



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ANALISIS DEL POLIMORFISMO T_n EN EL INTRON 8 DEL
GEN CFTR EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON FIBROSIS
QUISTICA Y PACIENTES CON ESTERILIDAD PRIMARIA".

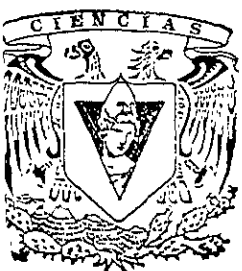
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

VICENTE MELITON GONZALEZ



299788

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ESTUDIOS PROFESIONALES SALDAÑA ALVAREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Análisis del Polimorfismo Tn en el intrón 8 del gen CFTR en una muestra de pacientes con Fibrosis - Quística y pacientes con Esterilidad Primaria".

realizado por VICENTE MELITON GONZALEZ

con número de cuenta 9653258-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M. en C. Yolanda Saldaña Alvarez *Yolanda Saldaña Alvarez*
Propietario

Propietario M. en C. Miguel Angel Palomino Garibay *Miguel Angel Palomino Garibay*

Propietario M. en C. Bertha Molina Alvarez *Bertha Molina Alvarez*

Suplente M. en I.B.B. Saúl Cano Colín *Saúl Cano Colín*

Suplente M. en C. Guadalupe Ordaz Téllez *Guadalupe Ordaz Téllez*

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología *Patricia Ramos Morales*

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, salud y conocimiento.

A la Dra. Lorena Orozco, por haberme permitido trabajar en su laboratorio e iniciar mi vida en la ciencia

A Yola, por su gran apoyo y guía, gracias por ser una de las luces que iluminó mi vida.

A mis hermanos por todo su amor y apoyo que siempre me han dado: Ben Hur, Yasmin, Julio César y Violeta. A mis nuevos hermanos Luis y Vianey. A mi sobrino Antonio

A la Dra. Mirna Chavarria, por su confianza y apoyo.

A Silvia, por sus interminables consejos y darme el apoyo en el momento oportuno.

A mis compañeros del laboratorio: Rafa, Margarita, Manuel, Miguel Angel, Miguel, Ari, Ara, Ricardo y Ceci.

A mis sinodales: Miguel Angel, Saúl, Bertha y Lupita.

COMPARTO MIS LOGROS CON MIS AMIGOS:

Con mis amigos de toda la vida: Pros, Lupita, Carlos, Josie, Paco, Alfredo, Jesús y Zara.

Con mis amigos de la facultad con los que crecí y viví tantas cosas: Ale, Pawis, Aline, Belem, Alicia, Tata, Xoxo, Candela, Norma, Amanda, Paty, Martha, Lorenzo, Javier, Mario, Cruz, Francisco, Sergio, Estela, Buru, Ramadan, David, Alari, Héctor, Lorenza, Rocio, Andrés, Iván, Misha, Ana, Riquín, Ale N, Benjamín, Luis, Horacio.

Con mis amigos de pediatría: Laura, Bertha, Chivis, Sandra, Angélica, Chelo, Paloma, Luz, Paty, Oreth, Robert, Mari Carmen, Sara, Dra. Del Castillo, Gina, Carlos, Camilo y Esther.

ABREVIACIONES

A. Adenina

aa. aminoácido

AMPc Adenosín monofosfato cíclico

AP. Persulfato de amonio

Asn Asparagina

ATP. Adenosín trifosfato

B. bases (s)

BEDO. Obstrucción bilateral de conducto eyaculador.

C. citocina

CBAVD (Congenital bilateral absence of the vas deferens) Ausencia bilateral congénita de vasos deferentes

CUAVD (Congenital unilateral absence of the vas deferentes) Ausencia unilateral congénita de vasos deferentes.

CFTR. (Cystic fibrosis transmembrane regulator) Proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística Producto del gen FQ.

DNA. Ácido desoxirribonucleico

DO Densidad óptica

EDTA Etilen-diamino tetracetato de sodio

F. Forward

FQ. Fibrosis quística

G. Guanina

GCATmix Mezcla de guanina, citosina, adenina y timina.

Gly Glicina

HCl. Ácido clorhídrico

H₂O_{bd}. Agua bidestilada

ICSI. Intracytoplasmic Sperm Injection

Ile. Isoleucina

IP. Insuficiencia pancreática

Kb. Kilo bases

KCl. Cloruro de potasio

L. Litros

Lys. Lisina

M. Molar

Meq. Miliequivalentes

MESA. Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration

MgCl. Cloruro de magnesio

mg. Miligramos

min. Minutos

ml. mililitros

mM. milimoles

NaCl Cloruro de sodio

NaOH Hidróxido de sodio

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

ng. Nanogramos

pb. Par (es) de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa.

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

R. Reverse

RCLB. Buffer de lisis de células rojas

RE. Reticulo endoplásmico.

RNA. Ácido ribonucleico

RNAM Ácido ribonucleico mensajero

Ser Serina

SP. Suficiencia pancreática

SSCP. (Single stranded conformational polymorphisms) Análisis conformacional de cadena sencilla.

T. Timidina

TBE. Tris-borato-EDTA

TE. Tris-EDTA

TEMED. N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino

UV. Ultravioleta.

V. Volts

WCLB Buffer de lisis para células blancas

X². Pruebad de chi²

**DISEÑO
E
IMPRESION**

- *TARJELAS
- *TÉSIS
- *ACERTOS
- *DIPLOMAS
- *PROMOCIONALES
- *TRANSPARENCIAS
- *CALENDARIOS
- *RECETARIOS
- *SERIGRAFIA
- *FOTOGRAFIA
- *MAGNETOS

651 26 43

correo electrónico: cladelpon@supernet.com.mx

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
El Gen CFTR.....	2
Proteína CFTR.....	2
Domínios TMDs.....	4
Domínios NBDs.....	4
Dominio R.....	5
Mutaciones en el gen FQ.....	5
Efecto de las mutaciones en el canal CFTR.....	6
<i>CLASE I: Mutaciones que bloquean la síntesis de la proteína.....</i>	<i>6</i>
<i>CLASE II: Mutaciones que afectan el procesamiento postraducciona.....</i>	<i>6</i>
<i>CLASE III: Mutaciones que afectan la regulación del canal de cloro.....</i>	<i>7</i>
<i>CLASE IV: Mutaciones que afectan la conductancia o la apertura del canal de cloro.....</i>	<i>7</i>
<i>CLASE V: Mutaciones que causan reducción en la síntesis de la Proteína.....</i>	<i>8</i>
Correlación genotipo-fenotipo	9
Genes modificadores.....	9
Genética de la esterilidad primaria.....	10
Mutaciones en el gen CFTR.....	10
El intrón 8 y la variante de empalme 5T	11
El consejo genético en pacientes con esterilidad primaria	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
ESTRATEGIA GENERAL	18

MATERIAL Y MÉTODOS	19
Población objetivo.....	19
Criterios de inclusión.....	19
Criterio de exclusión.....	19
Valoración clínica de los Pacientes con Esterilidad Primaria	19
Creación del banco de DNA.....	20
Extracción de DNA.....	20
Purificación del DNA.....	20
Cuantificación del DNA.	21
Evaluación de la integridad de DNA.	21
Búsqueda de mutaciones.....	21
Análisis de las mutaciones más frecuentes por PSM.....	21
Caracterización del polimorfismo (Tn) en el intrón 8.....	24
Análisis del polimorfismo Tn por fragmentos de restricción	24
PCR inicial	24
PCR anidado.....	25
Restricción de los amplificados.....	25
Electroforesis en gel de acrilamida.....	26
Análisis del polimorfismo Tn por PCR directo	26
Detección de la mutación R117H por análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla(SSCP).....	27
Análisis Estadístico.....	29
RESULTADOS	30
Valoración clínica de los pacientes con esterilidad primaria.....	30
Análisis de las mutaciones más frecuentes por PSM en pacientes con esterilidad primaria	31
Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación $\Delta F508$	31
Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación G542X.....	31
Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación N1303K.....	32
Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación $\Delta I507$	34

Análisis del exón 4 por SSCP en pacientes con esterilidad primaria	35
Análisis del polimorfismo Tn por fragmentos de restricción	36
Análisis del polimorfismo Tn por PCR directo...	38
Pacientes con FQ.....	39
Pacientes con esterilidad primaria	41
Población normal	41
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	47
APÉNDICE	48
GLOSARIO	53
BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del gen <i>FQ</i> en el cromosoma 7.	2
Figura 2 Representación hipotética del gen CFTR y de la proteína CFTR	3
Figura 3. Consecuencias moleculares de las mutaciones FQ	8
Figura 4. Polimorfismo (Tn)	13
Figura 5. Correlación genotipo fenotipo del polimorfismo Tn	14
Figura 6. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por PSM.	32
Figura 7. Análisis de la mutación G542X por PSM.	33
Figura 8. Análisis de la mutación N1303K por PSM.	33
Figura 9. Análisis de la mutación $\Delta I507$ por PSM.	34
Figura 10. SSCP exón 4.	35
Figura 11. Amplificado del intrón 8/exón 9	36
Figura 12. Producto de la PCR anidada.	37
Figura 13. Patrón de migración del polim. (Tn) por tinción con óxido de plata.	37
Figura 14. Caracterización del polimorfismo Tn por PCR directo	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Mutaciones en el gen CFTR e infertilidad en varones	12
Tabla 2. Características de las mutaciones que se analizaron por PSM	22
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados en la PSM, enzimas de restricción y tamaños de fragmentos	23
Tabla 4. Distribución del polimorfismo Tn del gen CFTR en pacientes con esterilidad primaria.	30
Tabla 5. Dist. del polimorfismo Tn en los diferentes genotipos en pac. con FQ.....	40
Tabla 6. Asociación del polimorfismo Tn del gen CFTR con las mutaciones presentes en pacientes mexicanos con FQ.....	40
Tabla 7 Frecuencia del polimorfismo Tn del gen CFTR en pacientes con FQ, pacientes con esterilidad primaria y población general ..	41

RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ), es el padecimiento autosómico recesivo más frecuente en la población caucásica en donde se presenta con una incidencia de uno en cada 2,000 a 3,000 recién nacidos vivos y aproximadamente uno de cada 25 individuos es portador de la enfermedad. El cuadro clínico de esta patología se caracteriza por neumopatía crónica, insuficiencia pancreática y elevación de los cloruros en el sudor y el 95% de los pacientes presentan infertilidad primaria.

El gen responsable de la FQ se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q31, abarca 250 kb, está constituido por 27 exones y codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembranal (CFTR) que es un canal de cloro regulado por AMPc.

Hasta la fecha, se han reportado alrededor de 1,000 mutaciones diferentes que afectan la estructura y la función de la proteína CFTR en diferente grado, por lo que en esta entidad se observa una gran variabilidad en el fenotipo de los pacientes, desde un cuadro clínico clásico de FQ o como en *varones con ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD)*, que presentan como única manifestación clínica la infertilidad. El análisis molecular ha mostrado una elevada proporción de mutaciones en el gen FQ así como una variante del polimorfismo Tn, que origina una proteína no funcional.

Estudios más recientes de pacientes con otras formas de infertilidad primaria como CUAVD, obstrucción bilateral de conducto eyaculador (BEDO), obstrucción bilateral dentro del epidídimo y por hidrococele, sugieren que estas anomalías pueden ser agrupadas como una forma genital primaria de FQ, ya que en estos individuos se han encontrado mutaciones en este gen así como la variante 5T.

Dado que la FQ es una enfermedad letal para la cual no existe un tratamiento definitivo y el hecho que en pacientes con esterilidad primaria se ha detectado una elevada proporción de mutaciones en el gen responsable de esta entidad, aunado a la posibilidad que tienen estos individuos de procrear hijos mediante técnicas de fertilización asistida, hace imprescindible conocer las mutaciones FQ en estos pacientes con la finalidad de evitar la transmisión de genes alterados, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar al polimorfismo Tn en los pacientes con esterilidad primaria, así como la distribución del mismo en pacientes con FQ portadores de diferentes mutaciones, para determinar si existe alguna asociación entre éstas y el polimorfismo, que pueda utilizarse como marcador para el rastreo de mutaciones en el gen CFTR.

RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ), es el padecimiento autosómico recesivo más frecuente en la población caucásica en donde se presenta con una incidencia de uno en cada 2,000 a 3,000 recién nacidos vivos y aproximadamente uno de cada 25 individuos es portador de la enfermedad. El cuadro clínico de esta patología se caracteriza por neumopatía crónica, insuficiencia pancreática y elevación de los cloruros en el sudor y el 95% de los pacientes presentan infertilidad primaria.

El gen responsable de la FQ se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q31. Abarca 250 kb, está constituido por 27 exones y codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembranal (CFTR) que es un canal de cloro regulado por AMPc.

Hasta la fecha, se han reportado alrededor de 1,000 mutaciones diferentes que afectan la estructura y la función de la proteína CFTR en diferente grado, por lo que en esta entidad se observa una gran variabilidad en el fenotipo de los pacientes, desde un cuadro clínico clásico de FQ o como en varones con ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD), que presentan como única manifestación clínica la infertilidad. El análisis molecular ha mostrado una elevada proporción de mutaciones en el gen FQ así como una variante del polimorfismo Tn, que origina una proteína no funcional.

Estudios más recientes de pacientes con otras formas de infertilidad primaria como CUAVD, obstrucción bilateral de conducto eyaculador (BEDO), obstrucción bilateral dentro del epidídimo y por varicocele, sugieren que estas anomalías pueden ser agrupadas como una forma genital primaria de FQ, ya que en estos individuos se han encontrado mutaciones en este gen así como la variante 5T.

Dado que la FQ es una enfermedad letal para la cual no existe un tratamiento definitivo y el hecho que en pacientes con esterilidad primaria se ha detectado una elevada proporción de mutaciones en el gen responsable de esta entidad, aunado a la posibilidad que tienen estos individuos de procrear hijos mediante técnicas de fertilización asistida, hace imprescindible conocer las mutaciones FQ en estos pacientes con la finalidad de evitar la transmisión de genes alterados, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar al polimorfismo Tn en los pacientes con esterilidad primaria, así como la distribución del mismo en pacientes con FQ portadores de diferentes mutaciones. Para determinar si existe alguna asociación entre éstas y el polimorfismo, que pueda utilizarse como marcador para el rastreo de mutaciones en el gen CFTR.

La búsqueda de las cuatro mutaciones más frecuentes: $\Delta F508$, G542X, $\Delta I507$ y N1303K se realizó mediante PSM y la R117H por SSCP. Por otro lado, la caracterización del polimorfismo Tn del intrón 8 del gen CFTR en los 35 pacientes con esterilidad primaria, 54 con FQ y 42 individuos de la población normal se determinó mediante un PCR directo y por fragmentos de restricción.

En este estudio no se encontró ninguna de las mutaciones analizadas en los pacientes con esterilidad primaria. La determinación del polimorfismo Tn reveló que la variante alélica 5T se encuentra en baja proporción en las tres poblaciones analizadas: a) pacientes con esterilidad primaria 2.86%, b) pacientes con FQ de 3.7%, c) población control 1.2%; de hecho, todos los valores son menores a lo reportado para otras poblaciones (5%). Al analizar la asociación del polimorfismo Tn con las mutaciones presentes en los pacientes con FQ, se encontró una asociación del 100% entre la variante 9T y las mutaciones $\Delta F508$ y G542X; mientras que las mutaciones S549N, G551S, XW1098C y $\Delta I507$, y la población normal mostraron un ligamiento del 100% y 98.8% respectivamente con la variante 7T.

