$\Delta I507$

Esta mutación se localiza en el exón 10 del gen FQ y es una delección del codón 507 de la proteína CFTR que codifica para isoleucina. En el análisis de la $\Delta I507$ el amplicón fue de 181 pb que al ser cortado con la enzima BglII se obtuvieron dos fragmentos uno de 157 pb y otro de 24 pb que correspondieron al alelo mutado, mientras que en los alelos normales para esta mutación se obtuvo un fragmento de 181 pb integro. Con este análisis de detección para la mutación $\Delta I507$ se logra distinguir alelos $\Delta F508$, la cual es una mutación aledaña, observándose en el caso de pacientes heterocigotos compuestos $\Delta I507/X$ la banda de 181 pb y dos bandas superiores que son heteroduplex y sirven como marcadores.

En los pacientes heterocigotos compuestos $\Delta I507/\Delta F508$ se observan dos bandas, la banda de 181 pb que refleja el alelo con una mutación distinta a la $\Delta I507$ y la de 157 pb que muestra el alelo mutado $\Delta F508$. En el caso de los portadores $\Delta I507$ y un alelo normal se detectaron 3 bandas, la mutada (157 pb), la normal (181 pb) y una banda superior a estas que es un heteroduplex. (Figura 11).

Esta mutación se detectó con una frecuencia del 2.5%, encontrando 1 paciente homocigoto y 4 pacientes heterocigotos compuestos con la mutación $\Delta F508$.

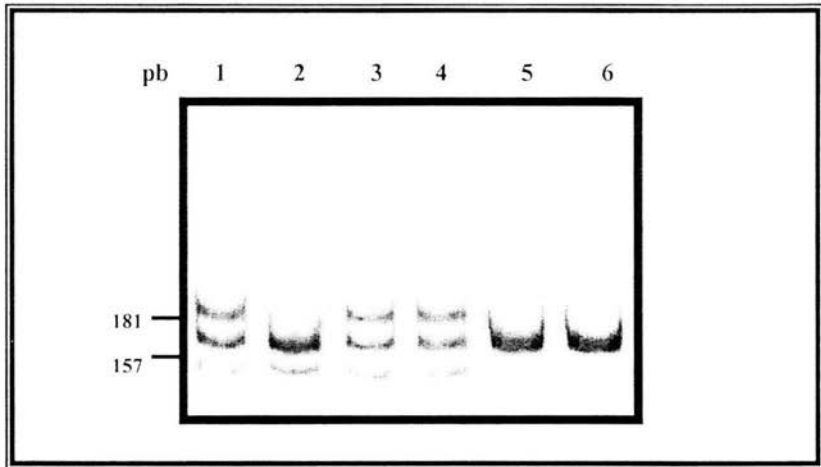


Figura 11. Análisis de la mutación $\Delta I507$ por PSM. Gel de poliacrilamida al 9.2% que muestra los productos de amplificado después de la digestión con la enzima BglIII. Carril 1: control heterocigoto ($\Delta I507/N$), carril 2: paciente heterocigoto $\Delta I507$ ($\Delta I507/\Delta F508$), carril 3: madre portadora ($\Delta I507/N$), carril 4: paciente heterocigoto ($\Delta I507/N$), carril 5 y 6: pacientes con mutaciones distintas a la $\Delta I507$.

El análisis de las cuatro mutaciones más frecuentes en la población mexicana por PSM permitió identificar el 56.66% de las mutaciones presentes en los alelos del gen FQ. De los 130 pacientes analizados al 36.08% se les logró caracterizar ambos alelos, el 41.23% de ellos fueron heterocigotos compuestos con un solo alelo caracterizado y 22.68% presentaron ambos alelos sin caracterizar.

En la tabla 6 se muestra la frecuencia de cada una de las mutaciones. En donde de los 130 pacientes analizados se encontró que la mutación con mayor frecuencia fue la $\Delta F508$ con una frecuencia del 40.7% en los cromosomas de FQ, en donde 19 (16.7%) de estos pacientes presentaron esta

mutación en ambos alelos y 48 (21.4%) fueron heterocigotos compuestos. La segunda mutación más frecuente fue la G542X presente en el 6.1% de los alelos, siguiendo en frecuencia se encontró a la mutación Δ I507 con 2.5% y por último a la mutación N1303K con un 2.06%

MUTACIÓN	NO. CROMOSOMAS AFECTADOS	FRECUENCIA (%)
Δ F508	83	40.7
G542X	15	6.1
N1303K	5	2.06
Δ I507	6	2.5
TOTAL	109	56.6

Tabla 6. Mutaciones más frecuentes en México.

