

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Optimización de la amplificación de doce exones del gen  
*distrofina* asociados a distrofias musculares mediante PCR  
múltiplex.

Marco David García King

Guatemala

2007



Optimización de la amplificación de doce exones del gen *distrofina* asociados a distrofias musculares mediante PCR múltiplex.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

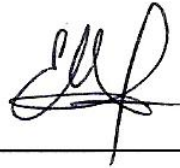
Optimización de la amplificación de doce exones del gen *distrofina* asociados a distrofias musculares mediante PCR múltiplex.

Trabajo de investigación presentado por Marco David García King para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2007

**Vo.Bo. Asesor Principal**



---

**Lda. Elena Dardón**

**Tribunal**



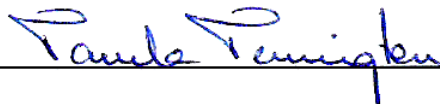
---

**Lda. Elena Dardón**



---

**Dr. Gabriel Silva Arévalo**



---

**Dra. Pamela Pennington**

**Fecha de aprobación:**

Guatemala 5 de diciembre de 2007

## PREFACIO

La idea de esta investigación nació como parte del proyecto “Detección de deleciones exonales asociadas a las distrofias musculares de Duchenne y de Becker en Guatemala, mediante la reacción en cadena de la polimerasa en múltiplex”, el cual es auspiciado por FODECYT, las Obras Sociales del Santo Hermano Pedro y la Fundación Aldo Castañeda y está a cargo del Dr. Gabriel de Jesús Silva Arévalo. Como la primera etapa de la realización de este proyecto surgió la necesidad de estandarizar el método para la amplificación de exones del gen *distrofina* mediante reacciones de PCR múltiplex, y a partir de ahí realizar la detección de deleciones en estos exones.

Así surgió el apoyo para la realización de este trabajo, el cual se pudo llevar a cabo gracias a la colaboración de muchas personas. Primeramente agradezco a Dios y a la virgen María por acompañarme fielmente en cada etapa de mi vida y haberme sostenido en los buenos y malos momentos. Agradezco a mis padres por su gran dedicación hacia sus hijos, su amor y sus buenas enseñanzas y ejemplos. A mis hermanas y demás familia por siempre estar apoyándome a lo largo de cualquier empresa iniciada.

Agradezco a mis asesores, el Dr. Gabriel Silva y la Lda. Elena Dardón por darme la oportunidad de realizar este estudio, por su colaboración a lo largo del proceso de investigación, sus correcciones y sus valiosas enseñanzas; al Dr. Alberto García y la señora Norma del laboratorio de biología molecular de la Universidad de San Carlos por su colaboración para poder completar los análisis de mi estudio. Agradezco al Dr. Héctor Aguilar y la Dra. Pamela Pennington por su apoyo y colaboración durante toda mi carrera.

Finalmente agradezco a mis amigos y compañeros de trabajo por su invaluable ayuda y enseñanzas en el laboratorio y en la vida, y a todos los que contribuyeron a la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	xi
RESUMEN	xii

## Capítulos

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	2
	A. Distrofias musculares de Duchenne y Becker	2
	B. Fisiología del músculo	3
	C. Gen <i>distrofina</i>	7
	D. Diagnósticos utilizados	10
	1. Clínicos	10
	2. Laboratorio clínico	11
	3. Inmunohistoquímicos	13
	4. Moleculares	14
	E. Distrofias musculares de Duchenne y Becker en Guatemala	16
	F. Tratamientos	17
III.	JUSTIFICACIÓN	20
IV.	OBJETIVOS	21
	A. Objetivo general	21
	B. Objetivos específicos	21
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
	A. Recolección de muestras	22
	B. Extracción de ADN	22
	C. Cuantificación de ADN	23