Los resultados sugieren que probablemente en los pacientes con esterilidad primaria las mutaciones en el gen FQ, asociadas con esta patología se encuentran localizadas en otras regiones aún no analizadas. Por otro lado la presencia del alelo 9T puede considerarse como un marcador de riesgo para la presencia de la mutación $\Delta F508$ y la G542X dada la asociación tan elevada encontrada entre éstas y la variante 9T.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ), es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica, con una incidencia de 1/2500 nacidos vivos y una frecuencia de portador de 1/25 en poblaciones del norte de Europa (Boat, 1989) y es causada por mutaciones en el gen CFTR. La forma clásica de la FQ se caracteriza por anomalías en el transporte de electrolitos, fluido y secreción de macromoléculas de las glándulas exócrinas. Las características clínicas incluyen infecciones y obstrucción pulmonar crónica, insuficiencia pancreática, íleo meconial neonatal, cloruros elevados en el sudor y el 95% de los varones con FQ presenta infertilidad por alteración de las estructuras wolffianas tales como la atrofia de los conductos deferentes, epidídimo, las vesículas seminales o por la ausencia bilateral de los conductos deferentes. Estas anomalías se deben a cambios degenerativos ocasionados por la obstrucción de estos conductos, desde la vida intrauterina (Welsh y cols., 1995).

Algunas enfermedades monogénicas como la FQ presentan una expresividad variable aún en pacientes que portan el mismo defecto genético. Para esta variabilidad se ha sugerido la heterogeneidad alélica, locus adicionales y/o factores ambientales (Welsh y cols., 1995). Esta variabilidad fenotípica se puede observar en varones con ausencia bilateral de los conductos deferentes (del inglés, congenital bilateral absence of the vas deferents, CBAVD), que presentan como única manifestación clínica la infertilidad. En estos pacientes el análisis molecular del gen FQ ha mostrado una elevada proporción de mutaciones (Schellen y Van Stratten 1980; Anguiano y cols., 1992; Mercier y cols., 1994; Chillon y cols., 1995; Jarvi y cols., 1995; Rave-Harel y cols., 1995), sugiriendo que la CBAVD puede ser una manifestación leve y no letal de la FQ, pero aún no se han determinado cuáles son los mecanismos que regulan este proceso.

Recientemente, análisis de pacientes con otras formas de infertilidad masculina como CUAVD, obstrucción bilateral de conducto eyaculador (BEDO) u obstrucción bilateral dentro del epidídimo sin involucrar a los vasos deferentes, sugieren que estas anomalías pueden también ser agrupadas como una forma genital primaria de FQ (Gervais y cols., 1996).

El Gen CFTR

El gen responsable de la FQ se localiza en el cromosoma 7 en la región q31-32 (Tsui y cols., 1985) (Fig. 1). Está constituido por 27 exones en un total de 250 kb. Se transcribe en un RNAm de 6.5 kb y se traduce en una proteína de 1,480 amino ácidos (Fig. 2), detectable en una gran variedad de tejidos, especialmente en pulmón, páncreas, glándulas sudoríparas, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales y colon (Rommens y cols., 1989). La región promotora es rica en GC (65% aproximadamente) y carece de caja TATA. Presenta dos secuencias GC (GGGCGG) en las posiciones -273 y -195 idénticas a los sitios de unión para el factor de transcripción Sp1. Sin embargo, se ha observado que Sp1 tiene mayor afinidad por una secuencia GT (GTGGGTGGAG) localizada a -130 pb de la región promotora. Este gen presenta cuatro sitios de inicio de la transcripción en +1, +60, +70, y +100, siendo el primer sitio el más utilizado (Chou y cols., 1991; Yoshimura y cols., 1991).

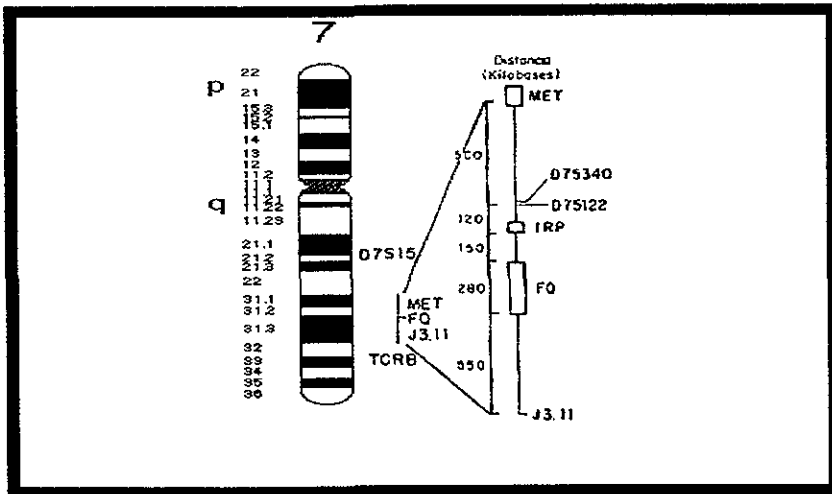


Fig. 1. Localización del gen *CFTR* en el cromosoma 7. A la izquierda se muestra un diagrama del cromosoma 7 y a la derecha la región q31-33 donde se localiza el gen *CFTR* (Rommens y cols., 1989).

Proteína CFTR

El gen *CFTR* codifica para una proteína transmembranal que funciona como un canal de cloro y por su papel fisiológico, se denomina proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ

(CFTR del inglés, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Zielenski y cols., 1991). Esta proteína presenta una gran homología estructural con la familia de proteínas ABC (cassette de unión a ATP) (Zielenski y cols., 1991; Riordan y cols., 1991), proteínas integrales de membrana que contienen varios dominios funcionales: dos dominios de unión a nucleótidos y dos sitios de glicosilación. La proteína CFTR pesa 170 kb y está constituida por dos segmentos repetidos, cada uno con un dominio transmembranal (TMD) y un dominio intraplasmático de unión a nucleótidos (NBD). Además, consta de un dominio R (regulador) característico de esta proteína que divide a los dos segmentos repetidos; su nombre se debe a que presenta varios sitios de fosforilación que regulan la función del péptido. Existen varias evidencias experimentales que demuestran que el CFTR es un canal de cloro dependiente de AMPc y que directa o indirectamente participa en la regulación de otros canales endógenos de cloro y calcio (Riordan y cols., 1991; Egan y cols., 1992).

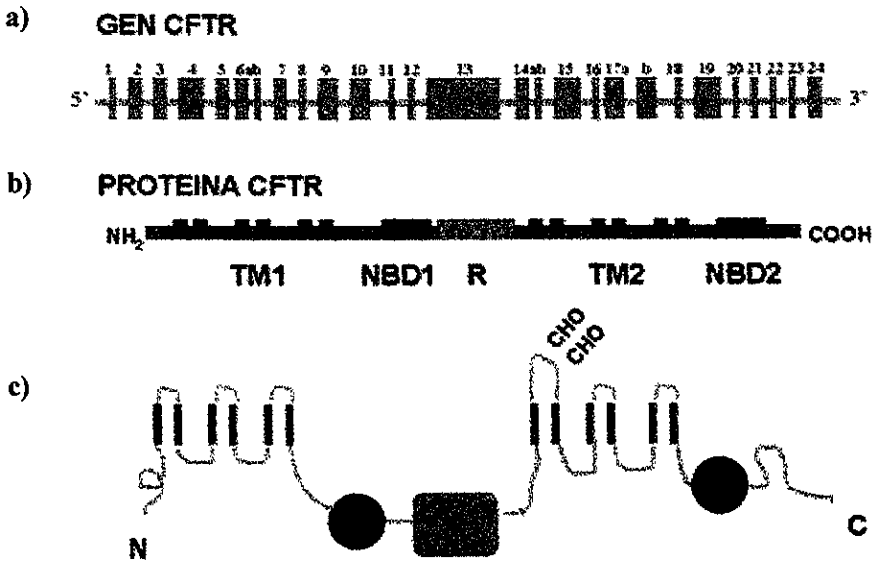


Fig. 2. Representación hipotética del gen CFTR y de la proteína CFTR. a) Estructura del gen CFTR; los rectángulos verticales representan los 27 exones del gen y las líneas punteadas señalan la región de la proteína para la cual codifica cada exón. b) Estructura primaria de la proteína CFTR y sus dominios principales. c) Modelo de la estructura secundaria de la proteína (Chang y cols., 1994).

Dominios TMDs

La proteína CFTR está anclada a la membrana citoplasmática por 12 segmentos hidrofóbicos (TM1-TM12), organizados en dos dominios transmembranales (TMD1 y TMD2) (Chang y cols., 1994). Los 12 segmentos que atraviesan la membrana forman un poro que constituye el canal de cloro. Con base en los efectos que producen algunas sustituciones de aminoácidos encontradas en pacientes con FQ, se observó que la proteína CFTR contiene varios residuos de arginina particularmente importantes para la conductancia de iones. Se ha propuesto, que residuos de treonina y serina presentes en los segmentos TM6 y TM12 pueden interactuar con el cloro a través de residuos hidroxilados (Tabcharani y cols., 1993; McDonough y cols., 1994)

Los modelos actuales de la proteína CFTR predicen que entre los segmentos que atraviesan la membrana se encuentran 6 asas extracelulares y 4 asas citoplasmáticas y en la cuarta asa extracelular se han identificado dos sitios de glicosilación en dos residuos de asparagina (N894 y N900) (Tabcharani y cols., 1993).

Dominios NBDs

Los dominios de unión a nucleótidos (NBD), presentan secuencias tipo “Walker A” y “Walker B”, que se encuentran conservadas en las proteínas que unen e hidrolizan ATP. La secuencia del gen que codifica para el dominio NBD1 abarca del exón 9 al exón 12 y la región entre el exón 19 y el 23 codifica para el NBD2 (Riordan y cols., 1989). Algo interesante, es que no existe gran similitud entre las estructuras primarias de los dos dominios NBD, ya que sólo presentan un 29% de homología entre sus aminoácidos. Ambos dominios tienen la capacidad de unirse e hidrolizar ATP (Anderson y cols., 1991).

Estudios funcionales han demostrado que NBD1 y NBD2 no contribuyen de la misma manera a la regulación del canal (Anderson y cols., 1992) Se ha propuesto que NBD1 se fosforila después de una fosforilación parcial del dominio R, lo que permite la apertura del canal, mientras que la fosforilación completa del dominio R conduce a la fosforilación de NBD2 causando el cierre del canal (Carson y cols., 1995).

Dominio R

El dominio R es exclusivo de la proteína CFTR ya que ninguna otra proteína de la familia de las ABC lo presenta. Este dominio está codificado por el exón 13 y se localiza en la parte citoplásmica de la membrana apical de las células epiteliales (Riordan y cols., 1989; Rich y cols., 1993), presenta una alta proporción de aminoácidos polares (30%) y varios sitios de fosforilación importantes para el funcionamiento del canal (Cheng y cols., 1991). De tal manera que, el grado de fosforilación de los diferentes sitios de este dominio generan cambios conformacionales que regulan la actividad del canal (Wilkinson y cols., 1994).

La fosforilación del dominio R está dada por la proteína quinasa A (PKA), después de una estimulación por AMPc. Una vez que los canales se han fosforilado son activados por ATP, y este proceso puede revertirse por la acción de fosfatasas. Se ha propuesto que la forma fosforilada de la CFTR presenta una mayor afinidad por ATP, y esta unión induce un cambio conformacional en la misma, lo que permite el flujo de iones de cloro en forma pasiva, ya que los canales no funcionan como una bomba de cloro, por lo que el flujo de iones se realiza siguiendo un gradiente electroquímico (Dulhanty y cols., 1994).

Mutaciones en el gen CFTR

Desde su clonación y secuenciación se han descrito cerca de 950 mutaciones que afectan la función de este gen, de las cuales la más importante por su frecuencia y que causa un cuadro clínico grave es la $\Delta F508$, una deleción de tres pares de bases (CTT) que elimina el codón para la fenilalanina en la posición 508 y que en poblaciones del norte de Europa se encuentra del 75-80% de los alelos FQ (Collins, 1992) y que entre las diferentes poblaciones presenta una amplia variación que oscila entre 17.9% y el 85% de los alelos afectados con FQ.

En general, la naturaleza de las mutaciones es diversa: cerca del 50% son de sentido erróneo; en el resto se han encontrado desde mutaciones sin sentido, pequeñas deleciones de una base o inserciones que alteran el marco de lectura, mutaciones que afectan la maduración normal del mRNA, deleciones desde un sólo codón para un aminoácido hasta grandes deleciones que no alteran el marco de lectura (Morral y cols., 1993). Así mismo, también se han descrito alrededor de 100 cambios en la secuencia del gen, definidos como variaciones benignas o polimorfismos.

La distribución de las mutaciones en el gen FQ no parece ser al azar, ya que se han detectado una alta frecuencia de mutaciones, particularmente del tipo de sentido erróneo, en ciertos exones como el 4, 7, 11, 13 y 21 (Orozco y cols 1997).

La frecuencia de las mutaciones no $\Delta F508$ varía entre <1 y 5% y la mayoría son poco comunes, ya que tienen una frecuencia menor al 1% . La segunda mutación más frecuente a nivel mundial (G542X), se encuentra en tan sólo el 3.4% de los alelos FQ (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium 1994).

Entre las mutaciones de sentido erróneo, la distribución de alelos “graves” y “leves” también parece tener relación con ciertos exones (Mercier y cols., 1994; Orozco y cols., 1997). Por ejemplo, existe un grupo de 10 mutaciones leves descritas en el exón 7 en la región que codifica para TM6 y una alta concentración de los alelos graves en exón 11 que codifica parte de NBD1 (Chang y cols., 1994). El grado de tolerancia a la sustitución de aminoácidos puede depender de la estructura y función de los dominios correspondientes en el canal de cloro CFTR. Más aún, algunos codones o nucleótidos del gen CFTR parecen ser más susceptibles a alteraciones, como los que codifican para el residuo de serina en la posición 549 y el residuo de arginina en la posición 347, en cada uno de los cuales se han descrito cuatro diferentes mutaciones (Welsh y cols., 1995).

Efecto de las mutaciones en el canal CFTR

Con la finalidad de entender más acerca de la fisiopatología de la FQ, las mutaciones se han clasificado en cinco clases, de acuerdo a la manera en que afectan a la proteína (Figura 3).

CLASE I: Mutaciones que bloquean la síntesis de la proteína.

Cerca de la mitad de las mutaciones encontradas en el gen CFTR pertenecen al grupo de mutaciones que evitan la formación de un polipéptido de tamaño normal. Entre las mutaciones de esta clase se encuentran aquellas que generan codones de terminación (18%), corrimiento del marco de lectura (22%) y las que afectan el procesamiento del mRNA (8%) (Figura 3). Varias de las mutaciones sin sentido y mutaciones que generan un corrimiento en el marco de lectura generalmente causan ausencia de la proteína (Welsh y cols., 1993).

