



3. Materiales y Métodos

El análisis de haplotipos se realizó mediante la caracterización de variaciones alélicas reportadas con anterioridad. En total de analizaron cinco marcadores polimórficos: tres RFLP's, en el intron E, el exon 5 y el exon 8; un STR en el intron B y una mutación puntual en el intron A caracterizada por análisis heteroduplex. (Martincic, 1998; Butler, 1990; Bodfish, 1991; Peretz, 1997).

3.1 Muestras de DNA

Las muestras de DNA de la familia mexicana, fueron obtenidas previamente a partir de sangre venosa en tubos con EDTA. El método de extracción consistió en la purificación de núcleos solubilizando las membranas plasmáticas por medio de Triton X 100, siguiendo con una lisis de los núcleos purificados con detergentes como SDS y la digestión de las proteínas con proteínasa K. Por medio de solventes orgánicos como el fenol y el cloroformo se purificó el DNA para la posterior precipitación con etanol. (Juárez, 2000; Buffone 1985)

De la familia portuguesa se contó con muestras de ADN de los sujetos II:1 y II:4 proporcionadas por el grupo de investigación que realizó el estudio en dicha familia. También se contó con una muestra de ADN de un control para el intron B con un genotipo heterocigoto 9 /11. (Ventura; et. al., 2000)



3.2 Solución para geles de MDE

La solución para elaborar los geles de MDE (Mutation Detection Enhancement) fueron elaborados por Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Maine, USA.

3.3 Amplificación por PCR

La amplificación se realizó haciendo una mezcla para PCR con buffer de PCR 10X con una concentración de magnesio de 1.5 μ M, 0.2mM de dNTP's y 2U de DNA polimerasa para un volumen final de 50 μ L. En el caso del intron B, la mezcla de reacción también se preparó con DMSO a una concentración de 10% y con TMAC 0.1mM.

El proceso se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Cada uno de los fragmentos se amplificó por separado a diferentes condiciones de temperatura y número de ciclos, dichas condiciones así como los primers utilizados y el tamaño de fragmento obtenido se presentan en la tabla 2.

Región	Primers 5' → 3'	Temperatura de Hibridación	Número de Ciclos	Largo de productos (pb).
Intron A	AGCTGTAAGAGTTGAATGCC CACATGTGTGGAGATTGCAG	55°C	35	333
Intron B	TCACCCAAGTAGTGAACACAG GGTTGTTTCCACCTGTAATCC	55°C	30	357
Intron E	TTGACTTGTAAGGCTTATCTT CCTGGGTTCAAGCGATTCTC	56°C	40	353
Exon 5	CCCCTAGAATCTGGAAGGTA CGATTCTGTTTTTCATCGAC	55°C	35	253
Exon 8	ACTTTACTTTCTCTAGGTGCTGT CACTCTCAGCCAGAATGCAGA	55°C	35	263

Tabla 2. Iniciadores y condiciones de amplificación para cada fragmento. Peso molecular de los productos esperados. (Butler, 1990; Bodfish, 1991; Juárez, 2000; Martincic, 1998; Peretz, 1997)



3.4 RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

El análisis de restricción tiene su fundamento en la especificidad con la que enzimas de restricción cortan un sitio determinado. La detección de la variación puede darse de dos maneras: por creación o eliminación de un sitio de restricción ocasionado por una mutación puntual ó por alteración de la longitud de un fragmento de restricción dado debido a la presencia de inserciones o deleciones.

En el presente estudio, se analizaron tres fragmentos por este método: el intron E, el exon 5 y el exon 8. Se preparó la mezcla para un volumen final de 20 μ L adicionando 1 μ L de la enzima correspondiente y se incubaron por dos horas a 37°C. En algunos casos, se incubó toda la noche para descartar posibles digestiones parciales. La determinación de los tamaños de los diferentes fragmentos, se realizó por comparación con el marcador de peso molecular PUC18 + *HpaII*.

3.5 Análisis Heteroduplex

La prueba de heteroduplex es una buena herramienta para detectar pequeñas variaciones en las secuencias de ADN. Este método se basa en las propiedades físicas de la molécula debido a la formación de burbujas que se generan por bases que no encuentran su par homólogo, formando un heteroduplex, mientras que las cadenas homólogas formarán un homoduplex, detectando con esto cadenas mutantes o de tipo silvestre.

Se denomina heteroduplex a un fragmento de ADN en el cual una base no encuentra su homología produciendo una estructura diferente que la del homoduplex (figura 6).

En una electroforesis los heteroduplex migrarán mucho más lento que los homoduplex, haciendo posible de esta manera la detección de una variación. Para una



muestra heterocigota, se formarán dos heteroduplex diferentes de las cadenas complementarias. Si una muestra no es heterocigota, entonces se puede mezclar con una muestra homocigota silvestre para que se formen los heteroduplex. Este método puede analizar fragmentos desde 193 hasta 1500 pb (Cotton, R.G, 1997).

Para este análisis se tomaron 20 μL del producto de amplificación correspondiente, se adicionó 1 μL de 0.5 M de EDTA pH 8.8, esta mezcla se llevó a una temperatura de 94°C durante un minuto tras el cual se bajó la temperatura gradualmente hasta llegar a 35°C durante media hora.

Este procedimiento provoca que las cadenas de ADN se separen y se vuelvan a unir. De haber variaciones, las cadenas sencillas pueden unirse con su cadena complementaria, o con una cadena no complementaria. Al unirse con una no complementaria, forman una especie de burbuja en el sitio en el que no se complementan, estas cadenas no complementarias migran a diferente velocidad que las cadenas complementarias.

La electroforesis para la detección de mutaciones por este método, se realiza en geles de MDE (Aumento de la Detección de Mutaciones por sus siglas en inglés), el cual es una mezcla de poliacrilamida y derivados de la misma que contienen un gran número de grupos éter, carbonilo y amidas, los cuales provocan la formación de puentes de hidrógeno con las bases que no sean complementarias entre sí, provocando que los segmentos que formen un heteroduplex migren más lento que los homoduplex.

Para observar las diferencias en la velocidad de migración, se toman 5 μL de la reacción y se les agrega 2 μL de colorante (azul de bromofenol y cianol de xileno). Posteriormente se realiza una electroforesis en un gel de MDE al 1X en un buffer de TBE



1X a 120 Volts. Las bandas se visualizan tiñéndolas con bromuro de etidio observándolas en un transiluminador de luz ultravioleta.



Figura 6. Esquema del mecanismo de formación de heteroduplex, el cual se basa en la formación de burbujas entre cadenas no complementarias.

3.6 Análisis de STR's

Los STR's (Short Tandem Repeats), son fragmentos de ADN generalmente de 2 a 5 pb que se repiten simultáneamente uniéndose cabeza con cola. Son regiones de alta variabilidad en el número de repeticiones. Los diferentes alelos se detectan por las diferencias en la velocidad de migración que presentan los fragmentos con variación en el número de repeticiones.

Para su detección en este estudio; tras la amplificación, se digirió el fragmento con las enzimas *HhaI* y *MnII* para acortar el sitio que contiene la serie de repeticiones y así mejorar la resolución. Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de acrilamida-bis-acrilamida al 6% de 16 cm de ancho por 20 cm de altura en un buffer de TBE al 0.5X a 100 Volts.