3. Análisis de SSCP.

Los pacientes que después del tamizaje preliminar resultaron con al menos un alelo sin caracterizar (n=87) se sometieron al análisis de SSCP, analizando 4 exones (7, 11, 13a y 17b) del gen CFTR considerados con mayor índice de mutación.

De los 87 pacientes estudiados por SSCP se identificaron 21 (24%) pacientes con patrones electroforéticos alterados, sugiriendo la presencia de una alteración en la secuencia del gen CFTR en los exones analizados en las figuras 14, 15, 16, 17 se muestra el análisis por SSCP de los exones , 7, 11, 13a y 17b. La mayoría de estos cambios se localizaron en el exón 17b (12 pacientes), siguiendo en frecuencia el exón 11 con 5 pacientes y el 7 y 13a con dos pacientes cada uno (Tabla 7).

Los cambios óptimos electroforéticos fueron observados empleando geles no desnaturizantes de poliacrilamida-sacarosa al 10% con una concentración de acrilamida de 6% y un crosslinking de 2.5%, corriendo a 600 voltios durante 35 horas con amortiguador TBE 0.5X y una temperatura constante de 15°C. Algunos cambios electroforéticos se observaron a temperatura ambiente (28°C y con un mayor tiempo de corrimiento).

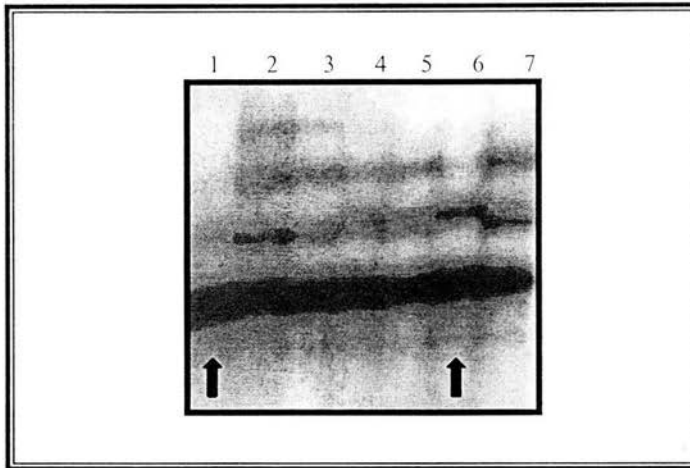


Figura 12. Análisis del exón 7 por SSCP. Carril 2, 3, 4, 5, 7 patrones electroforeticos normales, carril 1, 6 muestran patrones electroforeticos alterados de dos pacientes de FQ.

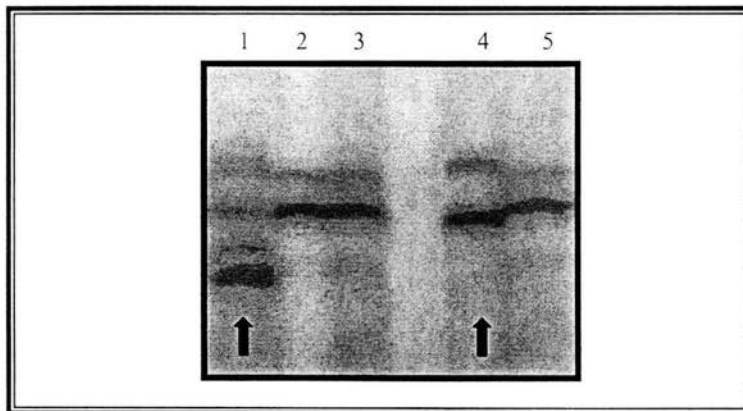


Figura 13. Análisis del exón 11 por SSCP. Carril 2,3,5 patrones electroforeticos normales, carril 1, 4 patrones electroforeticos alterados de pacientes con FQ.

