



## **4. Resultados**

Se realizó la determinación de marcadores polimórficos en cinco sitios de variación reportados (Martincic, 1998; Butler, 1990; Bodfish, 1991; Peretz, 1997). Solo algunos de los análisis se realizaron con todas las muestras de ADN disponibles. En algunos casos se analizaron a miembros de la familia claves y a partir de los resultados obtenidos se infirió el genotipo de los otros miembros. Las muestras de ADN de la familia portuguesa sólo se utilizaron en cuatro de las cinco determinaciones, en dos de ellas como control, ya que como se mencionó con anterioridad, su genotipo para algunos de los marcadores ya estaba reportado (Ventura et. al., 2000).

### **4.1 Transversión AC en intron A**

Este polimorfismo fue reportado por primera vez por Peretz y colaboradores en 1997. Es un cambio de C por T en el codón 231 del intron A (Peretz, 1997). Se considera alelo 1 el que contiene la citosina y alelo 2 en el que se encuentra presente la timina.

La determinación del genotipo de la familia mexicana se realizó por medio de análisis heteroduplex de los productos de amplificación de 333 pb obtenidos por PCR.

Primero se realizó heteroduplex en 15 muestras de ADN de individuos no relacionados con ninguna de las familias en estudio ni entre sí. De esta prueba se determinó que de los 15 individuos 14 tienen un genotipo homocigoto (Figura 7). El control número 15 es heterocigoto y se utilizó como control heteroduplex en estudios subsecuentes.

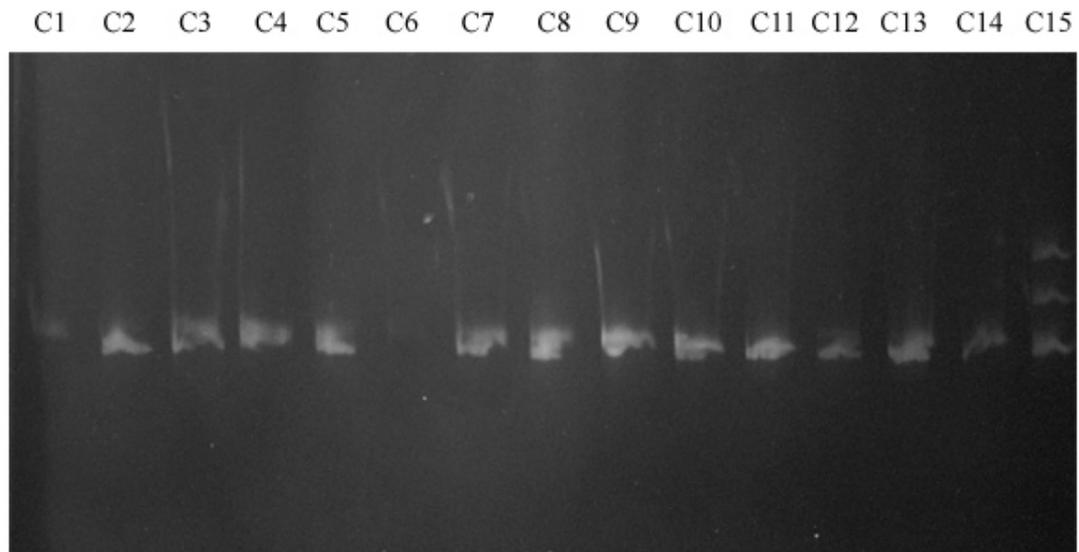


Figura 7. Análisis de heteroduplex del intron A de los controles 1 a 15 en un gel de MDE al 1X. C: control. Se observa la formación de heteroduplex en el control 15.

Posteriormente, se realizó el análisis en los padres de la familia mexicana con la finalidad de determinar si son homocigotos o heterocigotos. Ambos resultaron ser homocigotos al no presentar formación de heteroduplex como se muestra en la figura 8.