CLASE II: Mutaciones que afectan el procesamiento postraduccional.

La biosíntesis de la CFTR requiere pasos de maduración complejos y más aún, solamente del 25% de la CFTR madura adquiere una conformación estable que le permite ser transportada a la membrana apical de las células epiteliales. Así, algunas mutaciones que afectan la maduración de la

proteína CFTR generan péptidos sin actividad. Dentro de este tipo de mutaciones se encuentra la mutación $\Delta F508$. Esta mutación causa una conformación tridimensional anormal en la proteína, la cual queda atrapada en el retículo endoplásmico (RE) y no sólo no alcanza la membrana apical de las células epiteliales, sino que es degradada rápidamente en el RE por el sistema ubiquitina-proteasoma (vida media de 0.5h) (Ward y cols., 1995). Es interesante el hecho de que este atrapamiento de la proteína $\Delta F508$ en el RE es reversible *in vitro*, a temperaturas subfisiológicas (23°-30°C). Bajo estas condiciones, la proteína mutante puede pasar del RE al aparato de Golgi, ser glicosilada y alcanzar la membrana citoplásmica formando un canal de cloro con propiedades similares a la de la CFTR silvestre (Denning y cols., 1992). Esto puede resultar de gran interés para futuras investigaciones en el tratamiento de la enfermedad.

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

Las mutaciones clasificadas en esta categoría son aquellas que generan proteínas que parecen estar completamente procesadas y correctamente localizadas en la membrana apical, pero que no pueden ser reguladas adecuadamente como un canal iónico (Figura 3). En algunas de estas mutantes, los aminoácidos afectados son aquellos que participan en la unión de ATP en los dominios NBD's o en la fosforilación en el dominio R (Hiestad y cols., 1994). El grado de alteración puede variar desde la pérdida grave de la función por una disminución o ausencia en la respuesta a la estimulación por ATP (mutaciones G551D y S1255P), hasta una leve reducción de la actividad del canal (mutaciones G551S, G1244E y G1349D) (Mansoura y cols., 1994).

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

Estas mutaciones se localizan en regiones del gen que codifican para algunos de los segmentos TMD's de la proteína y, aunque la regulación del canal es adecuada, existe una conductancia anormal del canal (Figura 3). El grado de reducción de la conductividad que producen algunas mutaciones se ha estudiado sólo *in vitro* y sugiere que estas mutantes producen una CFTR madura, totalmente glicosilada que llega a la membrana apical como la CFTR silvestre (Sheppard y cols., 1993). Sin embargo, utilizando agonistas de AMPc para estimular corrientes de cloro en membranas apicales, se observó que estos canales mutantes están regulados por fosforilación y aminoácidos intracelulares que mantienen su selectividad al cloro; pero sus poros presentan propiedades alteradas que generan corrientes reducidas de este anión (Mansoura y cols., 1994)

Ejemplos de mutaciones que afectan aminoácidos localizados en TMD1 son: la R117H en la región TM2, la G314E en TM5 y la R334W, R347P y R347H en TM6.

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

Las mutaciones de esta clase pueden incluir mutaciones en el promotor que reducen la transcripción, mutaciones puntuales que conducen a un procesamiento erróneo del transcrito o a aquellas que producen sustituciones de aminoácidos que causan una maduración ineficiente de la proteína. El efecto final de todas estas mutaciones es una disminución en la cantidad de proteína funcional causada por una alteración en su procesamiento (Figura 3) (Highsmith y cols., 1994). Varias mutaciones con sentido erróneo como la P574H y la A455E localizadas en NBD1 causan este efecto. Estudios bioquímicos recientes han demostrado que estas mutaciones producen canales de cloro con propiedades normales regulados por fosforilación dependiente de AMPc y nucleótidos intracelulares; sin embargo, la cantidad de proteína madura producida por estas mutantes es sólo del 10 al 15% cuando se compara con la silvestre (di Sant' Agnese y cols., 1979; di Sant' Agnese y cols., 1984).

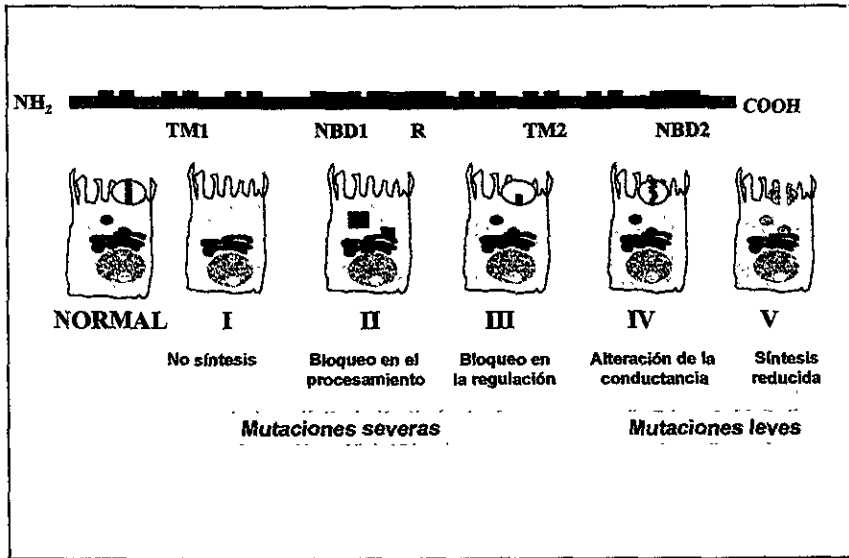


Fig. 3. Consecuencias moleculares de las mutaciones FQ. Se esquematiza el daño molecular del canal CFTR de acuerdo con las diferentes clases de mutaciones FQ (Stuhrmann y cols., 2000).

Correlación genotipo-fenotipo

Dado el gran espectro de las mutaciones en el gen FQ (genotipo), el cuadro clínico de la fibrosis quística es muy heterogéneo (fenotipo). Diversos estudios han tratado de encontrar las características clínicas comunes entre los pacientes de FQ con un mismo genotipo, con la finalidad de establecer una correlación entre el fenotipo y el genotipo (Kerem y cols., 1996). Una de las manifestaciones más importantes en los individuos con FQ son las manifestaciones pulmonares; sin embargo, estas no presentan correlación con el genotipo del paciente, dado que son muy similares entre pacientes con diferente genotipo o presentan una alta variabilidad entre familiares con mutaciones idénticas. Se cree que en parte, esta variabilidad se puede atribuir al medio ambiente y a otros factores genéticos (Fulmer, 1995).

De todos los síntomas analizados, solamente la función pancreática correlaciona directamente con el genotipo de los pacientes. En general, los pacientes con insuficiencia pancreática (IP), homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones graves (mutaciones de clase I, II, o III), mientras que los pacientes con suficiencia pancreática (SP) presentan al menos un alelo con una mutación con función residual (mutaciones de clases IV o V). Se estima que aproximadamente el 90% de las mutaciones son graves (Kerem y cols., 1996); sin embargo, de acuerdo con el fenotipo de los pacientes se ha logrado establecer que las mutaciones leves son dominantes sobre las graves. Análisis de la funcionalidad de mutantes expresadas en ovocitos de *Xenopus*, reveló que la corriente de cloro generada se encontraba reducida en el siguiente orden: CFTR silvestre > mutantes SP > mutantes IP (Sheppard y cols., 1996). Esto sugiere una relación entre el genotipo y la función del canal de cloro.

Genes modificadores

Las más de 950 mutaciones diferentes descritas a la fecha sólo explican parcialmente la heterogeneidad clínica de esta enfermedad. Es por ello que, aunque esta patología es causada principalmente por mutaciones en el gen CFTR, se ha propuesto que el fenotipo puede ser influenciado no sólo por factores ambientales, sino también por la participación de modificadores genéticos secundarios (Zielenski, 2000).

Así, en el caso de la afección pulmonar, donde la correlación entre el genotipo CFTR y la severidad de esta manifestación clínica en la mayoría de los pacientes es mínima o inexistente, se ha propuesto la participación de genes relacionados con la respuesta inmune (Zielenski, 2000).

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de un gen modificador de la FQ (CFM) en el cromosoma 19 (19q13.2), que se ha relacionado con la presencia de íleo meconial (IM) en los recién

nacidos con esta patología (Zielenski y cols., 1999), el cual se presenta con una recurrencia familiar de aproximadamente el 29%. Recientemente, Zielenski y cols. 1999, han realizado un mapeo fino de esta región mediante análisis de desequilibrio de ligamiento. En este estudio se encontró que un marcador intragénico localizado en el intrón 1 del gen KCNN4 mostraba una fuerte asociación alélica con la presencia de este síntoma; resultado que tendrá que ser analizado para comprobar la participación de este gen en la presencia de IM en los pacientes con FQ. Esto permitirá además, entender la gran variabilidad en la expresión del cuadro clínico de esta enfermedad y dejará abiertas las expectativas de que pueden existir mas locus modificadores no sólo de la fibrosis quística, sino de otras enfermedades llamadas monogénicas con expresividad muy variable.

Genética de la esterilidad primaria

Mutaciones en el gen CFTR

La presencia de azoospermia obstructiva en pacientes con esterilidad primaria por CBAVD, CUAVD, BEDO, obstrucción epididimal, problemas de espermatogénesis entre otras, sugería que la azoospermia obstructiva podría ser una forma incompleta de FQ con ausencia de los síntomas clínicos pulmonares y digestivos de esta patología. Sin embargo, esta hipótesis pudo ser comprobada hasta que el gen responsable de la FQ fue clonado. El primer reporte fue publicado en 1990 por Dumur y cols., donde al buscar la mutación $\Delta F508$ en 17 pacientes con CBAVD, encontraron que siete de éstos portaban esta mutación y aunque ninguno de ellos mostraba los síntomas clásicos de FQ, cuatro tenían sinusitis crónica, uno diabetes y otro presentaba una hipersecreción bronquial crónica. Por lo tanto, la alta frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en pacientes con CBAVD (7/17 41 %) comparada con el 4% esperado de portadores en la población general, apoyó fuertemente la hipótesis de un ligamiento genético entre CBAVD y FQ.

Diversos estudios en diferentes poblaciones han confirmado el papel del gen CFTR en la etiología de CBAVD (Lissens y cols, 1996). En la mayoría de ellos el gen CFTR ha sido analizado exhaustivamente en búsqueda de mutaciones. En un total de 420 pacientes analizados, encontraron que 19% de ellos son heterocigotos compuestos, 47% portan una mutación y en el resto (34%) no se detectó ningún cambio. La mayoría de las mutaciones encontradas en estos pacientes ya han sido descritas en pacientes con FQ, aunque algunas han sido encontradas asociadas sólo a CBAVD. El análisis de mutaciones en el gen CFTR de pacientes con CBAVD, ha determinado que del 50 al 82% de hombres con CBAVD tienen al menos una mutación en el gen CFTR y 15% presentan 2 mutaciones (Anguiano

y cols., 1992; Osborne y cols., 1993; Culard y cols., 1994; Chillon, 1995). donde al menos una de las dos es responsable de un fenotipo leve específico para CBAVD.

Recientemente Van der Ven y cols. (1996) encontraron que 14 de 80 varones (17.5%) con infertilidad causada por espermatozoides de calidad reducida y en el 9.5% de varones con azoospermia, portaban una mutación en el gen CFTR, cuando la frecuencia reportada en la población general es del 4%. Oates & Amos (1994) determinó en pacientes con CBAVD una alta frecuencia de la mutación R117H y estudios posteriores también caracterizaron esta misma mutación en pacientes con CUAVD (Mickle y col., 1995), BEDO (Meschede y col., 1997) y azoospermia (Jarvi y cols., 1995).

Por lo tanto, datos obtenidos del análisis del gen CFTR en pacientes con otras formas de infertilidad masculina, como CUAVD, obstrucción bilateral de conducto eyaculador (BEDO) u obstrucción bilateral dentro del epidídimo, sugieren que estas anomalías deben considerarse como una forma genital primaria de FQ (Gervais y cols., 1996), ya que al analizar el gen CFTR en estos pacientes presentan una mayor frecuencia de mutaciones (4%) que la reportada en la población general (Tabla I) (Stuhrmann y cols., 2000).

El intrón 8 y la variante de empalme 5T

Estudios recientes realizados tanto en tejidos de individuos normales, como en individuos con FQ han identificado además del mensajero completo de CFTR, varias moléculas de mRNA que han perdido el exón 4, 9 ó 12. (Zielenski & Tsui, 1995). Aunque el significado biológico de estos procesamientos alternativos no son claros, en pacientes con CBAVD se ha encontrado un alta frecuencia de una variante de empalme localizada en el sitio del brazo aceptor del intrón 8 de CFTR (IVS8-T), (Chillon y cols., 1995) Este sitio presenta tres variantes. el alelo 5, 7 y 9T y la eficiencia con la cual el sitio aceptor de empalme es utilizado está determinado por el número de timidinas (Fig. 4) (Chu y cols., 1991, 1992, 1993). La mayoría de los transcritos CFTR que portan el alelo 5T pierden la secuencia que codifica para el exón 9 (92%) (Chu y cols., 1991, 1992, 1993). El análisis de este polimorfismo en varones con CBAVD reveló que la frecuencia de la variante 5T es 6 veces mayor (30%) en estos pacientes que en la población general (5%) (Chillon y cols., 1995, Zielenski y cols., 1995). Así mismo, se encontró que varones azoospermicos con obstrucción idiopática del epidídimo también presentan una alta frecuencia (47%) de mutaciones en CFTR, así como la variante 5T (14.7%) en caucásicos (Jarvi y cols., 1995), posteriormente en pacientes alemanes con BEDO se encontró una proporción de 21.4% para esta variante polimórfica (Meschede y cols., 1997). Por lo anterior, la variante IVS8-5T del polimorfismo Tn es considerada actualmente como la mutación más común en pacientes con FQ y formas atípicas de la FQ, entre ellas, las anomalías del tracto reproductivo (Chillon cols., 1995; Zielenski cols., 1995), pero con penetrancia incompleta, ya que genotipos

idénticos han sido encontrados también en individuos sanos (Chillon y cols., 1995; Zielenski y cols., 1995)

Aún no queda claro porqué algunas alteraciones en la expresión de CFTR resultan en anomalías del tracto reproductivo, en ausencia de cambios patológicos en otros órganos asociados con FQ (p.e., pulmón, páncreas). Una posibilidad es que el tracto reproductivo sea más sensible a una disfunción de CFTR que otros tejidos, o que el nivel de una proteína CFTR funcional sea diferente en estos tejidos, con una menor expresión en las estructuras de Wolff

TABLA I: MUTACIONES EN EL GEN CFTR EN VARONES INFÉRTILES
(Stuhrmann y cols., 2000)