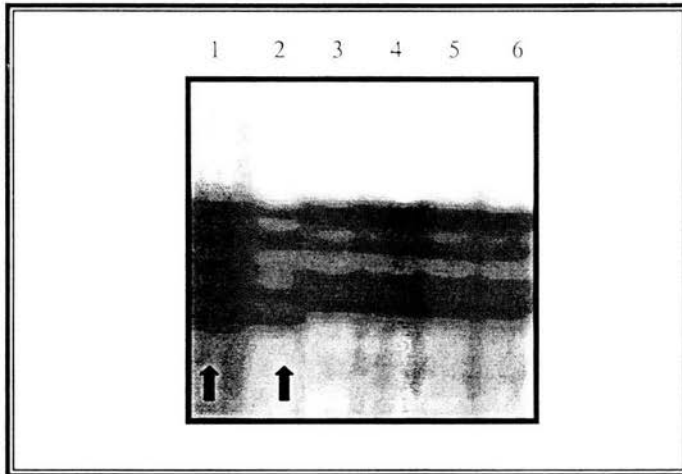


Figura 14. Análisis del exón 13^a por SSCP Carril 3, 4, 5, 6 patrones electroforeticos normales, carril 1, 2 patrones electroforeticos alterados de dos pacientes de FQ.

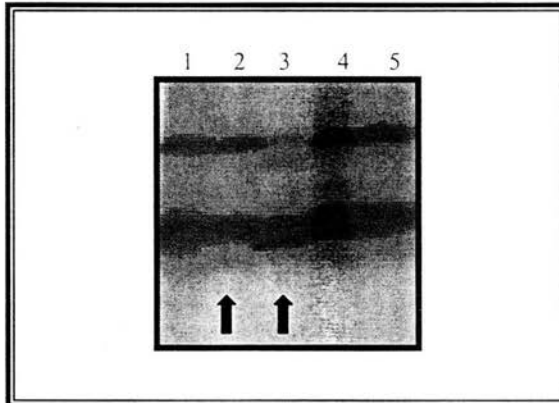


Figura 15. Análisis del exón 17b por SSCP. Carril 1, 4, 5 patrones electroforeticos normales, carril 2, 3 patrones electroforeticos alterados de dos pacientes de FQ.

EXONES	DOMINIO QUE CODIFICAN	PACIENTES INFORMATIVOS PARA SSCP % (n=87)
7	TMD1	2.3
11	NBD1	5.7
13a	R	2.3
17b	TMD2	13.8
TOTAL		24.1

Tabla 7. Exones del Gen FQ Analizados por SSCP.

Mediante la técnica de SSCP se analizaron los paciente con al menos un alelo desconocido después de la primera búsqueda mediante PSM, realizando este análisis en los exones con mayor índice de alteraciones (4, 11, 13a y 17b), esto con el fin de caracterizar el espectro de mutaciones. Esta estrategia nos permitió identificar 21 pacientes con un cambio electroforético indicándonos la presencia de una alteración en el DNA, indicándonos un 16% de alteraciones identificadas, resultados que incrementan el nivel de detección de alteraciones en nuestra población. Sin embargo el porcentaje de alelos caracterizados aún es bajo en comparación con otras poblaciones como el sur de Francia en donde se han identificado un total de 40 mutaciones que representa el 91% de los cromosomas caracterizados (49), en el noreste de Italia en donde 22 mutaciones caracterizan el 90% de los alelos FQ (50), en Grecia el 74.5% de los alelos se caracterizó con 21 mutaciones (51) y el España 75 mutaciones representan 90.2% de los alelos afectados (29).

DISCUSIÓN.

En México la FQ es una enfermedad que frecuentemente se enmascara con otros padecimientos comunes en nuestro medio, como la desnutrición, problemas gastrointestinales y enfermedades respiratorias crónicas, entre otras. La prueba diagnóstica clínica hasta ahora, para detectar la FQ es la determinación de cloruros en sudor, sin embargo este diagnóstico presenta dos desventajas: 1) algunos de los pacientes presentan cloruros en sudor entre el límite normal y el anormal y 2) no se pueden detectar portadores. En contraste con lo anterior el diagnóstico molecular, de esta enfermedad permite detectar las mutaciones responsables de la FQ y con ello la posibilidad de definir el pronóstico de la enfermedad y su tratamiento oportuno así también es posible la detección de portadores y la prevención de la enfermedad mediante el asesoramiento genético de certeza en las familias afectadas y el diagnóstico prenatal.