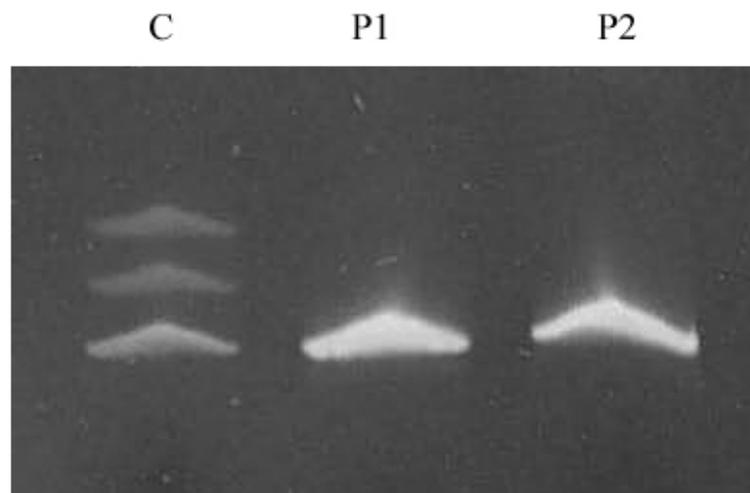


Figura 8. Análisis de heteroduplex del intron A en un gel de MDE al 1X. C: control, P1: propósito 1 (padre), P2: propósito 2 (madre). Se observa la formación de heteroduplex en la muestra control y la ausencia del mismo en las muestras P1 y P2.

Tras el análisis heteroduplex de los padres se hicieron mezclas de los productos de amplificación de los 14 controles que resultaron homocigotos. Se mezcló el control 1 con el 2, el 2 con el 3 y así sucesivamente. La mezcla del control 10 con el control 11 presentó formación de heteroduplex como se observa en la figura 9B, lo que significa que el control 10 y el control 11 son homocigotos para alelos diferentes entre sí.