Desorden	Número de Pacientes Grupo Étnico	proporción de los alelos mutados % Referencia	Mutaciones más frecuentes (%)
CBAVD	25 Norte de Europa	38.0 Anguiano y col (1992)	ΔF508 (26.0)
CBAVD	47 Askenazim	21.3 Augarten y col (1994)	ΔF508 (8.5), D115H (3.2)
CBAVD	102 Caucásicos	65.7 ^a Chillon y col. (1995)	ΔF508 (21.6), 5T (21.1), R347H (2.4)
CBAVD	45 Franceses	75.6 ^b Costes y col (1995)	ΔF508 (25.6), 5T (25.6), R117H (3.3) W1282X (3.3)
CBAVD	25 Caucásicos	52.0 ^c Jarvi y col (1995)	5T (26.0), ΔF508 (12.0), R117H (6.0)
CBAVD	70 Caucásicos	68.6 ^d Zielenski y col (1995)	5T (25.7), ΔF508 (19.3), W1282X (7.9)
CBAVD	101 Alemanes	79.2 ^e dork y col (1997)	ΔF508 (26.2), 5T (12.9), R117H (11.4)
CUAVD	10 Españoles	5.0 Casals y col (1995)	ΔF508 (5.0)
CUAVD	21 Caucásicos	19.0 Mickle y col (1995)	ΔF508 (9.5), R117H (4.8)
BEDO	7 Alemanes	78.6 Meschede y col (1997)	ΔF508 (28.5), 5T (21.4), R117H (14.3)
IASV	16 Alemanes	3.1 Meschede y col. (1997)	I1139V (3.1)
Azoospermia++	17 Caucásicos	23.5 ^e Jarvi y col. (1995)	5T (14.7), R117H (5.9), ΔF508 (2.9)
Azoospermia	21 Caucásicos	9.5 Van der Ven y col. (1996)	ΔF508 (2.4), G551D (2.4), R117H (2.4) G542X (2.4)
Falla espermatogénica	18 Caucásicos	5.5 ^e Jarvi y col (1995)	G542X (2.8), 5T (2.8)
Falla espermatogénica	80 Caucásicos	8.7 Van der Ven y col (1996)	G542X (4.4), ΔF508 (3.1)
Falla espermatogénica	75 Alemanes	2.7 ^f Tuerlings y col (1998)	ΔF508 (1.3), R117H (0.6), 5T (0.6)

+Rastreo incluyendo el alelo 5T, a-f, Frecuencia del alelo 5T en la población general ^a5.2%, n=498, ^b5.3, n=131, ^{c,d}, no determinada, ^e 4.8%, n=186, ^f 3.7%, n=212, ++ Azoospermia con vasos deferentes normales y obstrucción epididimal bilateral

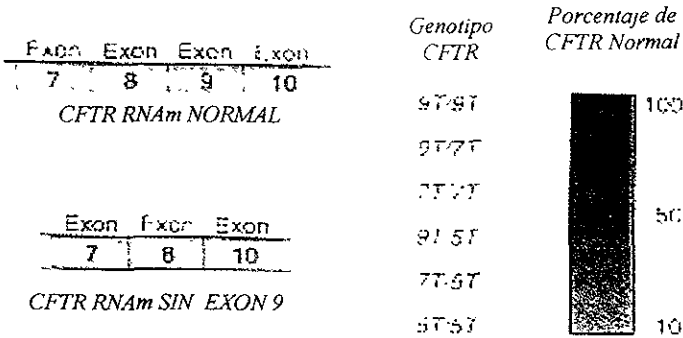
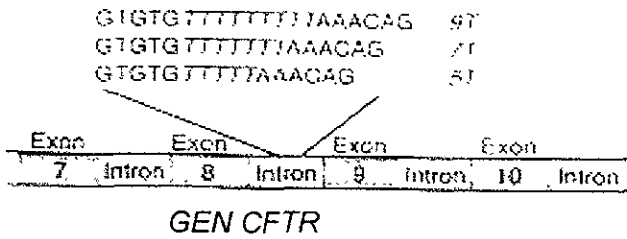


Figura 4: Polimorfismo Tn. Variantes alélicas del polimorfismo Tn en el intrón 8 del gen CFTR (Chillon y cols., 1995).

Teng y colaboradores en 1997, al analizar cualitativa y cuantitativamente el procesamiento alternativo del exón 9 con las diferentes variantes en los transcritos de CFTR en células del epitelio testicular y vasos deferentes, observaron que la eliminación del exón 9 en los conductos deferentes siempre fue mayor, aún cuando estaba presente la variante 9T (Fig. 5). Estos resultados apoyan la hipótesis que existe una diferencia en la eficiencia de procesamiento entre los dos tejidos que contribuye al fenotipo de CBAVD. Esto último implica la posibilidad de que exista un mecanismo de procesamiento a nivel transcripcional en los conductos deferentes menos eficiente que en las células epiteliales. Así, la variación en el procesamiento del RNA entre los diferentes tejidos donde se expresa CFTR genera una posible explicación para las anomalías observadas en hombres infértiles, sin otra manifestación clínica de FQ (Mak y cols., 1997). Sin embargo, hasta aquí surgía la pregunta de porqué si la proteína CFTR es la responsable de CBAVD y otras formas de infertilidad primaria masculina, no todos los pacientes presentaban mutaciones en los dos alelos. De hecho sólo en alrededor del 20% se han encontrado dos alteraciones. Una explicación puede ser que esta patología sea causada por alteraciones

en otros genes o por mutaciones en otras partes del gen CFTR que no han sido determinadas (Lissens y cols., 1996)

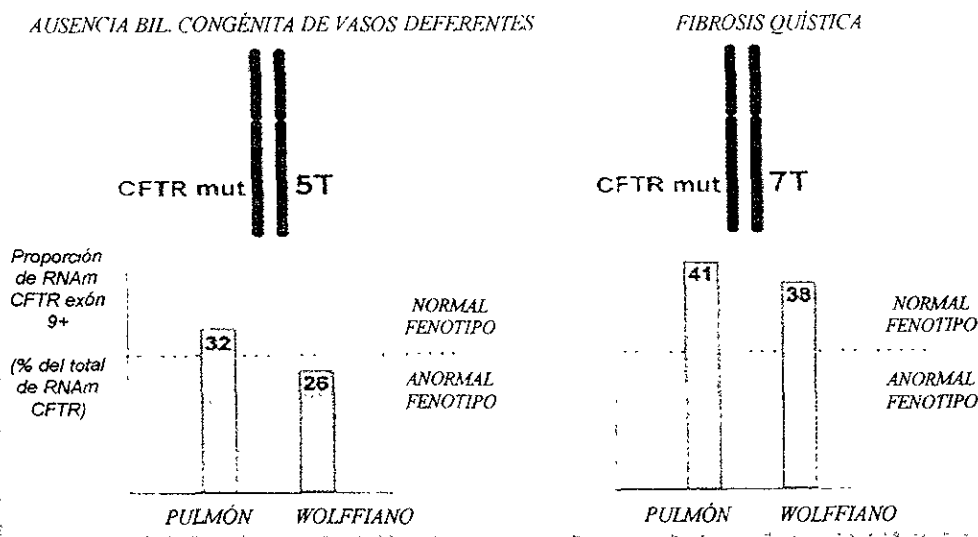


Figura 5: Correlación genotipo fenotipo del polimorfismo Tn. Expresión de las variantes alélicas del polimorfismo Tn del gen CFTR en pacientes CBAVD y FQ (Mark y cols., 1997).

El consejo genético en pacientes con esterilidad primaria

Dada la elevada frecuencia de mutaciones en el gen FQ encontrada en pacientes con CBAVD, así como en pacientes con otras anomalías del tracto reproductivo, esta patología se ha clasificado como una enfermedad autosómica recesiva (Oates y Amos, 1994). Sin embargo, es muy importante considerar que parte de esta condición no está asociada con mutaciones en el gen FQ, si no a malformaciones renales. Por lo tanto es de vital importancia conocer cuál es la etiología de la enfermedad, para poder brindar un consejo genético adecuado en términos de opción reproductiva (Patricio y Zielenski, 1996). Por lo anterior, cada varón con CBAVD debe ser examinado por un médico con experiencia en FQ, ya que pueden estar presentes síntomas leves de FQ como sinusitis. También debe incluirse un examen en búsqueda de malformaciones renales, una búsqueda de las mutaciones más frecuentes en el gen CFTR en la población y el análisis del polimorfismo 5T en estos pacientes.

Cuando en estos pacientes son detectadas mutaciones en el gen FQ, estos tienen una posibilidad del 50 % de heredar un alelo FQ a su descendencia. De igual manera sus hijos presentan un riesgo del

5% de heredar a sus hijos el mismo genotipo. Por lo tanto, un varón con CBAVD o con una de las demás patologías donde se ha encontrado mutaciones en CFTR, debe ser informado acerca de su condición de portador de mutaciones en el gen CFTR y de las consecuencias que esto conlleva. Dado que pacientes con esta patología presentan una espermatogénesis normal y tienen la posibilidad de una fertilización *in vitro*, que conlleva a la transmisión de genes deletéreos

JUSTIFICACIÓN

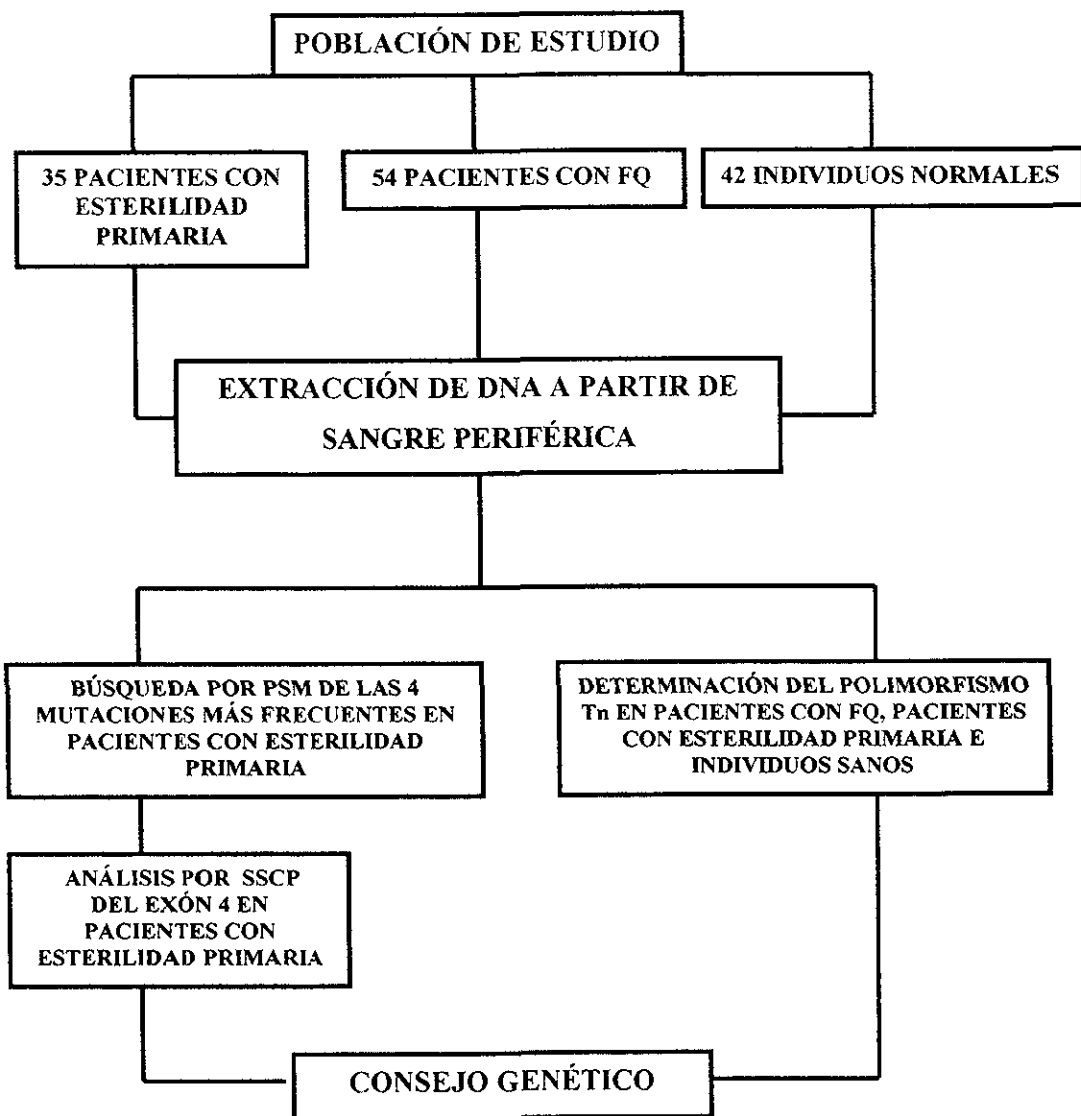
Dado que se ha encontrado en pacientes con infertilidad primaria, como CBAVD, CUAVD, BEDO u obstrucción bilateral del epidídimo, una elevada frecuencia de mutaciones en el gen CFTR responsable de la FQ y aunado a la posibilidad que tienen estos pacientes de procrear hijos mediante técnicas de fertilización *in vitro*, lo que conlleva a la transmisión de genes deletéreos a las siguientes generaciones, hace necesaria la detección de las mutaciones en el gen CFTR asociadas con esterilidad primaria que nos permita brindar un diagnóstico oportuno a estos individuos.

Además, con el conocimiento de las mutaciones responsables de la FQ, es posible detectar a los portadores y brindar diagnóstico prenatal, lo cual es de suma importancia para disminuir la incidencia de la enfermedad y proporcionar un asesoramiento genético de certeza.

OBJETIVOS

- Determinar la presencia de las 4 mutaciones más frecuentes en el gen CFTR: $\Delta F508$, G542X, N1303K y $\Delta I507$, así como la mutación R117H, en pacientes mexicanos con esterilidad primaria
- Determinar si existen diferencias significativas en la frecuencia del polimorfismo Tn en el gen CFTR en pacientes con esterilidad primaria, pacientes con FQ y en la población normal
- Determinar si el polimorfismo Tn puede ser utilizado como un marcador para el rastreo de mutaciones en el gen CFTR
- Correlacionar el genotipo encontrado con la presencia de esterilidad primaria

ESTRATEGIA GENERAL



MATERIALES Y MÉTODOS

1) Población objetivo

La población estudio se dividió en 3 grupos. En el primero se analizaron 35 pacientes no emparentados, con diagnóstico clínico de esterilidad primaria por azoospermia obstructiva, cuyos padres y abuelos son mexicanos, captados durante el período de enero de 2000 a enero de 2001 en el servicio de Andrología del Instituto Nacional de Perinatología; 54 pacientes con diagnóstico clínico de FQ provenientes del banco de DNA del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría. Así como 42 individuos de la población normal captados durante el período de enero de 2000 a enero de 2001 en el Instituto Nacional de Pediatría.

Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de esterilidad primaria por azoospermia obstructiva idiopática confirmada por análisis de semen (bajo volumen <5 ml, pH <7 y azoospermia) y que no presentaban síntomas clásicos de FQ.

Criterio de exclusión

Pacientes con esterilidad por problemas prostáticos y malformaciones renales.

Valoración clínica de los pacientes con esterilidad primaria

La valoración clínica de los pacientes de esterilidad primaria por azoospermia obstructiva, se realizó mediante palpación de los vasos deferentes, medición del tamaño testicular, así como el estado de los mismos; posteriormente el diagnóstico se confirmó por ultrasonido, valorando al mismo tiempo la presencia y estado de epidídimo, vesícula seminal y conductos de eyaculación.