A la fecha en el gen de CFTR se han descrito más de 950 mutaciones, presentando la mayoría una frecuencia menor al 1%. Sin embargo la gran variación de estas mutaciones en el gen FQ en los distintos grupos étnicos provoca que en algunas poblaciones con poco mestizaje o endogámicas predominen una o dos mutaciones, como en la población Caucásica y de Judíos Ashkenazi, donde al realizar la búsqueda dirigida de cinco mutaciones en pacientes con FQ se logra caracterizar el 85 y 96% de los alelos afectados respectivamente (36).

Sin embargo en poblaciones con un alto grado de mestizaje existe una gran variación de mutaciones, como es el caso de nuestra población, en donde el uso de nuevas estrategias para la búsqueda de mutaciones como la técnica de SSCP, y un reporte previo de mutagénesis dirigida de 12 mutaciones reportadas con alta frecuencia a nivel mundial o en poblaciones hispanas (28, 37) posteriormente solo se logró caracterizar cerca del 57% de los alelos

afectado, resultados muy similares a los que se informan en otro estudio realizado en el norte México en donde se reporta el 56.3% de alelos caracterizados realizando un tamizaje de 16 mutaciones en una muestra de 40 pacientes de FQ (52). Estos hallazgos sugieren que muchas de las mutaciones presentes en nuestra población que aún no están caracterizadas pueden ser exclusivas de nuestra población, como las siete mutaciones nuevas (1924del7, 2055del9-A, W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG y 297-1G→A) descritas por nuestro grupo. (28, 37).

En este estudio con el análisis dirigido de las mutaciones Δ F508, G542X, Δ I507 y N1303K se corroboraron las frecuencias reportadas previamente por nuestro grupo de trabajo (53), además la frecuencia de la mutación Δ F508 fue similar a lo que se describe en otras regiones de México (45% y 34.4%) (52, 54). Esta frecuencia nos ubica dentro de las poblaciones con más baja frecuencia a nivel mundial después de los judíos ashkenazi (30%) (36) y chilenos (29%) (26).

En tanto que la mutación G542X, la segunda mutación más frecuente en nuestra población y cuya frecuencia sólo se ha reportado en México por nuestro grupo fue mayor a la que se reporta a nivel mundial (3.4%) (14) y muy similar a lo que se reporta para España (8%) (29, 40).

La mutación Δ I507, la tercera más frecuente encontrada en este estudio a pesar de que a nivel mundial se reporta como una mutación rara con una frecuencia menor al 1% hay poblaciones como Francia y el sur de Australia que la reportan como una de las mutaciones con mayor frecuencia (55, 22). La baja frecuencia de esta mutación puede deberse a que en la mayoría de los estudios no se realiza la búsqueda dirigida de esta, ya que realizar el análisis mediante PSM para la mutación Δ F508 esta se podría enmascarar ya que ambas mutaciones se localizan en codones contiguos, además un paciente

heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$ presenta un patrón electroforético como un homocigoto $\Delta F508$ debido a que en el PCR solo se amplifica el alelo mutado para $\Delta F508$ por una doble falla en la alineación de los primers, resultado del cambio de una base en uno de los primers para la PSM y la deleción del codón 507 (41).

La mutación N1303K fue la cuarta mutación más frecuente con 2.06%, similar a lo que se reporta a nivel mundial (1.3%) (22) y por nuestro grupo (28).

Con este análisis se logró caracterizar cerca del 57% (Tabla 6) de los alelos afectados de pacientes con FQ. Para caracterizar mayor número de mutaciones en el resto de los alelos, se analizaron 4 exones con mayor susceptibilidad a presentar mutaciones mediante la técnica de SSCP (47). Así se analizaron 87 pacientes que presentaron al menos un alelo caracterizado con el propósito de identificar la mayoría de los alelos de los pacientes mexicanos de FQ.

Datos de la eficiencia de la técnica de SSCP reportan rangos de 35% hasta cercanos a 100%, aunque los parámetros que influyen en la información necesaria del método no han sido evaluados. Orita y colaboradores (47) reportan un 100% de eficiencia del método, al detectar 12 de 12 mutaciones conocidas en varios genes humanos RAS. Otro grupo de investigación reporta una eficiencia del 73 y 35% en el tamizaje de mutaciones de pacientes con hemofilia B (56). Michaud y colaboradores (57) utilizando una combinación de tres factores electroforéticos detectando 20 de 20 mutaciones conocidas en el gen ornitina Δ -aminotransferasa.