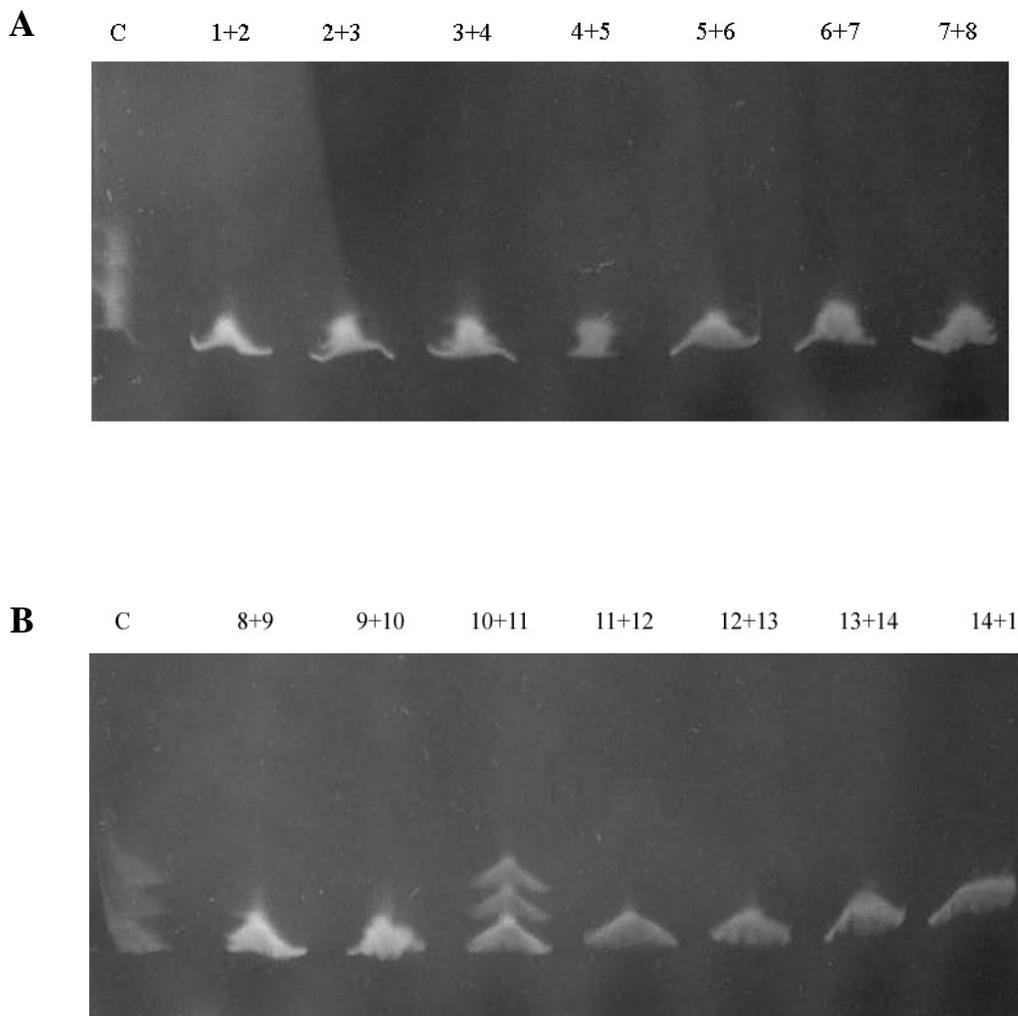


Figura 9. Análisis de heteroduplex del intron A en un gel de MDE al 1X. C: control,  $N_1+N_2$  corresponde al control respectivo  $N_1$  mezclado con el control respectivo  $N_2$ . Se observa la formación de heteroduplex en las muestras control y en la mezcla entre el control 10 y el 11 en la figura B.

Para realizar la caracterización de los alelos correspondientes para los controles 10 y 11, se realizó un análisis heteroduplex mezclando los productos de amplificación de dichos controles con el producto de amplificación del individuo II:4 de la familia portuguesa, homocigoto para el alelo 1. Se observó la formación de heteroduplex en la mezcla con el control 11 (figura 10), lo que quiere decir que este último es homocigoto para el alelo 2, mientras que el control 10 es homocigoto para el alelo 1, al igual que el propósito II:4.

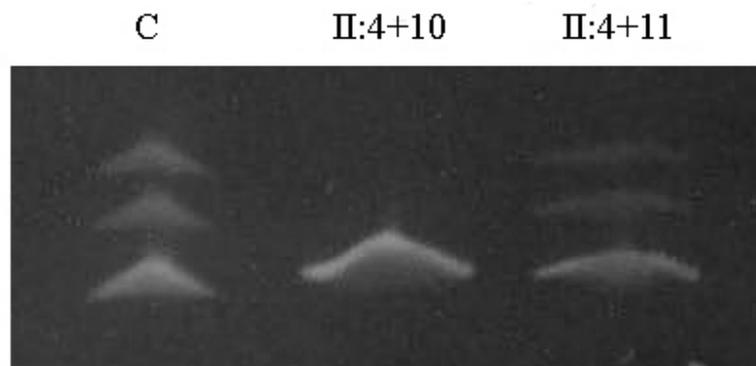


Figura 10. Análisis de heteroduplex del intron A en un gel de MDE al 1X. C: control, II:4+10 y II:4+11 corresponden a la mezcla entre el propósito II:4 y los controles 10 y 11 respectivamente. Se observa la formación de heteroduplex en la muestra control y en la mezcla II:4+11, lo que significa que el control 10 presenta el mismo genotipo que el individuo II:4.

Ya determinado el alelo de los controles 10 y 11, se procedió a realizar un análisis heteroduplex entre dichos controles y los padres de la familia mexicana para determinar el genotipo de los mismos. Se encontró que al igual que el propósito II:4, ambos padres presentaron formación de heteroduplex con el control 11 y no con el control 10 (figura 11), lo que significa que son homocigotos para el alelo 1, el cual es el alelo relacionado con la mutación K518N en la familia portuguesa.

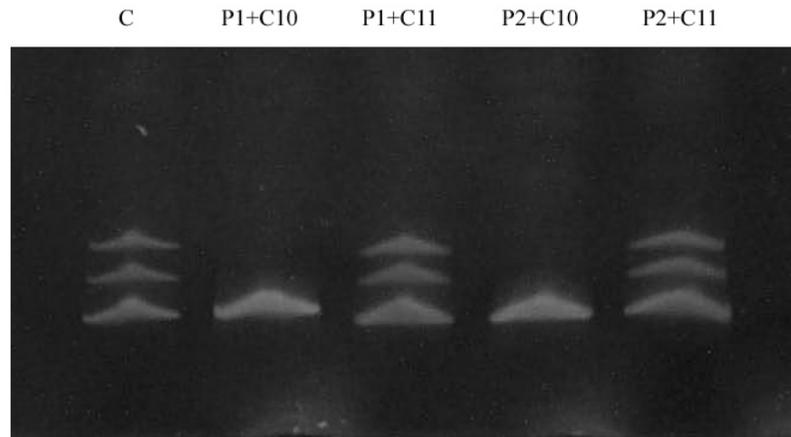


Figura 11. Análisis de heteroduplex del intron A en un gel de MDE al 1X. C: control, P1+C10, P2+C11, P2+C10 y P2+C11 corresponden a la mezcla entre los propósitos 1 (padre) y 2 (madre) y los controles 10 y 11 respectivamente. Se observa la formación de heteroduplex en la muestra control y en las mezclas P1+C11 y P2+C11, lo que significa que ambos padres presentan el mismo genotipo que el individuo II:4, el cual es el relacionado con la mutación K518N en la familia portuguesa.