Creación del banco de DNA

Extracción del DNA

Se tomaron 10 ml de sangre periférica del paciente utilizando EDTA como anticoagulante (Técnica convencional de fenol-cloroformo). La muestra se centrifugó por 20 minutos a 3000 rpm, el plasma y los eritrocitos se desecharon, la capa de leucocitos se separó y se colocó en 3 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina, finalmente el botón de leucocitos fue resuspendido en 333µl de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de leucocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42°C para obtener un lisado de leucocitos.

Purificación del DNA

Al lisado se le agregaron 2 ml de fenol saturado, la mezcla se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. La fase superior se colocó en un tubo limpio sin tocar las interfases. La fase superior se pasó a un tubo limpio y se agregaron 1 ml de fenol saturado y 1 ml de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase. Este último paso se repitió una vez más. A la fase superior se le agregaron 2 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitando suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. La fase superior se colocó en un tubo limpio y se le agregaron 90µl de CINa [1M] y 3ml de etanol absoluto a -20°C. La mezcla se agitó suavemente hasta que las hebras de DNA se hicieran evidentes.

El DNA se extrajo con una pipeta pasteur sellada. Se enjuagó en etanol a -20°C, dejando secar a temperatura ambiente, posteriormente se diluyó en 200 µl de amortiguador TE y se almacenó a 4°C hasta su utilización (Orozco y cols., 1997).

Cuantificación del DNA

La cuantificación se realizó diluyendo 1 μ l de la muestra de DNA en 250 μ l de agua estéril y midiendo su densidad óptica en una longitud de onda (λ) de 260 nm, el dato obtenido se sustituyó en la siguiente fórmula (Orozco y cols., 1997)

$$(\text{DO}) (\text{F}) (\text{dil}) = [\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Donde:

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

F = Constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 DO_{260})

Dil = volumen de disolución equivalente a 250 μ l

Evaluación de la integridad de DNA

Después de la extracción del DNA se comprobó su integridad por electroforesis en geles, para lo cual se mezcló 3 μ l de muestra con 3 μ l de bromofenol-xilencianol (0.05% · 0.05%), corriendo en un gel de agarosa al 2% con 70 μ l de bromuro de etidio [200 ng/ μ l] por 20 minutos a 120 volts. En todos los casos se considera un DNA íntegro aquel que presenta una banda gruesa y nítida localizada por encima de la banda de 23000 pb del marcador de pesos moleculares λ /hind III

Búsqueda de mutaciones.

Análisis de las mutaciones más frecuentes en el gen CFTR por PSM

A todos los pacientes se les realizó el tamizaje de las mutaciones más frecuentes en el gen CFTR a nivel mundial, como son las mutaciones Δ F508, G542X, N1303K y Δ I507, utilizando la técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM) (Tabla 2). La PSM consiste en la generación y eliminación de un sitio de restricción específico, cambiando una sola base en los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los exones donde se localizan estas mutaciones, lo que hace posible diferenciar el alelo alterado del silvestre (Tabla 3).

Mutación	Localización (exón)	Cambio de Nucleótido	Consecuencia
ΔF508	10	Delección de 3pb entre 1652 y 1655	Delección de la fenilalanina 508
G542X	11	G→T en la posición 1756	Gly→Codón de terminación
ΔI507	10	Delección de 3pb entre 1648 a 1653	Delección de la isoleucina 507
N1303K	21	C→G en la posición 1756	Asn→Lys

Tabla 2 Características de las mutaciones que se analizaron por PSM.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron para analizar las mutaciones más frecuentes fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) 94°C	2 min	1
a) 94°C	30 seg	
b) 55°C	30 seg	30
c) 72°C	30 seg	
c) 72°C	1 min	1

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización

Mezcla de reacción. 100 ng de DNA, 5 µl de Buffer (N808-0006, Perkin Elmer) 200 µM de cada uno de los dNTP, 10 picomoles de cada oligonucleótido y una unidad de Taq polimerasa en un volumen final de reacción de 50 µl. La amplificación se realizó en un termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT). Después de la digestión de los amplificadores, los fragmentos se analizaron en geles de acrilamida al 10% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

MUTACION	OLIGONUCLEOTIDOS	ENZIMA	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO	ALELO CORTADO	FRAGMENTOS GENERADOS
ΔF508	F* GCACCATTAAAGAAAATAT <u>Q</u> AT R CATTACAGTAGCTTACCCA	MboI	219 pb	Silvestre	202 + 17 pb
G542X	F CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGI R* CACTCAGTGTGATTCCACCTTC <u>Δ</u> C	HphI	180 pb	Silvestre	168 + 12 pb
N1303K	F GAAATATTTTACAATAACAATAAGGG R*. CTCCACTGTTTCATAGGGATC <u>I</u> AA	DdeI	144 pb	Silvestre	123 + 21 pb
ΔI507	F* GCCTGGCACCATTAAAGAA <u>A</u> GATC R CTAACCGATTGAATATGGAGCC	BglII	181 pb	Mutante	157 + 24 pb

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la PSM, enzimas de restricción y tamaños de los fragmentos. La base subrayada es la que introduce la mutación en el producto amplificado (Orozco y cols., 1997).

Caracterización del polimorfismo (Tn) en el intrón 8

Análisis del polimorfismo Tn por fragmentos de restricción

PCR inicial

Para determinar la presencia del polimorfismo, se realizó una amplificación inicial del exón 9 mediante la PCR, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

9i-5'-TAATGGATCATGGGCCATGT-3'

9i-3'-ACAGTGTGAATGTGGTGCA-3'

Condiciones de reacción:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) 94°C	2 min	1
a) 94°C	20 seg	
b) 55°C	20 seg	35
c) 72°C	30 seg	
a) 94°C	12 seg	
b) 55°C	12 seg	1
c) 72°C	7 min	

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización

Mezcla de reacción. 5µl de Buffer (N808-0006, Perkin Elmer) 200µm de cada uno de los dNTP, 10 picomoles de cada oligonucleótido y una unidad de Taq polimerasa en un volumen final de reacción de 25µl y una concentración de DNA de 100 ng. La amplificación se realizó en un termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT).

PCR anidado

Para amplificar la secuencia de los polimorfismos (T)_n se tomó 1 µl del PCR inicial y se reamplificó con los siguientes oligonucleótidos:

19D9 5'-CCGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTT-3'

E9R2 5'-GGATCCAGCAACCGCCAACA-3'

Con las siguientes condiciones de amplificación:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) 94°C	5 min	1
a) 94°C	20 seg	
b) 60°C	20 seg	35
c) 72°C	30 seg	
c) 72°C	7 min	1

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización

Restricción de los amplificados

Los amplificados obtenidos del PCR anidado se les adicionó una unidad de la enzima de restricción *XmnI* por un periodo de 48 horas a una temperatura de 37 °C, dicha digestión genera un fragmento constante de 120 pb y uno variable de 77, 79 y 81 pb, dependiendo del polimorfismo presente.

La digestión total del fragmento se confirmó analizando una fracción de 3 µl de la muestra mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV.

Electroforesis en gel de acrilamida

Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida al 15%. Se mezcló 8 µl de la digestión con 5 µl del colorante xilencianol-azul de bromo fenol, se corrió a 500 volts por 24 horas y se visualizaron mediante tinción de oxido de plata (Merril y cols., 1984).

Análisis del polimorfismo Tn por PCR directo

Este ensayo consiste en la amplificación directa de los alelos 5T, 7T y 9T. Se basa en una alineación errónea entre el molde y el oligonucleótido ya que difiere el número de timidinas presentes en el intrón 8 y dado las altas condiciones de severidad en las cuales se realiza este proceso, la amplificación ocurre únicamente cuando un oligonucleótido se alinea con el molde específico. Se utilizó esta metodología alterna para el análisis del polimorfismo Tn, debido a que es una técnica más directa y rápida.

Oligonucleótidos R:	Producto de PCR (pb)
F5T alelo: 5'- CCCCAAATCCCTGTAAAAAAC - 3'	136
F7T alelo: 5'- CCCCAAATCCCTGTAAAAAAAC - 3'	138
F9T alelo: 5'- CCCCAAATCCCTGTAAAAAAAAC - 3'	140

Oligonucleótido F común:

5'- TAATGGATCATGGGCCATGT- 3', (9i-5, F) (Zielenski, Genomics 1991; 10214-28).

Condiciones de reacción: 0.1µg de DNA genómico, 75 ng del oligonucleótido F, 75 ng del primer específico R, 1.5 mM MgCl₂, 67 mM Tris (pH 8.8), 10 mM 2-mercaptoethanol, 16.6 mM sulfato de amonio, 6.7 µM de EDTA y 1 U de DNA polimerasa con el anticuerpo monoclonal TaqStart (Clontech, Palo Alto, CA), por cada 25µl de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT).

Bajo las siguientes condiciones.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) 94°C	3 min	1
a) 94°C	30 seg	
b) 64°C	1 min	40
c) 72°C	30 seg	
c) 72°C	7 min	1

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% (NuSieve/SeaKem) teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de UV. Las condiciones de amplificación son las mismas para las tres variantes.

Detección de la mutación R117H por análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).

Se utilizó la técnica de SSCP, la cual se basa en el principio de que las moléculas de DNA al desnaturalizarse toman una conformación característica que depende de su secuencia nucleotídica, por lo que presentan patrones electroforéticos particulares en geles de poliacrilamida, esta metodología posee una sensibilidad que permite detectar variaciones en la secuencia del DNA, desde 1 hasta 1000 pares de bases (Orita y cols , 1989).

En este estudio se analizó en todos los pacientes con esterilidad primaria el exón 4, región donde se localiza la mutación R117H descrita como una de las alteraciones frecuentes en pacientes con esta patología, bajo las condiciones descritas por Zielenski y cols. en 1991. Utilizando un dNTP marcado con un isótopo radiactivo durante el periodo de amplificación, de tal forma que las

conformaciones adquiridas por los amplificados pueden ser observados mediante autorradiografía, después de su corrimiento en geles de poliacrilamida.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes

Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) 94°C	2 min	1
a) 94°C	30 seg	
b) 55°C	30 seg	30
c) 72°C	30 seg	
c) 72°C	1 min	1

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización

Mezcla de reacción. 5 μ l de Buffer (N808-0006, Perkin Elmer) 200 μ m de cada uno de los dNTPs, 10 picomoles de cada oligonucleótido y una unidad de Taq polimerasa en un volumen final de reacción de 25 μ l y una concentración de DNA de 100 ng. La amplificación fue en un termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT). Se genera un amplificado de 220 pb.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el exón 4 fueron los siguientes:

F 5' -TCACATATGGTATGACCCTA- 3'

R 5' -TTGTACCAGCTCACTACCTA- 3'

Una vez concluida la PCR en presencia de (α -³²P) dCTP, se mezcló 1.5 μ l del amplificado con 9 μ l del colorante se incubó por 10 min a 99 °C para desnaturalizar el DNA. Inmediatamente después se coloca en hielo por 5 min y se aplica 3 μ l de cada muestra en un gel de acrilamida al 30% y los resultados se observaron por autorradiografía.

Análisis Estadístico

Las diferencias entre las proporciones determinadas para el polimorfismo Tn fueron probadas por Chi cuadrada en tablas de dos por dos utilizando la corrección de Yates para continuidad. Los valores de P que resultaron menores a 0.05 fueron considerados como significancia estadística

RESULTADOS

Valoración clínica de los pacientes con esterilidad primaria

El análisis clínico de los pacientes reveló que las causas más frecuentes de esterilidad primaria fue la hipotrofia bilateral testicular ya que se presentó en 13 de los pacientes, así como el varicocele bilateral el cual se observó en 12 de ellos 6 individuos tenían varicocele unilateral, 5 epididimitis unilateral, 3 epididimitis bilateral, 2 CBAVD, 2 CUAVD, 2 quiste epididimal, y uno presentó adelgazamiento unilateral del vaso deferente y 11 de ellos fueron azoospermicos idiopáticos (Tabla 4) Cabe señalar que la mayoría de los pacientes presentaban más de una de las alteraciones

Tabla 4: Distribución del polimorfismo Tn del gen CFTR en pacientes mexicanos con esterilidad primaria.

PADECIMIENTO	POLIMORFISMO Tn (%)			PACIENTES
	T9	T7	T5	
Hipotrofia bilateral testicular	3 alelos	23 alelos	0	13
Varicocele bilateral	2 alelos	23 alelos	1 alelo	12
Varicocele unilateral	3 alelos	8 alelos	1 alelo	6
Epididimitis unilateral	1 alelo	9 alelos	0	5
Epididimitis bilateral	0	6 alelos	0	3
CBAVD	0	4 alelos	0	2
CUAVD	0	3 alelos	1 alelo	2
Quiste epididimal	0	4 alelos	0	2
Adelgazamiento unilateral de vaso deferente	0	2 alelos	0	1
Azoospermia ideopática	0	22 alelos	0	11

Análisis de las mutaciones más frecuentes por PSM en pacientes con esterilidad primaria

Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación $\Delta F508$. En la figura 6 se muestra el patrón de restricción obtenido al buscar dirigidamente en el exón 10 la mutación $\Delta F508$, donde el alelo que no porta la mutación se corta con la enzima Mbo I generando un fragmento de 202 pb y uno de 219 pb cuando ésta mutación esta presente.

En cuanto a los pacientes con esterilidad primaria, ninguno de ellos presento esta mutación. Para determinar la asociación del polimorfismo Tn con esta mutación se utilizaron 29 pacientes con FQ, donde 10 eran homocigotos $\Delta F508$, 5 heterocigotos compuestos $\Delta F508$ y 14 heterocigotos $\Delta F508$ con un alelo sin caracterizar; posteriormente a estos mismos pacientes se les determinó la variante alélica del polimorfismo Tn que poseen.

Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación G542X El alelo que no porta la mutación se corta con la enzima Hph I, generándose un fragmento de 168 pb y el mutado que no se corta da un fragmento de 180 pb (Fig 7)

En cuanto a los pacientes con esterilidad primaria, ninguno de ellos presentó esta mutación. Para determinar la asociación del polimorfismo Tn con esta mutación se utilizaron 5 pacientes con FQ, donde 2 eran homocigotos G542X, 2 heterocigotos compuestos G542X y 1 heterocigoto G542X con un alelo sin caracterizar; de igual manera a estos mismos pacientes se les determinó la variante alélica del polimorfismo Tn que poseen.

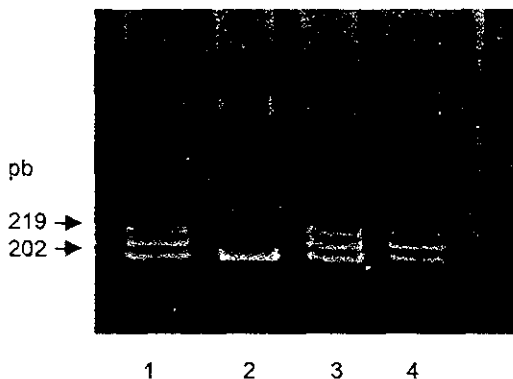


Figura 6. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por PSM. Carril 1, 3, y 4: pacientes heterocigotos y carril 2: paciente homocigoto $\Delta F508$.

Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación N1303K. El alelo que no porta la mutación se corta con la enzima Dde I, generándose un fragmento de 123 pb y el mutado que no se corta da un fragmento de 144 pb (Fig. 8).