Glavac y Dean (48) reportaron la concentración y el crosslinking como los factores más importantes para optimizar el patrón de separación de bandas en geles de SSCP en pacientes de FQ, observando los mejores resultados en un rango de acrilamida del 5 al 8%, con un crosslinking de 2.6% y comprobaron

que al agregar 10% de glicerol o sacarosa los modelos de separación de las bandas presentan una mejor resolución. En este estudio empleando la técnica de SSCP se analizaron los 4 exones mencionados del gen CFTR. Después de evaluar diferentes parámetros se logró identificar 21 pacientes que presentaron cambios conformacionales, lo que sugiere la presencia de una alteración en la secuencia del DNA. Las condiciones de electroforésis óptimas fueron: geles de poliacrilamida al 6% y sacarosa al 10%, con un crosslinking de 2.5% a una temperatura constante de 15°C, con amortiguador TBE 0.5X, con un tiempo de corrida de 36 horas a 7 watts.

Nuestro grupo de trabajo realizó un estudio previo de la población mexicana empleando la técnica de SSCP en el rastreo de 7 exones del gen CFTR (4, 7, 11, 13a, 13b, 19, 21), encontrando un 26% de alteraciones con esta técnica de un total de 101 casos índice, la mayoría de estas en el exón 10 seguidas del exón 11, documentando dos mutaciones poco frecuentes a nivel mundial (SN49N y G551S) y dos mutaciones que sólo se han reportado en la población mexicana (2055del9-A y 1929del7) (37).

El Consorcio Internacional de Fibrosis Quística reporta 48 distintas mutaciones diferentes en el exón 17b, que junto con los exones 4, 7, 10, 11 y 13 son los que se reportan con mayor número de mutaciones. Sin embargo dentro de estos los que reportan un mayor número de mutaciones son el exón 13 y el 7 aunque el exón 17b, aunque en el exón 17b es uno de los exones en donde se han reportado un número elevado de polimorfismos (58), lo que puede explicar los hallazgos observados en este estudio en donde el exón con mayor número de alteraciones fue el exón 17b, seguido del exón 11, 7 y 13a.

Para poder establecer la eficiencia del método de SSCP para la búsqueda de mutaciones nuevas o poco frecuentes en el gen FQ de pacientes mexicanos es necesario analizar los 27 exones que conforman este gen, así como corroborar estos cambios por medio de la técnica de secuenciación.

Por lo tanto para lograr una mayor eficiencia en la detección de mutaciones en pacientes mexicanos se debe analizar el total de exones del gen CFTR, además de implementar nuevas metodologías, como lo es el método de heteroduplex múltiple, con mayor eficiencia y más rápidas para caracterizar todos los alelos afectados y determinar las mutaciones presentes en la población mexicana. En el Instituto Nacional de Pediatría paralelamente a este trabajo se analizaron otras regiones del gen FQ utilizando la técnica de SSCP y el análisis de mHET logrando caracterizar el 74.5% de los alelos afectados encontrando 34 mutaciones diferentes entre estas cinco mutaciones nuevas, cinco de estas nuevas (28).

CONCLUSIONES.

1. La frecuencia de la mutación $\Delta F508$ fue baja en comparación con la reportada por Consorcio Internacional de Fibrosis Quística y nos ubica dentro de las poblaciones con más baja frecuencia.
2. La frecuencia de la mutación G542X fue mayor a lo que reporta el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística, pero similar a lo reportado en poblaciones hispanas.
3. La mutación $\Delta I507$ se encuentra dentro de las cuatro mutaciones de mayor frecuencia en la población mexicana, mutación que a nivel mundial se considera como una mutación poco frecuente.
4. Mediante la técnica de SSCP se detectaron 21 cambios conformacionales que sugieren la presencia de una mutación o un polimorfismo.
5. Con este análisis se obtuvo una eficiencia del 54% de alelos identificados en nuestra población de pacientes mexicanos.
6. La mayoría de los cambios conformacionales que se detectaron están en el exón 17b.
7. Los geles de poliacrilamida con una concentración del 6% con sacarosa al 10% y un crosslinking de 2.5% a una temperatura constante de 15°C y utilizando buffer de corrida TBE 0.5X a 600 volts fueron las condiciones óptimas para una buena definición del patrón electroforetico.

BIBLIOGRAFIA.