## 4.2 Repeticiones de Dinucleótidos CA<sub>8-13</sub> en Intron B

Este polimorfismo fue descrito en 1991 por Bodfish y colaboradores. Es una serie de repeticiones de dinucleótidos CA con variaciones de entre 8 y 13 repeticiones. Originalmente, se reportaron dos alelos de 9 y 11 repeticiones con una frecuencia de 53 y 47% respectivamente (Bodfish, 1991). Posteriormente, se encontraron dos alelos más de 8 y 10 repeticiones cuya frecuencia no ha sido determinada (Peretz, 1997).

La caracterización se realizó por medio de la amplificación de un fragmento de 357 pb del intron B en el que se encontraban contenidas las repeticiones. Posteriormente, se realizó una digestión con las enzimas *MnlI* y *HhaI* con el objetivo de flanquear la región de repeticiones en un fragmento menor que se observara con mayor facilidad en un gel de electroforesis. Tras la digestión, el fragmento mencionado resultó de 77 pb, se obtuvieron otros fragmentos de 32, 40, 44, 101, 25, 7, 6 y 25 pares de bases.



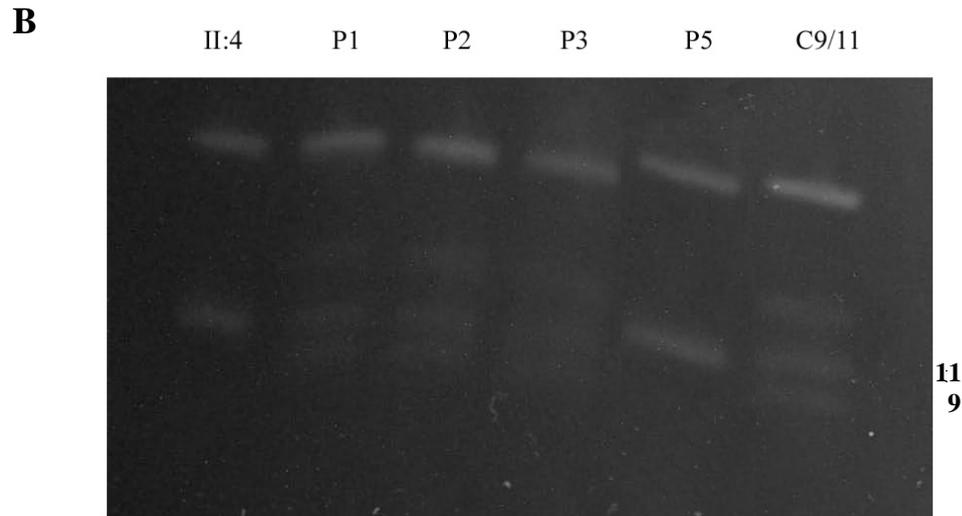


Figura 12. Análisis de STR's en el intron B. P: propósito, C: control. Se muestra la altura de migración de los alelos 11 y 9 en cada una de las figuras. Se observa que los propósitos 1, 2 y 3 presentan un genotipo heterocigoto 11/9, mientras que el propósito 5 muestra un genotipo homocigoto para el alelo 11, alelo relacionado con la mutación K518N en la familia portuguesa.

### 4.3 RFLP en Intron E

Este polimorfismo fue descrito por Butler y colaboradores en 1990, consta de dos alelos. Se trata de una inserción de 10 pares de base que se identifican mediante digestión con la enzima *HhaI*, que produce bandas de 150 (alelo 1) o 140pb (alelo 2) (Butler, 1990).

En este caso, el diseño de los primers para el intron E provocaba que tras la digestión con *HhaI*, quedara una banda de 150 pb que no era la correspondiente al alelo, por lo que fue necesario hacer otra digestión con la enzima *AluI* para degradar dicho fragmento y así evitar que interfiriera con la determinación.