D.	Estandarización de la PCR	23
E.	Visualización de productos de amplificación	25
VI.	DISEÑO EXPERIMENTAL	26
A.	Unidad experimental	26
B.	Tamaño de muestra	26
C.	Análisis estadístico	26
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
A.	Extracción y cuantificación de ADN	27
B.	PCR heptuplex, cuadruplex y quintuplex	30
C.	PCR duplex y triplex	32
D.	Efecto de componentes en la mezcla de reacción	33
1.	Cloruro de magnesio y polimerasa	33
2.	Cebadores y dNTPs	34
3.	Volumen de reacción, plantilla de ADN y solución amortiguadora	35
E.	Efecto de los componentes del programa de amplificación	36
1.	Temperatura de hibridización	36
2.	Duración de cada etapa del programa de amplificación	36
3.	Termocicladores	37
F.	Electroforesis y tinción de geles	37
G.	Otras consideraciones	39
H.	Amplificación de muestras de individuos con síntomas y sus familiares	39
VIII.	CONCLUSIONES	42
IX.	RECOMENDACIONES	44
X.	BIBLIOGRAFÍA	45



## LISTA DE CUADROS

1. Características de los pacientes con DMD y DMB	3
2. Rendimiento y pureza de extracciones de 12 trabajadas, mediante los dos métodos utilizados	28
3. Reactivos utilizados para la extracción de ADN por el método salino no enzimático	52
4. Preparación de soluciones amortiguadoras utilizadas en extracción salina no enzimática	53
5. Secuencia de cebadores a utilizar con cada exón, temperatura de hibridización ( $T_m$ ) de cada uno y tamaño del amplicon a obtener por PCR	56
6. Combinación de exones en reacciones de PCR heptuplex y quintuplex	57
7. Resultados de cuantificación de ADN por Biophotometer y otras mediciones realizadas de efectividad de extracción	59
8. Resultados obtenidos para prueba t para dos medias independientes suponiendo varianzas iguales	61
9. Comparación del precio por cada reactivo utilizado en los dos métodos de extracción	62
10. Concentración de reactivos en la mezcla de PCR	64
11. Programas de termociclador	64

## LISTA DE GRÁFICOS

1. Representación diagramática de una sección de fibra muscular	4
2. Regeneración de las células musculares	5
3. Complejo de distrofina glicoproteína	7
4. Gen <i>distrofina</i>	9
5. Representación esquemática del gen <i>distrofina</i>	10
6. Signo de Gower	11
7. Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
8. Medicamentos con potencial de interrumpir la cascada fisiopatológica de DMD	18
9. Amplificación de diferentes extracciones de ADN	29
10. Amplificación de 11 exones mediante PCR heptuplex y cuadruplex	31
11. Amplificación de exones mediante reacción de PCR triplex y duplex	32
12. Procedimiento kit comercial	51
13. Procedimiento método salino no enzimático	54
14. Diagrama de flujo para la utilización del Biophotometer®	55
15. PCR heptuplex y quintuplex	57
16. PCR triplex	58
17. Ecuaciones utilizadas para determinar la cantidad de ADN extraído	59
18. Rendimiento de extracción	60
19. Pureza de extracción	60
20. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ y <i>Taq</i> polimerasa en los resultados de amplificación	65
21. Efecto de la concentración de cebadores en la amplificación	66
22. Efecto de la cantidad de plantilla de ADN	66
23. Efecto de la temperatura de hibridización	67
24. Efecto del número de ciclos	67

25. Efecto del termociclador	68
26. Efecto de la polimerización de agarosa	69
27. Efecto del tiempo, voltaje, y volumen de muestra	69
28. Efecto del tiempo de lavado	70
29. Amplificación de muestras de individuos con síntomas y sus familiares femeninos	71

## RESUMEN

Las Distrofias Musculares de Duchenne y de Becker son desórdenes hereditarios ligados al cromosoma X. Su incidencia a nivel mundial es de 1 cada 3,500 y 30,000 varones nacidos vivos respectivamente. Dos de tres partes de personas con la enfermedad se deben a deleciones en el gen de la proteína *distrofina* heredadas por la madre. Actualmente en Guatemala no se cuenta con información acerca de la incidencia, ya que su diagnóstico es netamente clínico.