Al igual que los casos anteriores, esta mutación no se presentó en los pacientes con esterilidad primaria. En pacientes con FQ portadores de la mutación N1303K no se caracterizó el polimorfismo Tn.

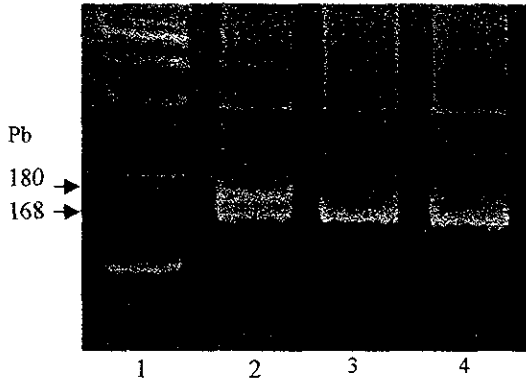


Figura 7: Análisis de la mutación G542X por PSM. Carril 1: Marcador DNA ladder 100 pb. carril 2: heterocigoto para la mutación G542X y carriles 3 y 4 homocigotos.

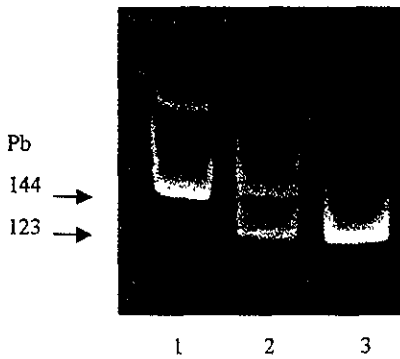


Fig. 8: Análisis de la mutación N1303K por PSM: Marcador DNA ladder 100 pb. carril 2: heterocigoto para la mutación y carril 3: homocigoto.



Fig. 9: Análisis de la mutación $\Delta I507$ por PSM: carril 1: Marcador DNA ladder 100 pb; carriles 2.5-8,10. normales, carril 3. $\Delta I507$ /normal; carril 4 $\Delta F508$ /normal; carril 9 $\Delta F508/\Delta I507$.

Mutagénesis dirigida para la detección de la mutación $\Delta I507$ El análisis de esta mutación representa un problema de diagnóstico especial. El alelo $\Delta I507$ no puede ser amplificado cuando se utilizan los oligonucleótidos específicos para la $\Delta F508$, debido a que la deleción de 3 pb del alelo $\Delta I507$ es aledaño al sitio donde dicho oligonucleótido cambia de base. De esta manera, un heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$ aparece con un patrón electroforético idéntico al homocigoto $\Delta F508$ (fig. 9 carril 9), y los individuos $\Delta I507/X$ y $\Delta I507/N$ aparecen como normales (fig. 9 carril 3).

Al amplificar la mutación $\Delta I507$ por PSM, se forma un sitio de restricción para la enzima BglII en el alelo mutado. El producto mutado es un fragmento de 181 pb que es cortado en dos fragmentos, uno de 157 y otro de 24 pb que no se observa en el gel. Por lo tanto, un homocigoto muestra una banda de 181 pb correspondiente al amplificado sin cortar (fig. 9 carril 2); mientras que un paciente homocigoto $\Delta I507$ presentaría una banda de 157 pb, como consecuencia del corte de la enzima. Los portadores sanos para esta mutación mostraron la formación de un heterodúplex (fig. 9 carriles 5-8). Por lo tanto, en los heterocigotos compuestos $\Delta F508/\Delta I507$ no se formó la heterodúplex debido a que las cadenas sencillas de los alelos $\Delta F508$ y $\Delta I507$ no se aparean a consecuencia de la presencia de 6 pb no complementarias entre sí, como resultado de la deleción de 3 pb aledañas que presenta cada alelo (fig. 9 carril 9).

Por último el análisis de los 35 pacientes con esterilidad primaria determinó que ninguno de ellos portaba la mutación $\Delta I507$. En cuanto a los pacientes con FQ utilizados para determinar la asociación de esta mutación con el polimorfismo Tn, sólo se contó con uno heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$.

Otras mutaciones. Para determinar la asociación del polimorfismo Tn con mutaciones presentes en alelos FQ, se utilizó un paciente homocigoto S549N, un heterocigoto compuesto S549N, un heterocigoto S549N donde no se había caracterizado la otra mutación, dos heterocigotos compuestos G551S, un heterocigoto compuesto R75X/W1098C, 16 heterocigotos donde no se conocía una de las mutaciones y 19 que no tenían ningún alelo caracterizado.

Análisis del exón 4 por SSCP en pacientes con esterilidad primaria

El análisis por SSCP del exón 4 del gen CFTR de los 35 pacientes con esterilidad primaria, determinó que ninguno de ellos presentaba alteración en dicho exón, donde se localiza la mutación R117H, la cual se presenta con mayor frecuencia en este tipo de pacientes (Fig. 10).

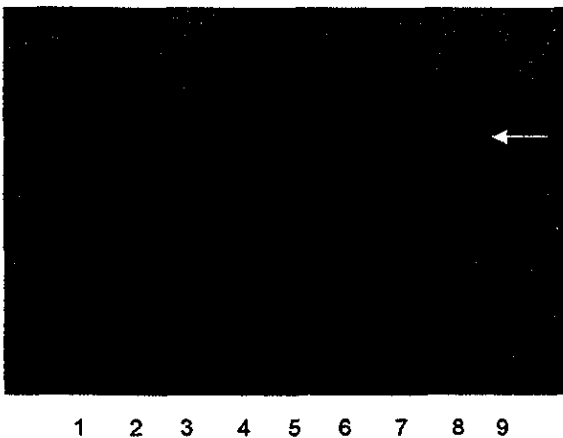


Figura 10: SSCP exón 4. Carriles 1-7,9: pacientes con esterilidad primaria; Carril 8: control con la mutación R117H (la flecha señala la banda que corresponde al control positivo para la mutación R117H).

Análisis del polimorfismo Tn por fragmentos de restricción

Este análisis se realizó en tres pasos. En el primero de ellos se amplificó una región de 560 pb (Fig. 11) que se utiliza como molde para un PCR anidado (Fig. 12). Este amplificado al digerirse con la enzima de restricción *Xmn I*, genera dos fragmentos, uno constante de 120 pb y uno variable que depende del polimorfismo presente: 81 pb (9T/9T), 79 pb (7T/7T) y/o de 77 pb (5T/5T) en los homocigotos, 81/79 pb (9T/7T), 81/77 pb (9T/5T) y 79/77 pb (7T/5T) en los heterocigotos, los cuales fueron analizados en geles de poliacrilamida mediante tinción por óxido de plata (Fig. 13).

El polimorfismo Tn por esta técnica se determinó mediante las diferencias en el corrimiento en la matriz de poliacrilamida. En los casos donde en el DNA no está 100% íntegro y la amplificación directa es dudosa, esta metodología determina si se trata de un heterocigoto u homocigoto, al presentar dos bandas o una banda respectivamente.

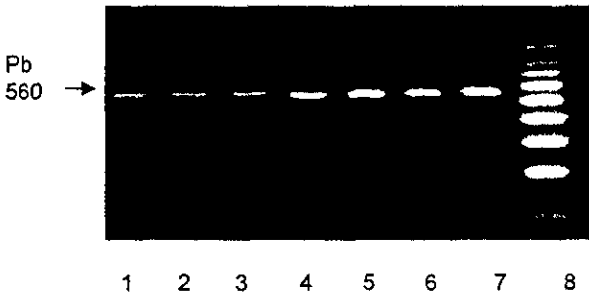


Figura 11: Amplificado del intrón 8/exón 9. Carriles 1-3: pacientes con azoospermia, carriles 4-7: individuos sanos y carril 8: Marcador DNA ladder 100 pb.

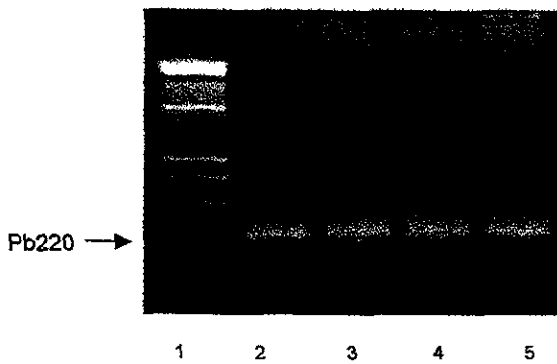


Figura 12: Producto de la PCR anidada. Carril 1: Marcador DNA ladder 100 pb; carriles 2-4: pacientes con esterilidad primaria; carril 5: control.

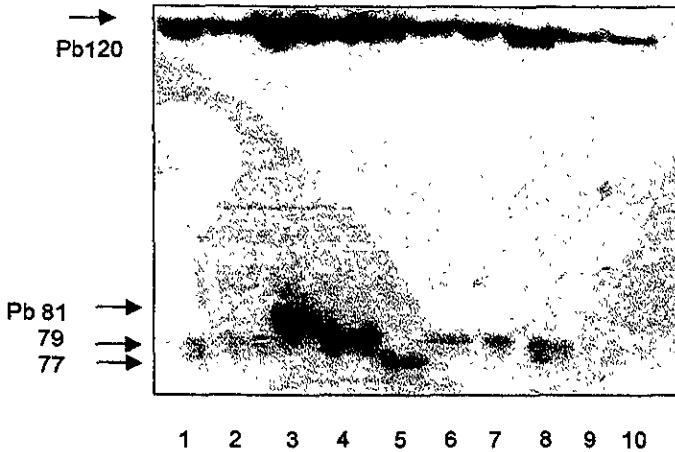


Figura 13: Patrón de migración del polimorfismo Tn por tinción con óxido de plata. Carriles 1 y 8: heterocigotos 7T/5T; carriles 2,6,7,9 y 10: homocigotos 7T; carril 3: homocigoto 9T; carril 4: homocigoto 7T; carril 5: homocigoto 5T.

Análisis del polimorfismo Tn intrón 8 gen CFTR por PCR directo

Para la determinación del polimorfismo Tn, la población a analizar se dividió en tres grupos

Grupo 1: pacientes con FQ

Grupo 2: pacientes con esterilidad primaria

Grupo 3. población normal

Se caracterizó el polimorfismo Tn en una muestra de 54 pacientes con FQ, 35 pacientes con esterilidad primaria y 42 individuos de la población normal. Las variantes alélicas del polimorfismo Tn presentes en cada uno de los pacientes se determinaron en tres diferentes reacciones. En la figura 14 se puede observar que una misma muestra se amplificó por separado tanto para el 9T, como para el 7T y 5T. Si la muestra amplifica en una sola reacción el paciente es homocigoto para esta variante. Si amplifica en dos de las reacciones es heterocigoto para dos variantes alélicas.

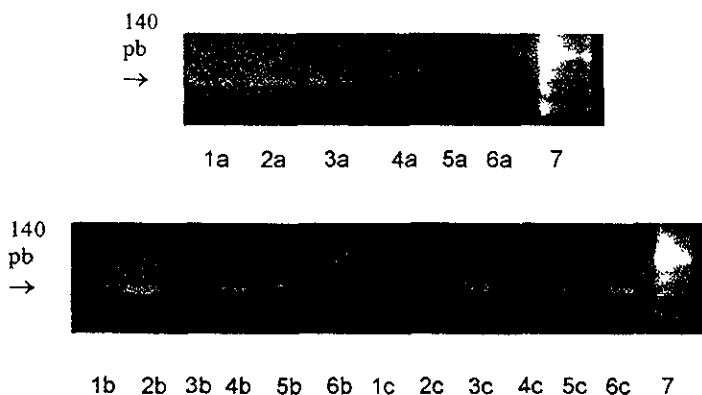


Figura 14: Caracterización del polimorfismo Tn por PCR directo. a: amplificados para T9. b: amplificados para T7. c: amplificados para T5. Carril 1: Paciente EP T9/T9; carriles 2: Paciente EP T9/T7; carril 3: Paciente EP T9/T5; Carril 4: Paciente EP T7/T7; Carril 5: Paciente EP T7/T5; Carril 6: Paciente EP T5/T5; Carril 7. marcador ladder DNA 50 pb.

Grupo 1 pacientes con FQ

Para determinar la asociación del polimorfismo Tn en pacientes con FQ se analizaron 54 pacientes con esta patología. La muestra estuvo constituida por 20 pacientes con ambos alelos caracterizados: 10 homocigotos $\Delta F508$, 2 homocigotos G542X y un homocigoto S549N. 2 heterocigotos compuestos $\Delta F508/G542X$, 2 heterocigotos compuestos G542X/G551S, un heterocigoto compuesto G542X/S549N, un heterocigoto compuesto R75X/W1098C y un heterocigoto compuesto $\Delta F508/\Delta I507$. Así como 15 pacientes con al menos un alelo caracterizado donde 13 son heterocigotos para la $\Delta F508$, dos para la S549N, y 19 pacientes con genotipo desconocido (Tabla 5)

El análisis del polimorfismo Tn en estos pacientes reveló que tanto los individuos homocigotos, como los heterocigotos para la mutación $\Delta F508$ portaban la variante 9T (Tabla 6), igual que lo reportado en la literatura, por lo tanto este resultado apoya la teoría de un origen común para esta mutación, ya que siempre se ha encontrado asociada a esta variante polimórfica. Así mismo, los 7 alelos G542X (100%) analizados en este estudio también presentaron asociación con el polimorfismo 9T, mientras que los 5 (100%) alelos S549N mostraron asociación con el polimorfismo 7T (Tabla 6). En este grupo no se encontró la variante 5T.

En los 19 pacientes con ningún alelo caracterizado se encontró que de los 38 alelos 32 tenían la variante 7T, 2 portaban el polimorfismo 9T y 4 alelos presentaron el 5T (Tabla 6)

El análisis del polimorfismo Tn en 84 alelos de una población normal reveló que el 98.8 % (83 alelos) portaban el alelo 7T a diferencia del 83.3% reportado en otras poblaciones (Chillon y cols., 1995).

Es notable la gran diferencia entre las proporciones de Tn entre los pacientes de FQ y los pacientes con esterilidad primaria, donde 9T en pacientes con FQ es de 47.22% y de un 100% con las mutaciones $\Delta F508$ y G542X y mucho mayor al 7.14% de los pacientes con esterilidad primaria, y aún más con 0% obtenido de la población general mexicana; sin embargo, este último valor necesita ser determinado en un mayor número de muestra (Tabla 7)

En el caso de 7T en pacientes con FQ fue de 49.07% menor al 90.0% de pacientes con esterilidad primaria y al 98.8% de población normal.

Tabla 5: Distribución del polimorfismo Tn del gen CFTR en los diferentes genotipos en pacientes mexicanos con FQ.

Genotipo	Pacientes con ambos alelos caracterizados (N. de alelos)								Pac. con un sólo alelo caract.		Pac. sin genotipo caract.	Total Alelos
	$\Delta F508$ $\Delta F508$	G542X G542X	S549N S549N	$\Delta F508$ G542X	$\Delta F508$ G551S	G542X S549N	R75X W109C	$\Delta F508$ $\Delta I507$	$\Delta F508$ X	S549N X	X/X	
9T	20	4	-	4	2	1	-	1	17	-	2	51
7T	-	-	2	-	2	1	2	1	9	4	32	53
5T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4

Tabla 6: Asociación del polimorfismo Tn del gen CFTR con las mutaciones presentes en pacientes mexicanos con FQ.