La caracterización se realizó en los cinco miembros de la familia mexicana, se observó que los propósitos 1, 2, 3 y 4; son heterocigotos. Mientras que el propósito 5, es



homocigoto para el alelo 2, el cual es el relacionado con la mutación K518N en la familia portuguesa (figura 13).

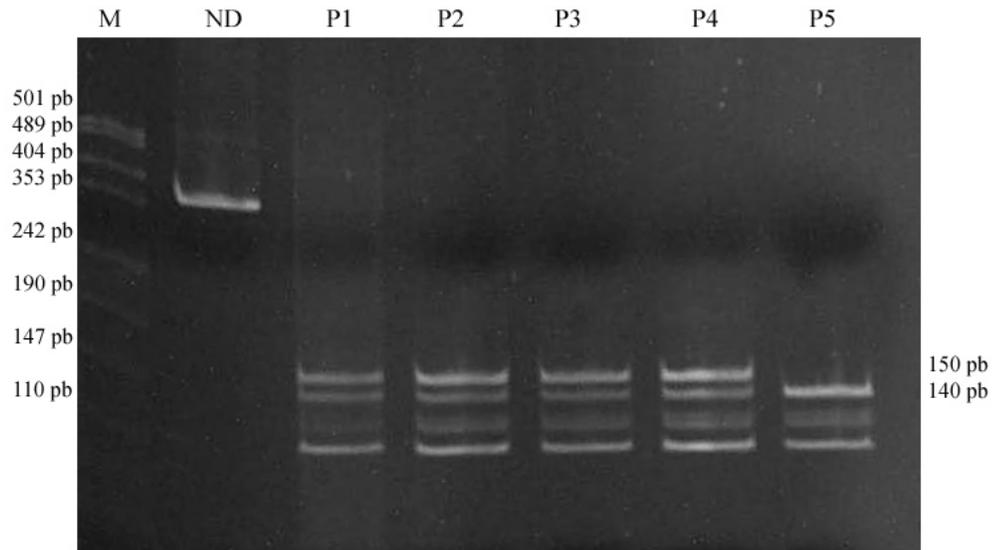


Figura 13. Digestión del Intron E con HhaI y AluI. M: marcador de peso molecular, se indica el tamaño en pares de bases (pb) de las bandas del marcador, ND: producto de amplificación no digerido, P: propósito. Se indica el tamaño en pares de bases de las bandas de 150 y 140 pb correspondientes a los dos diferentes alelos. Se observa la presencia de ambas bandas en los propósitos 1 a 4 y la presencia única de la banda de 140pb en el propósito 5.

#### 4.4 RFLP en Exon 5

Este polimorfismo, se basa en la eliminación del sitio de restricción para la enzima *BsaHI* que produce el cambio de C del alelo 1 a T del alelo 2. La digestión del producto de amplificación con la enzima mencionada, produce fragmentos de 149 y 104pb cuando se encuentra presente el alelo 1 y no corta al alelo 2.

En este caso, la digestión se realizó con la enzima *AcyI*, isosquisómero de *BsaHI*; y la determinación se realizó en los cinco miembros de la familia mexicana así como en los miembros II:1 y II:4 de la familia portuguesa, de los cuales se contó con muestras de ADN.



La digestión se llevó a cabo durante toda la noche para evitar la posibilidad de una digestión parcial. Se puede observar que todos los miembros de la familia mexicana, así como el individuo II:1 de la portuguesa, son homocigotos para el alelo 1; mientras que el individuo II:4 presenta un genotipo heterocigoto (figura 14).