Este estudio tenía como objetivo la optimización de un método para la detección de 12 exones del gen *distrofina*, relacionados con la distrofia muscular de Duchenne o de Becker, mediante PCR múltiplex. Estos exones corresponden a áreas con altas tasas de mutación. Se estandarizó la amplificación de 11 exones mediante reacciones de PCR heptuplex y cuadruplex, así como 3 reacciones de PCR triplex y una duplex. El exón 3 fue posible amplificarlo únicamente de forma individual.

Asimismo se evaluaron factores que pueden afectar la detección de deleciones mediante estas reacciones, a lo largo de todo el proceso. Se evaluaron dos métodos de extracción, con base a rendimiento, pureza, eficiencia, tiempo y precio de cada uno; se determinó que ambos son eficientes para la utilización en esta metodología. Se evaluaron aspectos de la mezcla y programa de cada reacción y la observación de resultados mediante la electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio.

Con el método estandarizado se realizó la amplificación de muestras de 4 individuos que presentaban síntomas de una de las enfermedades y 6 familiares femeninos de los mismos, para un total de 10 muestras. No se detectaron deleciones en 11 de los 12 exones. Se detectaron deleciones del exón 3 en 2 muestras, una de individuo con síntomas y otra de familiar femenino. Se recomienda la implementación del exón 3 en las reacciones multiplex para su confirmación. A partir de este trabajo se recomienda continuar con el estudio de estas enfermedades en Guatemala.

# I. INTRODUCCIÓN

Las Distrofias Musculares (DM) son un grupo de enfermedades genéticas que afectan especialmente a los músculos involucrados en la locomoción. Entre este grupo se encuentran la DM de Duchenne (DMD) y la DM de Becker (DMB), que son desórdenes hereditarios monogénicos ligados al cromosoma X. A nivel mundial, la incidencia de DMD es de 1 caso por cada 3,500 varones nacidos vivos y de 1 por cada 30,000 para DMB. Las mujeres no presentan síntomas pero pueden ser portadoras de la alteración genética.

Los síntomas inician en la infancia y provocan una muerte prematura. En el caso de DMD, la muerte se produce durante la tercera década de vida, mientras que en la DMB, menos severa, el individuo puede llegar a vivir hasta 50 años. En dos terceras partes de los afectados, la enfermedad se debe a factores hereditarios que resultan en la alteración del gen que codifica para la proteína *distrofina*, por medio de una delección en sus exones. En el caso de la DMD, este defecto inhibe completamente la producción de la *distrofina*, mientras que en la DMB, la alteración tiene como consecuencia la producción de una proteína anormal.

En Guatemala, el diagnóstico de DMD y DMB se realiza únicamente de forma clínica, debido a la ausencia de laboratorios con tecnología para el estudio del ADN, el cual proporciona resultados más específicos.

Este estudio busca optimizar un método para la detección de 12 exones del gen *distrofina* mediante PCR múltiple, partiendo de ADN de individuos sanos. Se espera que una vez estandarizada esta técnica, pueda aplicarse en la detección de delecciones exonales en individuos diagnosticados clínicamente con DMD y DMB y sus familiares femeninas.

## II. ANTECEDENTES

### A. Distrofias musculares de Duchenne y Becker

Las distrofias musculares corresponden a un grupo de desórdenes no inflamatorios, pero progresivos, que tienden a afectar los músculos con una degeneración fibrosa definitiva, pero sin evidencia de aberraciones morfológicas. Éstas no presentan anormalidades del sistema nervioso central o periférico (Do, 2007).

Dentro de este grupo de distrofias musculares se encuentran las distrofias musculares de Duchenne y de Becker (Dunant 2003; Silva *et al* 2004). Éstas son desórdenes hereditarios monogénicos recesivos ligados al cromosoma X, por lo que los afectados son principalmente varones (Sancho *et al*, 2006).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la más común, afectando a uno de cada 3,500 varones nacidos vivos y se caracteriza por una degeneración y debilidad muscular progresiva que causa la muerte hacia finales de la segunda década de vida. De estos casos, dos terceras partes se deben a factores hereditarios y el resto a mutaciones espontáneas (Bestard, 2000; Silva *et al* 2004; Singh *et al* 2006; Rodríguez *et al* 1996; Sancho *et al* 2006). Después de Duchenne, la distrofia muscular de Becker (DMB) es la segunda forma más común, con una incidencia de un caso por cada 30,000 varones nacidos vivos. En conjunto, la DMD y la DMB comprenden más del 40% del total de las distrofias musculares (Do, 2007; Sancho *et al*, 2006).