Genotipo	$\Delta F508$	G542X	S549N	G551S	R75X	W1098C	$\Delta I507$	X	Total de alelos
9T	38	7	-	-	-	-	-	6	51
7T	-	-	5	2	1	1	1	43	53
5T	-	-	-	-	-	-	-	4	4

Grupo 2 pacientes con esterilidad primaria

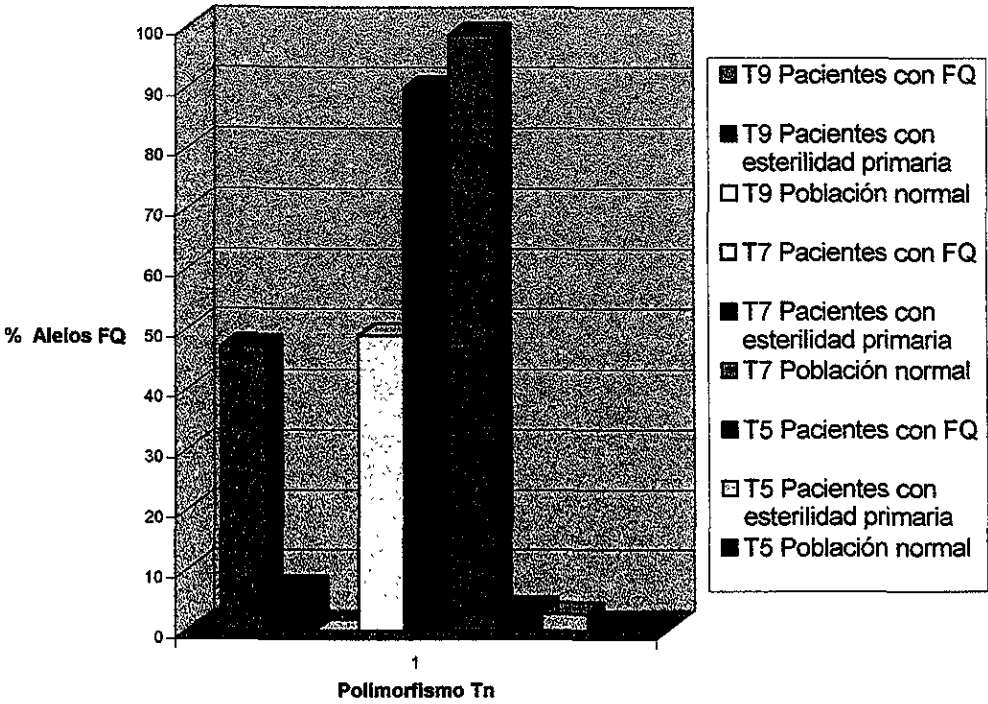
Se sometieron al estudio 35 pacientes con diagnóstico clínico de esterilidad primaria, para la caracterización del polimorfismo Tn, la mayoría de los pacientes presentaban más de un padecimiento (Tabla 4). Se determinó que el 7.14% (5 alelos) portaban la variante 9T, 90% (63 alelos) la variante T7 y 2.86% (2 alelos) la variante 5T (Tabla 7, Gráfica 1).

Grupo 3 población normal

Se sometieron al estudio 42 individuos normales, de los cuales 41 resultaron homocigotos T7 y sólo 1 resultó ser heterocigoto T7/T5 (Tabla 7 y gráfica 1).

Tabla N. 7: Frecuencia del polimorfismo Tn del gen CFTR en pacientes con FQ, pacientes con esterilidad primaria y población general.

	Frecuencia polimorfismo Tn % (N. de alelos)			Total de alelos analizados
	T9	T7	T5	
Pacientes con fibrosis quística	47.22 (51 alelos)	49.07 (53 alelos)	3.70 (4 alelo)	108
Pacientes con esterilidad primaria	7.14 (5 alelos)	90.0 (63 alelos)	2.86 (2 alelos)	70
Población general	<1	98.8 (83 alelos)	1.2 (1 alelo)	84



Gráfica I: Frecuencia del polimorfismo Tn en pacientes con FQ, pacientes con esterilidad primaria y población normal.

DISCUSIÓN

Estudios genéticos moleculares del gen CFTR desarrollados durante los últimos 10 años han revelado que mutaciones en el gen CFTR no sólo desembocan en manifestaciones de FQ típica, si no que también se encuentran asociadas a otras patologías. Como resultado de estos análisis, varias enfermedades ahora se consideran o clasifican como formas atípicas monosintomáticas de la FQ, dentro de las cuales se encuentra la esterilidad primaria causada por CBAVD, CUAVD, obstrucción bilateral o unilateral de los ductos eyaculatorios, obstrucción bilateral del epididimo o idiopática. Por lo que, estos varones deben ser considerados como individuos con un alto riesgo de ser portadores de mutaciones en el gen CFTR (Stuhrmann y cols., 2000)

En México, la frecuencia real de la FQ se desconoce, ya que se trata de uno de los muchos padecimientos en los que existe un subdiagnóstico; sin embargo, manifestaciones clínicas de FQ se encontraron en el 1% de las autopsias realizadas en el Instituto Nacional de Pediatría (Orozco y cols., 1995) Hasta el momento la prueba de gabinete más confiable para el diagnóstico clínico de esta enfermedad es la determinación de cloruros en sudor, sin embargo este método tiene ciertas desventajas en aquellos casos donde los pacientes presentan niveles de cloruros en sudor entre los límites normal (<60 mEq) y anormal, así como la imposibilidad de detectar portadores asintomáticos.

En contraste, el diagnóstico molecular permite detectar y clasificar las mutaciones en el gen CFTR ya sean graves o leves, con lo cual es posible establecer en estos pacientes un pronóstico de la enfermedad. Además, con el conocimiento de las alteraciones responsables de la FQ en una familia, es posible brindar un diagnóstico temprano, un tratamiento oportuno, así como detectar a los portadores lo cual es de suma importancia para proporcionar un asesoramiento genético adecuado a los familiares de un paciente afectado con FQ.

CBAVD al igual que otras formas de infertilidad masculina es, en la mayoría de los casos, una manifestación clínicas en el tracto reproductivo de la FQ y generalmente los genotipos encontrados en estos pacientes consisten de una mutación severa y una mutación leve o de dos mutaciones leves en el gen CFTR.

Actualmente, se han descrito más de 950 mutaciones en el gen CFTR a nivel mundial. La mayoría de éstas son poco comunes y presentan una frecuencia menor al 1% (Welsh y cols., 1995). La variación en la frecuencia de mutaciones del gen CFTR en los diferentes grupos étnicos, ocasiona que en poblaciones con alto grado de mestizaje exista una gran diversidad de ellas, mientras que en

aquellas con poco mestizaje o de carácter endogámico predominan una o dos mutaciones (Zielenski y Tsui, 1995). Así por ejemplo, en poblaciones de Judíos Ashkenazi de Israel y en poblaciones de Caucásicos, al buscar dirigidamente un panel de cinco a nueve mutaciones en pacientes con FQ, se logran caracterizar el 96 y el 80% de alelos respectivamente (Welsh y cols., 1995)

Sin embargo, un estudio realizado en pacientes mexicanos (Orozco y cols., 2000), donde el análisis de 12 mutaciones reportadas entre las mas frecuentes, aunado a un análisis intensivo del gen CFTR mediante las técnicas de SSCP y heterodúplex múltiple, se encontró un total de 34 mutaciones diferentes con las cuales sólo se logró caracterizar el 74.58% de los cromosomas FQ, además de siete mutaciones nuevas nunca antes detectadas, que sugieren la presencia de mutaciones raras o aún no identificadas, lo que refleja la heterogeneidad genética de la población mexicana.

Estos antecedentes, podrían explicar la ausencia de las cuatro mutaciones más frecuentes descritas en el gen CFTR en la población mexicana: $\Delta F508$, G542X, N1303K y $\Delta I507$, en los 35 pacientes con esterilidad primaria analizados en este trabajo, así como la ausencia de la mutación R117H que también presenta una frecuencia muy baja (0.5%) aún en los pacientes con FQ (Orozco y cols., 2000). Los datos obtenidos sugieren que quizá las mutaciones en el gen CFTR asociadas a esta patología se localizan en otras regiones del gen o que su frecuencia sea muy baja, ya que según Scriver (1995), la incidencia de portadores estimada en la población mexicana es de 1:80 a 90 lo que nos coloca dentro de las frecuencias más bajas a nivel mundial (Scriber Ch., 1995).

Dado que la variante IVS8-5T del polimorfismo Tn es considerada actualmente como la mutación más común en pacientes con formas atípicas de la FQ, entre ellas anomalías del tracto reproductivo (Chillon cols., 1995; Zielenski cols., 1995), este análisis también incluyó la determinación de este polimorfismo en pacientes con esterilidad primaria, con FQ y una muestra control. Los datos encontrados en este estudios revelaron que esta variante alélica se encuentra en muy baja proporción en las tres poblaciones analizadas, ya que en los pacientes con esterilidad primaria se encontró en una proporción de 2.86%, en pacientes con FQ de 3.7%, y en 1.2% en la población control, ninguna de estas diferencias resultó ser estadísticamente significativa, siendo todos los valores menores a lo encontrado en otras poblaciones (5%) (Stuhrmann y Dörk, 2000). En poblaciones de Europa, en el caso de los individuos con CBAVD la proporción de 5T varía entre 12.9-26.0% y de un 14.7% en paciente azoospermicos, mientras que en los dos pacientes mexicanos con esta patología no se encontró esta variante alélica, sólo la presentó uno de los dos pacientes con CUAVD y en sólo uno de los demás pacientes (1.61%).

El análisis de la asociación entre el polimorfismo Tn y el genotipo de los pacientes con FQ, reveló que tanto los individuos homocigotos como los heterocigotos para la mutación $\Delta F508$ portaban

la variante 9T, estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura por lo tanto este resultado apoya la teoría de un origen común para esta mutación, ya que siempre se ha encontrado asociada a esta variante polimórfica. Así mismo, los 7 alelos G542X analizados en este estudio también presentaron una asociación del 100% con el polimorfismo 9T y los 5 alelos S549N con el polimorfismo 7T. En este grupo no se encontró la variante T5.

Por otro lado, el 84.0% de los 19 pacientes que no tenían caracterizado ninguno de los alelos presentaron la variante T7, el 5.2% el polimorfismo T9 y el 10.4% el alelo T5. Esto nos hace suponer que la mayoría de las mutaciones raras o poco frecuentes se encuentran asociadas principalmente al alelo T7, lo que sugiere que quizá sean las que se encuentren asociadas a los pacientes con esterilidad primaria, dado que fue la variante que se presentó con mayor frecuencia (90%).

Al analizar los datos asociando el genotipo con el fenotipo de los pacientes con esterilidad primaria, la variante 5T se encontró en dos alelos de pacientes afectados por alguna forma de varicocele y en un alelo de CUAVD. Todos los alelos de los pacientes azoospermicos idiopáticos estuvieron asociados al polimorfismo 7T igual que los pacientes FQ con ambos alelos no caracterizados, lo que indica de igual manera que pueden estar presentes mutaciones raras de muy baja frecuencia. Por último la variante 9T estuvo asociada en 5 alelos de pacientes con alguna forma de varicocele, en 3 alelos de individuos con hipotrofia testicular y en un alelo de un paciente con epididimitis unilateral y aunque esta variante esta asociada a mutaciones como $\Delta F508$ y G542X, estas no estaban presentes en los pacientes con esta variante polimórfica.

El análisis del polimorfismo Tn en 84 alelos de una población de individuos sanos reveló que el 98.8% (83 alelos) portaban el alelo 7T y uno tenía la variante 5T, por lo tanto, la presencia de un alelo 7T podría tomarse como un marcador de riesgo para la presencia de las mutaciones más frecuentes como la $\Delta F508$ y la G542X quienes se asociaron en un 100% con esta variante.

Aunque en este estudio no se detectó la presencia de las mutaciones más frecuentes a nivel mundial, en los pacientes con esterilidad primaria, no podemos descartar la presencia de alteraciones en otras regiones del gen CFTR, sobre todo tomando en cuenta que la mayoría de ellos son portadores del alelo T7, igual que los pacientes con FQ a los cuales no se les han caracterizado las mutaciones.

Al analizar las frecuencias del polimorfismo Tn en las tres poblaciones estudiadas se determinó que hay diferencias significativas entre los pacientes FQ y los controles normales ($X^2=32.19$; $P<0.001$) para la variante 9T, también en los pacientes con esterilidad primaria con los pacientes FQ ($X^2=16.7$; $P<0.001$), pero no hubo diferencia entre los pacientes con esterilidad primaria y los controles normales.

($X^2=3.8$, $P=0.0513$), esto nos indica que la variante alélica 9T en los pacientes con esterilidad primaria se comporta igual que la población normal

En el caso de 7T, al comparar pacientes con FQ y controles normales, si hay diferencia significativa ($X^2=8.83$; $P=0.003$), también entre pacientes FQ y pacientes con esterilidad primaria ($X^2=5.78$; $P=0.016$), pero no hubo diferencias al comparar pacientes FQ con controles normales ($X^2=0.08$; $P=0.775$). De igual manera que para 9T, en los pacientes con esterilidad primaria se presenta el polimorfismo 7T igual que en la población normal.

Por último, al comparar las frecuencias de 5T de las 3 poblaciones, ninguna presentó diferencias significativas, por lo tanto, estos datos sugieren que en la muestra de pacientes con esterilidad primaria analizada, esta variante no participa en la etiología de esta disfunción

Dado que un gran número de mutaciones en el gen CFTR son la causa molecular para una variedad de diferentes formas de esterilidad primaria, causada por azoospermia obstructiva en varones fluctuando de CBAVD y CUAVD, obstrucción contralateral de epididimo y ductos de eyaculación, así como otras malformaciones del tracto reproductivo, y dado que estos pacientes tienen la opción de procrear hijos mediante técnicas de inseminación artificial como son MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration) o ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), que eleva enormemente la probabilidad de tener hijos afectados con FQ, lo que hace necesario poder brindar un consejo genético adecuado a estos pacientes para disminuir o evitar la transmisión de genes deletéreos. Aunado a esto, es muy importante la difusión de este conocimiento entre las clínicas de reproducción asistida ya que en la mayoría de ellas se desconoce la alta incidencia de mutaciones en el gen CFTR en estos pacientes. Un dato pertinente de mencionar es, que en nuestro país apenas se está implementando este tipo de estudios en sólo dos laboratorios cuando somos 100 millones de mexicanos, mientras que en países como Alemania existen 40 laboratorios que ofrecen estos análisis para 20 millones de habitantes. Pero ¿quienes son los candidatos a someterse a este análisis? Sin duda deben ser los afectados por esterilidad primaria causada por CBAVD, CUAVD, BEDO, obstrucción epididimal bilateral, azoospermia obstructiva por reducción de cantidad y calidad espermática.