1. Welsh, M.J.,L.C. Tsui, F.T. Boat, A.L. Beaudet. 1995. Cystic Fibrosis. Pp:3799-3876. *In: The Metabolic Molecular Basis of Inherited Disease.* (C.L. Scriver, A.L.Beaudet, W.S. Vattay, eds.). McGraw-Hill, New York.
2. Super, M. 1992. Milestones in cystic fibrosis. Pp:717-737. *In: Cystic Fibrosis* (J. O. Warner, ed.). Britis Medical Bulletin, 48(4):717-978.
3. Welsh, M.J. y A.E. Smith. 1995. Cystic Fibrosis. *Scientific American*, 273:
4. Riordan, J.R. 1993. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *An. Rev. Physiol.*, 55(609):609-630.
5. Collins, F.S. 1992. Cystic Fibrosis:molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256:774-779.
6. Roomens, J.M., M.C. Iannuzzi,B.S. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L-Ch Tsui, F.S.Collins. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245:1059-1065.
7. Zielenski, J., R. Rozmahel, D. Bozon, B.S. Karem, Z. Grzelczak, J.R. Riordan, J. Rommens, L-Ch. Tsui. 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 10:214-228.
8. Strong, T.V. y F.S. Collins. 1993. The structure of the cystic fibrosis gene. Pp:3-25. *In: Cystic Fibrosis Current Topics.* (J.A.Dodge, D. J. H. Brock, and J. HH. Widdicombe, eds.). John Wiley & Sons, New York. 358 pp.
9. Anderson, M.P., P.D. Rich, J.R. Gregory, E.A. Smith, J.M. Welsh. 1991. Generation of cAMP activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*, 251:679-682.
10. Sheppard, D.N. y L.S. Ostedgaard. 1996. Understanding how cystic fibrosis mutations cause a loss of Cl- channel function. *Molecular Medicine Today*, July:290-297.
11. Seibert, F.S., T.W. Loo, D.M. Clarke, J.R. Riordan. 1997. Cystic Fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29(5):429-442.
12. Carson, M.R., S.M. Travis, M.J. Welsh. 1995. The two nucleotidebinding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.*, 270:1711-1717.
13. Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plausic, J.L. Chou, M.L. Drumm, M.C. Iannuzzi, F.S. Collins, L.Ch. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245:1066-1073.
14. Tabcharani, J.A., J.M. Rommens, Y.X. Hou. X.B. Chang, L.Ch. Tsui, J.R. Riordan, J.W. Hanrahan. 1993. Multiion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature*, 366:79-82.

15. Resin, I.L., A.G. Prat, E.H. Abraham, J.F. Amara, R.J. Gregory, D.A. Ausiella, H.F. Cantiello. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269:20582-20591.
16. Devidas, S. y W.B. Guggino. 1997. CFTR: domains, structure, and function. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29(5):443-451.
17. Anderson, M.P., H.A. Berger, P.D. Rich, J.R. Gregory, E.A. Smith, J.M. Welsh. 1991. Nucleotide triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, 87:775-784.
18. Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 8:67-113.
19. Bianchet, M.A., Y.H. Ko, L.M. Amzet, P. L. Pedersen. 1997. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29:503-523.
20. Smith, L.S., D.J. Wilkinson, M.K. Mansoura, F.S. Collings, D.C. Dawson. 1993. Functional roles of the nucleotide-binding folds in the activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:9963-9967.
21. Cheng, S.H., D.P. Rich, J. Marshall, R.J. Gregory, M.J. Welsh, A.E. Smith. 1991. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66:1027-1036
22. Consorcio Internacional de Fibrosis Quística. 1998. [http:// www. genet. sickkids. on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca).
23. Zielenski, J. y L.-Ch. Tsui. 1995. Cystic Fibrosis: Genotypic and phenotypic variation. *Annu. Rev. Genetics*, 29:777-807.
24. Dodge J. A., J. H. D. Brock, H. J. Widdicombe. Cystic Fibrosis: Current Topics Vol. 1. John Willy and Sons. 357 pp.
25. Messaoud T., C. Verlingue, E. Denamur, O. Pascuad, I. Quere, S. Fattom, J. Elion, C. Ferec. 1996. Distribution of CFTR mutations in CF patients of Tunisian origin: identification of two novel mutations. *Eur. J. Hum. Genet.*, 4:20-24.
26. Cherkoff, L., A. Visich, T. Bienuenu, M. Greniville, E. Segal, L. Carniglia, J.C. Kaplan, C. Barreiro. 1997. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin. Genet.*, 51:43-47.
27. Orozco, L. 1993. Biología molecular aplicada al estudio de las enfermedades hereditarias. Pp:87-104. *In: Genética y Biología Molecular en Cardiología.* (A. Carnevale y G. Sánchez eds.). Sociedad Mexicana de Cardiología
28. Orozco, L., R. Velazquez, J. Zielenski, L.-Ch. Tsui, M. Chávez, J. L. Lezana, Y. Saldaña, E. Hernández, A. Carnevale. 2000. Spectrum of CFTR mutations in mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G-A). *Hum. Genet.*, 106:360-365.
29. Casals, T., M. D. Ramos, J. Giménez, S. Larriba, V. Nunes, X. Estivill. 1997. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum. Genet.*, 101::365370.
30. Carroll, T.P., I. McIntosh, M.E. Egan, P.L. Zeitlin, G.R. Cutting, W.B. Guggino. 1995. Transmembrane mutations alter the channel characteristics