En pacientes con alguna de estas distrofias no se puede identificar ninguna anormalidad al nacer, a menos que por su trasfondo hereditario haya sospecha de su padecimiento. La DMD es usualmente detectada cuando el afectado tiene entre 2-5 años de edad y empieza a caminar. Los primeros síntomas incluyen retraso en el desarrollo, dificultad para subir gradas o correr, pobre coordinación de los movimientos y crecimiento exagerado de los músculos de la pantorrilla.

La mayoría de los individuos afectados por la enfermedad necesitan de silla de ruedas a los 12 años, y más del 90% de ellos muere de fallas cardíacas y respiratorias a inicios de la tercera década de vida (Bestard, 2000; Do, 2007).

La DMB se caracteriza por una progresión más lenta y con esperanza de vida de 5 ó 6 décadas (Do 2006; Dunant 2003; Silva *et al* 2004; Silva *et al*, 2005). En el Cuadro 1 se presentan los hallazgos principales en estos pacientes según la época de aparición.

**Cuadro 1**

Características de los pacientes con DMD y DMB<sup>+</sup>

Tempranas	Lentitud en la marcha
	Retardo en el lenguaje
	Retardo en el desarrollo general
Intermedias	Dificultad para caminar
	Caídas frecuentes, bamboleo al caminar
	Marcha en las puntas de los pies
	Atrofia muscular de predominio proximal
Tardías	Pseudohipertrofia de gemelos
	Pérdida de la habilidad para deambular
	Debilidad en los miembros superiores
	Contracturas articulares y tendinosas
	Insuficiencia cardiaca

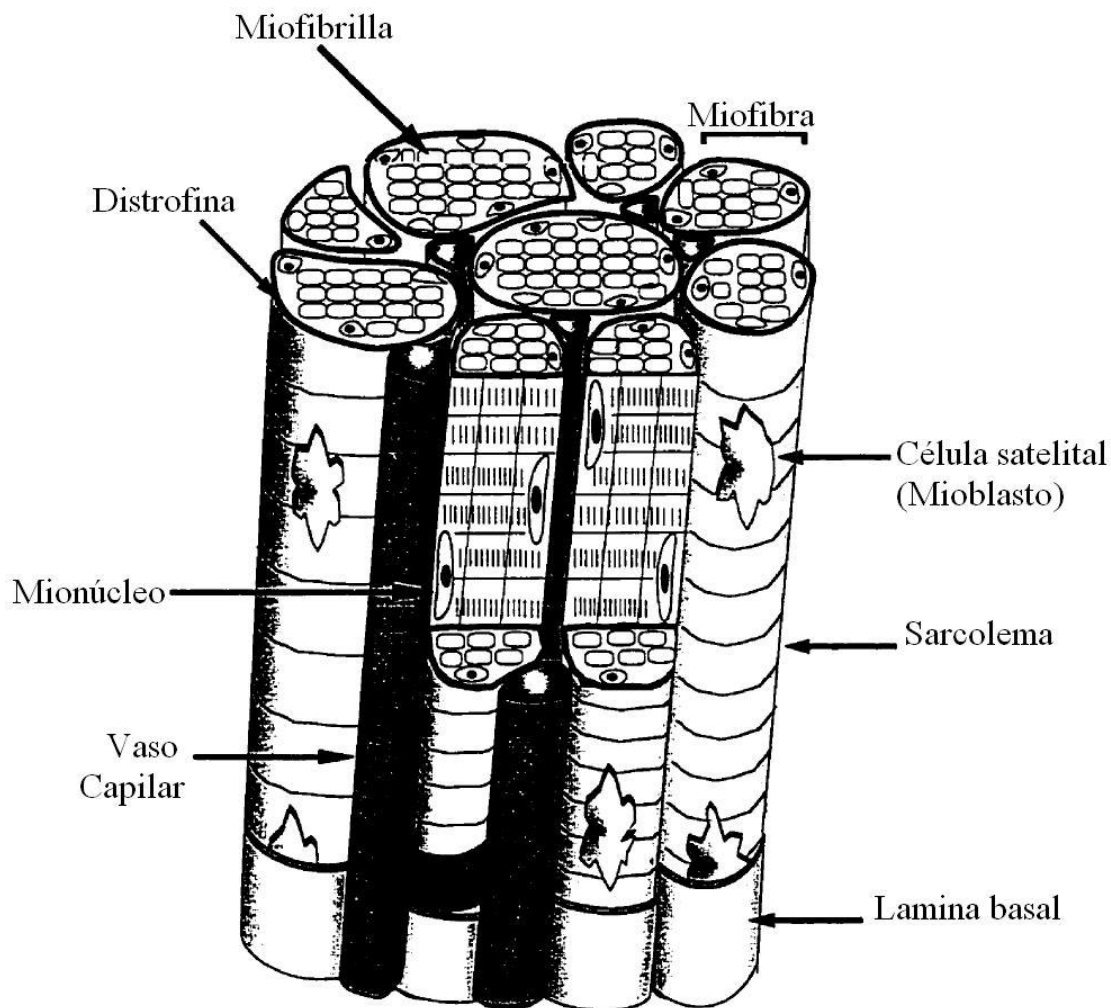
+ Algunos pacientes presentan retardo mental leve, pero esto es poco frecuente.