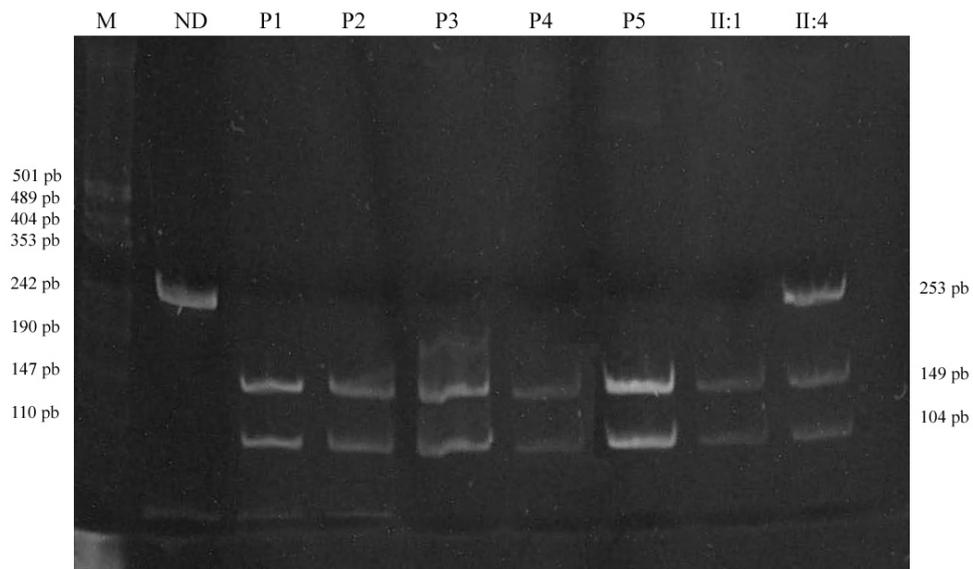


Figura 14. Digestión del Exon 5 con *AcyI*. M: marcador de peso molecular, se indica el tamaño en pares de bases (pb) de las bandas del marcador, ND: producto de amplificación no digerido, P: propósito. Se indica el tamaño en pares de bases de las bandas de 149 y 104 pb correspondientes al alelo 1 y la de 253 pb que corresponde al alelo 2. Se observa la presencia del alelo 1 en los propósitos 1 a 5 y el II:1 y la presencia de los dos alelos en el individuo II:4.



#### 4.5 RFLP en exon 8

Este polimorfismo, se detecta por la creación del sitio de restricción para la enzima *HhaI* que produce el cambio de A del alelo 1 a G del alelo 2. La digestión del producto de amplificación produce fragmentos de 129 y 96 pb en presencia del alelo 2 y no actúa sobre el alelo 1.

La caracterización se realizó, al igual que en el exon 5, en los cinco miembros de la familia mexicana y en los miembros II:1 y II:4 de la familia portuguesa. La digestión se llevó a cabo durante toda la noche para evitar la posibilidad de una digestión parcial. Tras la electroforesis y tinción, se observa que los 5 miembros de la familia mexicana, así como el individuo II:1 de la portuguesa, son homocigotos para el alelo 2. Por su parte, el individuo II:4 presenta un genotipo heterocigoto (figura 15).

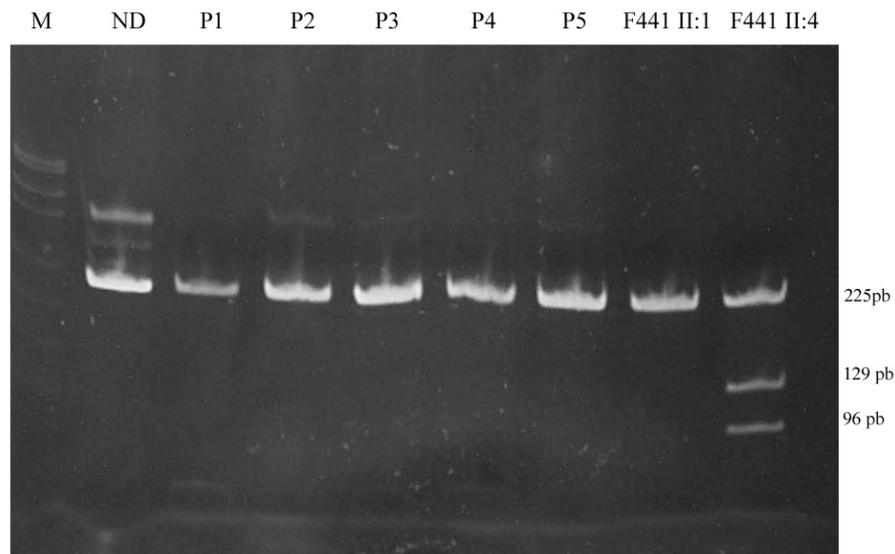


Figura 15. Digestión del producto de amplificación del exon 8 con *HhaI*. M: marcador de peso molecular, se indica el tamaño en pares de bases (pb) de las bandas del marcador, ND: producto de amplificación no digerido, P: propósito. Se indica el tamaño en pares de bases de las bandas de 129 y 96 pb correspondientes al alelo 2 y la de 225 pb que corresponde al alelo 1. Se observa la presencia del alelo 1 en los propósitos 1 a 5 y el II:1 y la presencia de los dos alelos en el individuo II:4.