- of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in *Xenopus oocytes*. *Cell Physiol. Biochem.*, 362:160-164.
31. Fanen, P., N. Ghanem, M. Vidaud, C. Besmond, J. Martin, B. Costyes, F. Plassa, M. Goossens. 1992. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics*, 13:770-776.
 32. Savov, A., B. Mercier, L. Kalaydjieva, C. Ferec. 1994. Identification of six novel mutations in the CFTR gene of patients from Bulgaria by screening the twenty-seven exons and exon/intron boundaries using DGGE and direct DNA sequencing. *Hum. Mol. Genet.*, 3:57-60.
 33. Tabcharani, J.A., X.B. Chang, J.R. Riordan, J.W. Hanrahan. 1992. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Iodide block and permeation. *Biophys. J.*, 62:1-4.
 34. Sheppard, D.N., D.P. Rich, L.S. Ostedgaard, R.J. Gregory, A.E. Smith, M.J. Welsh. 1993. Mutations in CFTR associated with mild disease for Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature*, 362:160-164.
 35. Kerem, E. y B. Kerem. 1996. Genotype-Phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 22:387-395.
 36. Abeliovich, D. I.P. Lowon, I. Lerer, T. Cohen, C. Springer, A. Avital, G.R. Cutting. 1992. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. *Am. J. Hum. Genet.*, 51:951-956.
 37. Orozco, L. J. Zielenski, D. Markiewicz, T. Villarreal, L.-Ch Tsui, J.L. Lezana, A. Gonzalez del Angel. 1997. Two novel frameshift deletions (1924del7, 2055del9-A) in the CFTR gene in mexican cystic fibrosis patients. *Hum. Mut.*, 10:239-240.
 38. Villarreal, M.T., M. Chávez, J.L. Lezana, F. Cuevas, A. Carnevale, E. Córdova, R. Del Angel, L. Orozco. 1996. G542X mutation in mexican cystic fibrosis patients. *Clin. Genet.*, 49:54-56.
 39. Tsui, L. Ch. 1992. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet*, 8:392-398.
 40. Casals, T., V. Nunes, A. Palacio, J. Giménez, A. Gaona, N. Ibáñez, N. Morral, X. Estivill. 1993. Cystic fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum. Genet.*, 91:66-70.
 41. Orozco, L., K. Friedman, M. Chávez, J.L. Lezana, M.T. Villarreal, and A. Carnevale. 1994. Identification of the I507 deletion by site-directed mutagenesis. *Am. J. Med. Genet.*, 52:137-139.
 42. Blin, N. y D. Sttaford. 1976. A General Method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res.*, 3:2303-2308.
 43. Gibson, L. E. y R. E. Cooke. 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549.
 44. Van der Kamer, J. H., H. ten Bokkel Huinink, H. A. Weyers. Rapid method for the determination of fat in faeces. *J. Biol. Chem.*, 177:347-355.