Fuente: Silva *et al*, 2005

## B. Fisiología del músculo

El músculo está compuesto de células alargadas y multinucleadas denominadas miofibras o fibras musculares. Cada una de estas contiene racimos de filamentos proteínicos denominados miofibrillas, las cuales se extienden a lo largo de toda la célula. Una miofibrilla está compuesta de una cadena de sarcómeros, que son las unidades funcionales de contracción y están compuestos por las proteínas actina y miosina. La miosina forma filamentos gruesos y la actina delgados y éstos se intercalan unos con otros durante la contracción muscular, por lo que el sarcómero se acorta en un 70% de la longitud que tiene durante la relajación. Cada fibra muscular está rodeada por una membrana plasmática interna (sarcolema) y otra externa denominada lámina basal. Durante el desarrollo, cada miofibrilla se forma por la fusión de células mononucleadas denominadas mioblastos. Éstas residen entre la membrana plasmática y la lámina basal y son células troncales encargadas de mantener la

división celular requerida para el crecimiento y reparación muscular normales (Bestard, 2000). En el Gráfico 1 se esquematiza la manera en que se encuentra organizado el tejido muscular.

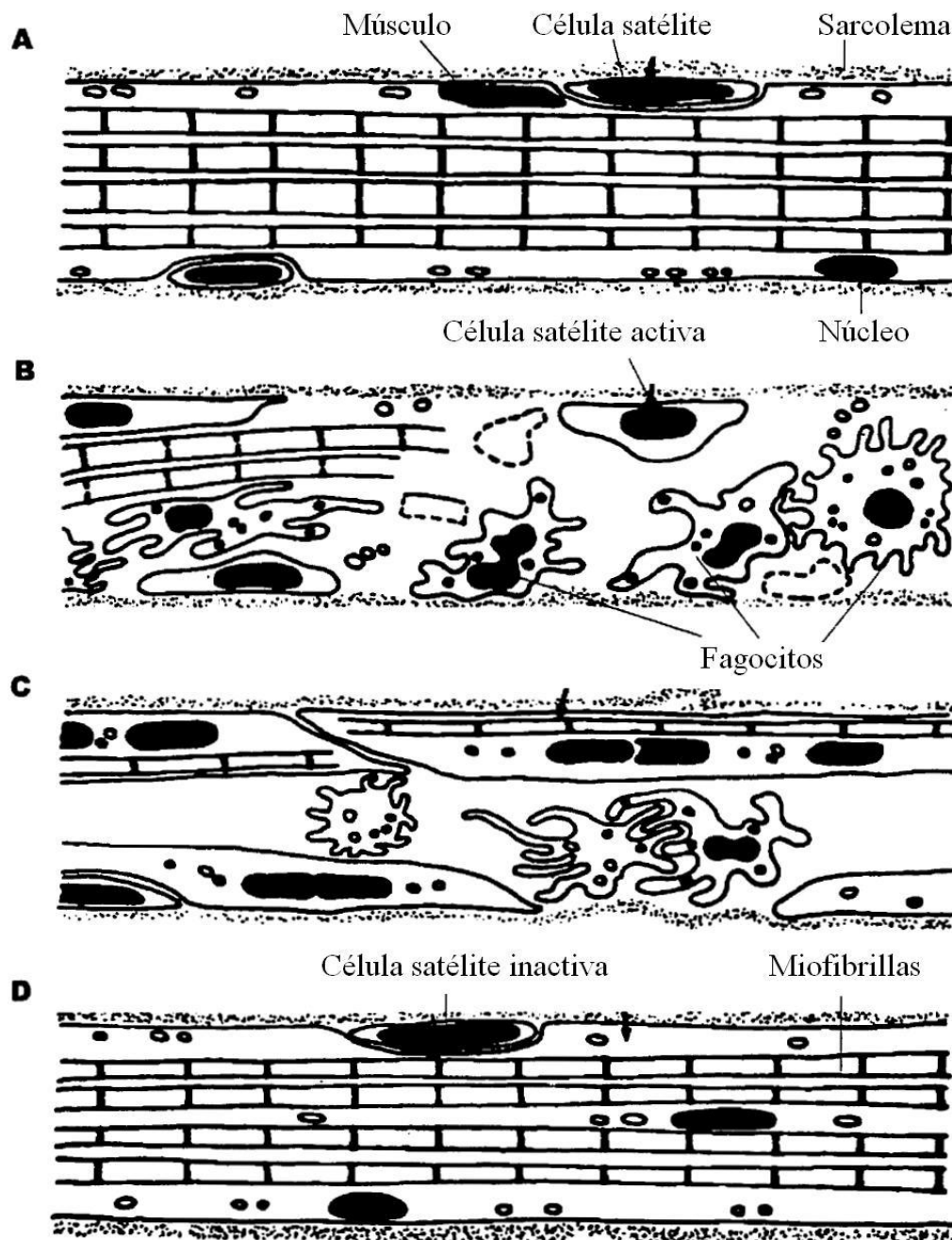


**Gráfico 1 – Representación diagramática de una sección de fibra muscular.** El músculo está compuesto de miofibras, cada una contiene miofibrillas, unidades contráctiles compuestas de fibras de miosina y actina. Cada miofibrilla está rodeada del sarcolema. Las células satelitales se encuentran en el sarcolema y la lámina basal. La distrofina, una proteína citoesquelética, se puede ver como un anillo oscuro a lo largo de la circunferencia de la miofibrilla, justo debajo de la membrana plasmática. La sangre llega a las células a través de vasos capilares ubicados entre cada miofibrilla (Modificado de Bestard, 2000).

Dentro de esta organización del tejido muscular se sitúan los problemas que causan la DMD y la DMB. En las etapas tempranas de la enfermedad, la degeneración muscular es seguida por la intensa proliferación de mioblastos y la regeneración del músculo. Durante



esta regeneración, fagocitos se infiltran entre las fibras musculares y eliminan restos de células dañadas y las células satélite se activan, proliferan y fusionan para formar nuevo tejido muscular (Gráfico 2). Se cree que en los pacientes con distrofia muscular, esta continua regeneración de células musculares conduce a la senescencia de las células satelitales, al alcanzar el fin de su vida replicativa (Bestard, 2000).