CONCLUSIONES

- El estudio de la variante IVS8-5T del polimorfismo Tn en los tres grupos analizados reveló una frecuencia muy baja, comparada con lo reportado en otras poblaciones (5%), lo cual puede explicarse por la heterogeneidad étnica de nuestra población.
- La asociación de un 100% encontrada entre las mutaciones más frecuentes ($\Delta F508$ y $G542X$) y las variantes 9T, sugiere que este alelo es un marcador de riesgo para la presencia de estas dos alteraciones.
- La elevada frecuencia (84%), del alelo 7T en los pacientes FQ con ambos alelos sin caracterizar, sugiere que esta variante está asociada con mutaciones raras o poco frecuentes y dado que en los pacientes con esterilidad primaria este alelo se determinó en el 90% de ellos, no se descarta la posibilidad de que estas alteraciones sean las responsables de esta identidad.
- La ausencia de las mutaciones más frecuentes a nivel mundial. $\Delta F508$, $G542X$, $N1303K$ y $\Delta I507$, así como la $R117H$, en los pacientes mexicanos con infertilidad primaria estudiados, sugiere que éstas probablemente se encuentran en una frecuencia mucho menor que en otras poblaciones, o que otras regiones del gen FQ u otros genes estén involucrados en la etiología de esta enfermedad en estos pacientes
- Existen diferencias significativas en las frecuencias determinadas para el polimorfismo 9T y 7T entre los pacientes FQ y los pacientes con esterilidad primaria, así como, entre pacientes FQ y población normal
- Los pacientes afectados por esterilidad primaria causada por CBAVD, CUAVD, BEDO, obstrucción epididimal bilateral, azoospermia obstructiva idiopática deben someterse a un estudio molecular y a un asesoramiento genético cuando decidan tener hijos mediante técnicas de reproducción asistida.

APÉNDICE

Reactivos:

Acrilamida/bisacrilamida 30%

- 29 g de acrilamida
- 1 g de bisacrilamida
- Aforar a 100 ml con H₂O

Agarosa 2% y 0.8%

- Aforar con TBE 1X

Bromuro de etidio

- 5mg/100ml

Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1

- 24 partes de cloroformo
- 1 parte de alcohol isoamílico

Enzimas utilizadas en la amplificación

Enzima	Concentración	Buffer 10X
DNA polimerasa gold	5U/ μ l	100mM Tris-HCl, pH 8.8,

100mM KCl 0.02%

Amplitaq DNA polimerasa 5U/ μ l 100mM Tris-HCl, pH 8.8,

100mM KCl 0.02%

Condiciones de restricción:

Enzima	Incubación	Buffer de reacción
MboI	37°C	NEBuffer 3 100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1mM dithiotreitol pH7.9
HphI	37°C	NEBuffer 4 50 mM acetato de potasio, 20 mM Tris acetato. 10 mM acetato de magnesio, 1mM dithiotreitol pH 7.9

Fenol saturado

- Disolver 300 ml de Fenol 100% a 68°C
- Poner una botella estéril de 500 ml:

200 ml de H₂O bidestilada estéril

2 ml de β-2mercaptoetanol puro

4 ml de tris-HCl 1 M, pH 8.0

292.5 μl de NaOH 1N

Combinar esta mezcla con los 300ml de fenol fundido, cubrir con papel aluminio la botella y dejar el fenol a 4°C toda la noche antes de usarlo.

Buffer de corrida.

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

Marcadores de pesos moleculares

DNA ladder.

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

λ /Hind III

La digestión del DNA del fago lambda con la enzima de restricción Hind III, produce 8 fragmentos que pueden ser utilizados como marcadores de pb para electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida. El tamaño de los fragmentos resultantes es. 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 y 23130

Preparación de geles de poliacrilamida.

	7.5%	10%	15%
TBE 5%	1.5 ml	2.0 ml	3.26 ml
Acry/bisacrilamida 30%	2.5 ml	3.06 ml	5.0 ml
H ₂ O	5.9 ml	4.83 ml	1.56 ml
AP 10%	81.5 μ l	100 μ l	163 μ l
TEMED	8.1 μ l	10 μ l	16.3 μ l
Vol. Final.	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml

Regulador para lisis de células rojas (RCLB)

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

GLOSARIO

Alelo. Formas alternativas de un mismo gen

Alineamiento. Unión de una cadena sencilla con su secuencia complementaria. Ej Un oligonucleótido o primer con su secuencia complementaria

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gen. Secuencia nucleotídica. Segmento de DNA involucrado en la producción de cadenas polipeptídicas. Incluye regiones río arriba y río debajo de la secuencia codificante, así como secuencia intervectoras (intrones) entre regiones codificantes (exones).

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

Heterocigoto compuesto. Paciente que presenta una mutación diferente en cada alelo

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

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

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

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

Loci. Plural de locus.

Locus. Localización física de un gen en un cromosoma.

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

Primer F. Primer que flanquea la secuencia complementaria al extremo 3' de la región a amplificar en la cadena sentido de la doble hélice de DNA.

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

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

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

Splicing. Procesamiento del transcrito primario de RNA o RNAhn para su maduración.

REFERENCIAS

- Anderson MR, Welsh MJ (1992) Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science*. 257:1701-1704
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 253: 202-20549
- Anguiano, A., Oates, R.D., Amos, J.a., Dean, M., Gerrard, B., Stewart, C., Maher, T.A., Whrtw, M.B., Milunsky, A. (1992) Congenital absence of the vas deferens - a primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA*. 267: 1794-1797
- Boat, T.F., Welsh, M J, & Beaudet, AL (1989) Cystic Fibrosis. In *The Metabolic basis of Inherited Disease* (eds Scriver, C.L.) 2649-2680 New York, McGraw-Hill.
- Carson MR, Travis SM, Welsh MJ (1995) The two nucleotide-binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 270: 1711-1717.
- Chang X, Hou Y, Jensen TJ, Riordan JR (1994) Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem*. 269:18572-18575.
- Cheng SH, Rich DP, Arshall J, Gregory RJ, Welsh MJ. (1991) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 66:1027-103669.
- Chillon, M., Casals, T., Mercier, B., Bassas, L., Lissens, W., Silber, S., Romey M-C. (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Eng J Med*. 332. 1475-1480.
- Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC. (1991) Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem*. 266 24471-24476
- Chu, C.S., Trapnell, B.C., Curristin, S.M., Cutting, G.R. y Crystal, R.G. (1992) Extensive posttranscriptional deletion of the coding sequences for part of nucleotide-binding fold 1 in respiratory epithelial mRNA transcripts of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is not associated with the clinical manifestations of cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 90, 785-790.
- Chu, C.S., Trapnell, B.C., Curristin, S.M., Cutting, G.R. y Crystal, R.G. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genet.* 3, 151-156.

- Chu, C.S., Trapnell, B.C., Murtagh, J.J. Jr, Moss, J., Dalemans, W., Jallat, S., Mercenier, A., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Cutting, G.R., Guggino, W.B. y Crystal, R.G (1991) Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 10, 1355-1363
- Collins FS. (1992) Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science*. 256:774-779
- Culard, J.F., Desgeorges, M., Costa, P., Laussel, M., Razakatzara, G., Navratil, H., Demaille, J. Y Claustres, M. (1994) Analysis of the whole CFTR coding regions and splice junctions in azoospermic men with congenital bilateral aplasia of epididymus or vas deferens. *Hum. Genet.* 93, 467-470.
- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. (1994) Population variations of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat.* 4: 167-17.
- Delaney, S J., Rich, D.P., Thomson, S.A., Hargrave, M.R., Lovelock, P.K., Welsh, M.J. y Wainwright, B.J (1993) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nature Genet.* 4, 426-431.
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*. 358: 761-764.
- di Sant' Agnese PA, Davis PB. (1979) Cystic fibrosis in adults: 72 cases and a review of 232 cases in the literature. *Am. J. Med.* 66:121
- di Sant' Agnese PA, Hubbard VS (1984) The gastrointestinal tract, in Taussing LM (ed): *Cystic Fibrosis*. New York, Thieme-Stratton, p 212.
- Dulhanty AM, Riordan JR (1994) Phosphorylation by cAMP-dependent protein Kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry*. 33:4072-4079.
- Egan M, Flotte T, Aione S, Solow R, Zeitlin PI. (1992) Defective regulation of outwardly rectifying CL-channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature*. 358: 581-584.
- Fulmer SB. (1995) Two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations have different effects on both pulmonary phenotype and regulation of outwardly rectified chloride currents. *Proc Na Acad Sci USA*. 92. 6832-6836.
- Gervais R, Dumur V, Letombe B, Larde A, Rigot JM, Roussel P, Lafitte JJ (1996) Hypofertility with thick cervical mucus: another mild form of cystic fibrosis? *JAMA*. 276:1638

- Hiestad DM, Sorcher EJ, Huang Z, Wang Y, Haley BE. (1994) Use of 2-N3ATP to identify the site of ATP interaction on nucleotide binding domain-2 from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator *Pediat Pulmonol suppl* 10:42
- Hughsmith EW, Burch LH, Ahou Z, Olsen JC, Boat TE, (1994) A novel mutations in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med*. 331: 947-980.
- Jarvi, K., Zielenski, J., Wilshanski, M., Durie, P., Buckspan, M., Tullis, E., Markiewicz, D., et al (1995) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet*. 345 1578.
- Kerem E, Kerem B (1996) Genotype-Phenotype correlation in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 22: 387-395
- Kiesewetter S, Macek MJ, Davis C, Curristin SM, Chu C. (1993) A mutation in CFTR produce different phenotypes depending on chromosomal background *Nature Genet*. 5: 274-277.
- Lissens W, Mercier B, Tournaye H, Bonduelle M, Ferec C, Seneca S, Devroey P, Silber S, Van-Steirteghem A, Liebaers I. (1996) Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Human Reproduc*. 11: 55-80.
- Mak V, Jarvi, K.A , Zielenski, J., Durie, P. y Tsui, L.C. (1997) Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens. *Hum. Mol. Genet*. 6, 2099-2107
- Maniatis, T, Sambrook, J. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. VII 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA pp 7 87.
- Mansoura MK, Strong TV, Collins FS, Dawson DC. (1994) A disease-related mutation in TM5 alter the conduction and gating properties of CFTR. *Pedia. Pulmonol suppl*. 10: 1.
- McDonough S, Davidson N, Lester HA, McCarty NA. (1994) Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block *Neuron*. 13.623-634
- Mercier, B., Lissens, W , Novelli, G., Kalajsjeva, L., de Arce, M. (1994) A cluster of cystic fibrosis mutations in exon 17b of the CFTR gene: a site for rare mutations *J. Med. Genet*. 31.731-34.
- Meschede D, Dworniczak B, Behre HM, Kliesch S, Claustres M, Nieschlag E, Horst J (1997) CFTR gene mutation in men with bilateral ejaculatory-duct obstruction and anomalies of seminal vesicles. *Am J Hum Genet*. 61:1200-1202.
- Mickle J, Milunsky A, Amos JA, Oates RD (1995) Congenital unilateral absence of the vas deferens. a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon etiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum Reprod*. 10:1728-1735.

- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillón M, Gimenez J (1993) Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Molec Genet*; 2: 1015-1022
- Oates RD, Amos JA. (1994) The genetic basis of congenital absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl*. 15: 1-8.
- Orozco L, Zielenski J, Markiewicz D, Villarreal T, Tsui L-C, Lezana JL, Del Angel RM. (1997) Two novel frameshift deletions (1924del7, 2055del9→A) in the CFTR gene in Mexican cystic fibrosis patients. *Hum Mutat*. 10:239-240
- Osborne, L.R., Lynch, M., Middleton, P.G., Alton, E.W., Geddes, D.M., Pryor, J.P., Hodson, M.E. y Santis, G.K. (1993) Nasal epithelial ion transport and genetic analysis of infertile men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum. Mol. Genet*. 2, 1605-1609.
- Patricio y Zielenski (1996) Congenital absence of the vas deferens a mild form of cystic fibrosis. *Mol Med Today*. 2: 24-31.
- Rave-Harel, N., Goshen, R., Madgar, I., Augarten, A., Nissim-Rafinia, M., Kerem, E. y Kerem, B (1995) Different levels of exon 9 skipping between testicular and respiratory cells may underline the different organ involvement in CF. *Pediatr. Pulm*. 20sp, 203
- Rich DP, Gregory RJ, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. (1993) Effect of deletions mutation on the function of CFTR chloride Channels *Receptor Channels*. 1: 221-232.
- Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun S. (1991) The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) superfamily *Adv Exp Med Biol*. 290: 19-29.
- Riordan JR, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene. cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245: 1066-1073.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping *Science*. 245: 1059-1066.
- Schellen, T.M.C.M. y van Straten, A. (1980) Autosomal recessive hereditary congenital aplasia of the vasa differentia in four siblings. *Fertil. Steril*. 34, 401-404.
- Sheppard DN. (1993) Mutations in CFTR associated with mild disease form Cl channels with altered pore properties. *Nature*. 362, 160-164.
- Sheppard N D, Ostedgaard S L. (1996) Understanding how cystic fibrosis mutations caused a loss of Cl channel function. *Mol Med Today*. 290-297
- Silber, S.J, Ord, T., Balmaceda, J., Patrizio, P. y Asch, R.H. (1990) Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm *N Engl. J. Med*. 323: 1788-1792.
- Strong. T.V., Wilkinson, D.J., Mansoura, M.K., Devor, D C., Henze, K., Yang, Y., Wilson, J.M., Cohn, J.A., Dawson, D.C., Frizzell, R.A. y Collins, F.S (1993) Expression of an abundant

- alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance *Hum. Mol. Genet* 2, 225-230.
- Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC. (1993) Multi-ion pore behavior in the CFTR chloride channel. *Nature*. 366:79-82.
- Teng H, Jorissen M, Van Poppel H, Legus E, Cassiman JJ, Cuppens H (1997) Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet*. 6:85-90.
- Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R (1985) Cystic Fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230: 1054-1057
- Ward CL, Omura S, Kopito RR. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway *Cell* 83: 121-127
- Welsh MJ, Smith EA (1993) Molecular Mechanism of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Cell* 73:1251-1254
- Welsh MJ, Tsui L, Boat FT, Beaudet AI (1995) Cystic fibrosis. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, ed. C Scriver, A Beaudet, W Sly, D Valle, 3 3799-3876. New York: McGraw-Hill Inc.
- Wilkinson DJ, Strong TV, Collins FS, Dawson DC. (1994) CFTR activation: stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Pediat Pulmon Suppl*. 10:3.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu CS, Daleman W, Pavirani A (1991) The cystic fibrosis gene has a "Housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cell of epithelial origin. *J Biol Chem*. 226: 9140-9144.
- Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznares I, Casals T, Larriba S, Mercier B, Cutting GR, Krebsova A, Macek M Jr, Langfelder-Schwind E, Marshall CB, DeCelle-Germana J, Claustres M, Palacio A, Bal J, Nowakowska A, Ferec C, Estivill X, Durie P, Tsui LC. (1999) Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 22:2, 128-9.
- Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z. (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 10: 214-228
- Zielenski J. (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 67:2, 117-33.
- Zielenski, J. & Tsui, L-C. (1995) Cystic fibrosis genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genetics*, 29: 777-807.

Zielenski, J. Patrizio, P., Corey, M., Handelin, B , Markiewicz, D., Asch, R. y Tsui, L.C. (1995) CFTR gene variant for patients with congenital absence of vas deferens. *Am. J. Hum. Genet*, 57. 958-960.