45. Maniatis, T. y J. Sambrook. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. VII 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
46. Friedman, K.J., E.W. Highsmith, M.L. Silverman. 1991. Detecting multiple cystic fibrosis mutation by polymerase chain reaction mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem.*, 37:1-6.
47. Orita, M. S. Yovichi, S, Takao, H. Kenshi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879.
48. Glavac, D. y M. Dean. 1994. A Comparison of the sensitivity of the single-strand conformation polymorphism and heteroduplex. *Methods in Neurosciences*.
49. Cillon M., T. Casals, J. Giménez, M.D. Ramos, A. Palacios, N. Morral, X. Estivill, V. Nunes. 1994. Análisis de the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum. Genet.*, 93:447-451.
50. Estivill X., C. Bancells, C. Ramos, Biomed CFMA Consortium. 1997. *in: European populations. Hum. Mutat.*, 10:135-154.
51. Kanavakis E., M. Tzetzis, T. Antoniadis, J. Traeger. Synodinos, S. Doudounakis, G. Adam, N. Matsaniotis, C. Kattamis. 1995. Mutation analysis of 10 exons of the CFTR gene in Greek cystic fibrosis patients: characterization of 74.5% of CF alleles including 1 novel mutation. *Hum. Genet.*, 96:364-366.
52. Villalobos C., A. Rojas, E. Villareal, J.M. Cantú, F.J. Sánchez, R.K. Saiki, H.A. Barrera. 1997. Análisis de 16 Cystic fibrosis mutations in mexican patients. *Am. J. Med. Genet.*, 69:380-382.
53. Orozco, L., M. Salcedo, J.L. Lezana, M. Chávez, H. Valdez, M. Moreno, A. Carnevale. 1993. Frequency of $\Delta F508$ in a mexican sample of cystic fibrosis patients. *Med. Genet.*, 30:501-502.
54. Flores S., M. Gallegos, M. Moran, J. Sánchez. 1997. Detection of $\Delta F508$ mutation in cystic fibrosis patients from northwestern México. *Ann. Genet.*, 40:189-191.
55. Claustres M., M. Laussel, M. Desgeorges, M. Giansily, J.F. Culard, G. Razakatsara, J. Demaille. 1993. Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in Southern France. *Hum. Mol. Genet.*, 2:1209-1213.
56. Sarkar, G., S.H. Yoon, S.S. Somer. 1992. Dideoxy fingerprinting (ddF): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics*, 13:441-443.
57. Michaud, J., C. L. Brody, G. Steel, G. Fontaine, S.L. Martin, D. Valle, G. Mitchel. 1992. Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics*, 13:389-394.
58. Zielenski, J., D. Markiewicz, F. Rininsland, J. Rommens, L-Ch. Tsui. 1991. A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 49:1256-1262.

APENDICE

Preparación de reactivos y soluciones

Enzima utilizada en la amplificación

Enzima	Amplitaq DNA polimerasa
Concentración	10 u/ μ l
Buffer	10nM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl

Enzimas de restricción

Enzima	Temperatura de incubación	Buffer de reacción
Mbol	37°C	NEBuffer 3
		100 mM NaCl
		50 mM Tris HCl
		10mM MgCl ₂
HphI	37°C	1mM ditiotreitól (pH 7.9)
		NEBuffer 4
		50mM acetato de potasio
		20mM Tris acetato
Ddel	37°C	10mM acetato de magnesio
		1mM dotiotreitól (pH 7.9)
		NEBuffer 3
		100 mM NaCl
BgIII	37°C	50 mM Tris HCl
		10mM MgCl ₂
		1mM ditiotreitól (pH 7.9)
		NEBuffer 3

Acrilamida/bisacrilamida 30%.

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

Buffer acarreador.

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

Marcadores de peso moleculares.

DNA Ladder

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

Preparación de geles de poliacrilamida para mutagénesis sitio dirigida.

	10%	15%
Buffer TBE 5X	2.0 ml	3.26 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	3.06%	5.0 ml
H ₂ O destilada	4.83%	1.56 ml
Persulfato de amonio 10.0%	100 µl	163 µl
TEMED	10 µl	16.3 µl
Volumen Final	10.0 ml	10.0 ml

Preparación del gel para SSCP.

Solución 1

Acrilamida al 6.0% (crosslinking 2.5 % y sacarosa 10.0%)

Acrilamida 40.0% 15 ml

Buffer TBE 10X 10 ml

Sacarosa 10 g

Aforar a 100 ml con H₂O destilada

Solución 1 15 ml

Buffer TBE 5X 3.6 ml

H₂O bidestilada 41.4 ml

Persulfato de amonio 10.0% 240 µl

TEMED 24 µl

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

IZT.

Solución Stop para SSCP.

Formamida 95.0% 19 ml

EDTA 20 mM 0.15 g

Azul de bromofenol 0.5% 0.01g

Xilencianol 0.5% 0.01 g

H₂O bidestilada 20 ml



U.N.A.M. CAMPUS