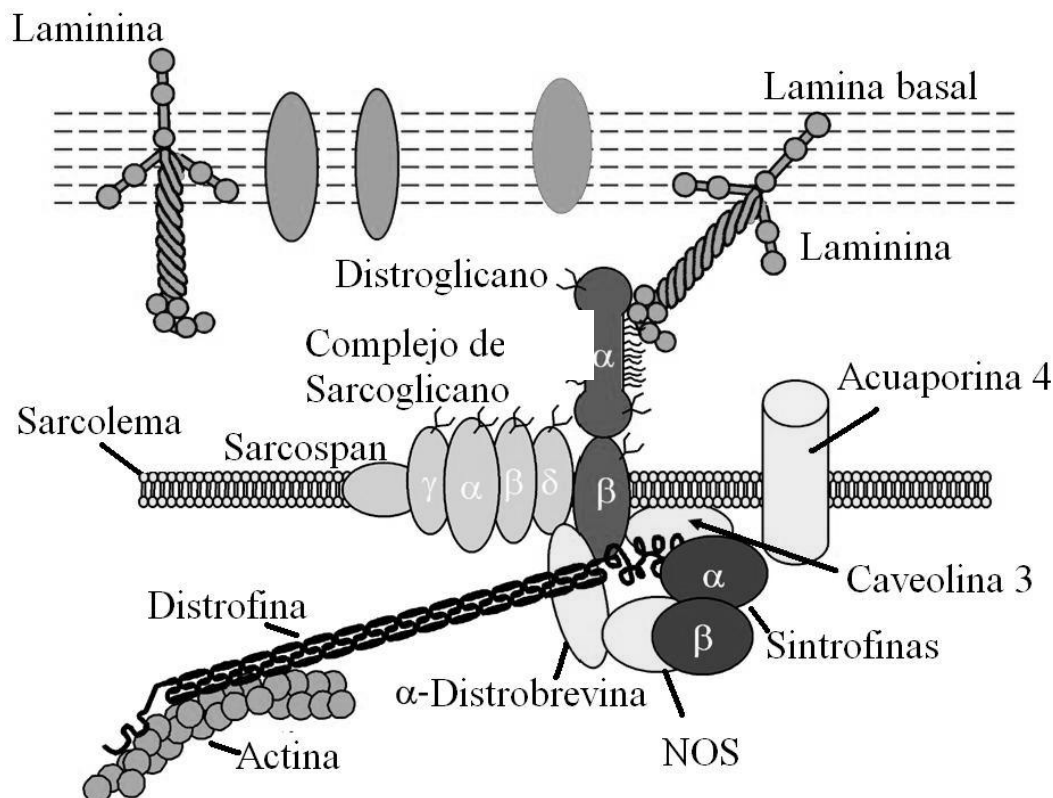
**Gráfico 2 – Regeneración de las células musculares.** (A) Corte longitudinal de tejido muscular donde se observa la porción de una sola miofibrila. (B) Cuando el tejido se daña, células fagocíticas se internan en el músculo dañado para eliminar desechos y las células satelitales se activan. (C) Durante la regeneración, las células satélites proliferan y se fusionan entre sí (D) hasta formar una miofibrila regenerada. (Modificado de Bestard, 2000)

La degeneración muscular que se da en DMD se debe a la pérdida de la función de la proteína distrofina. Ésta es una proteína de 3,685 aminoácidos (427 kDa) compuesta por cuatro dominios (Bestard, 2000; Silva *et al*, 2005). El primero de estos dominios, su extremo aminoterminal, muestra homología con las regiones de unión al extremo aminoterminal de la  $\alpha$ -actinina y de la  $\beta$ -espectrina. El segundo dominio consta de una serie de 24 repeticiones de 109 aminoácidos, las cuales forman una estructura helicoidal triple. Dentro de estas repeticiones se encuentran regiones ricas en prolina, las cuales actúan como bisagras al añadirle flexibilidad a la molécula. Consta de un tercer dominio similar a la unión al calcio de la  $\alpha$ -actinina. El último dominio consta de 400 aminoácidos y está asociado en su extremo carboxiterminal con un gran complejo de glicoproteínas (DGC) en la superficie de las fibras musculares. El DGC está compuesto por varias proteínas que incluyen los sarcoglicanos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -) los distroglicanos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -), las sintropinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-), sarcospan, distrobrevina, óxido nítrico sintasa (NOS), caveolina 3 y laminina- $\alpha$ 2/merosina. Este complejo se encuentra ligado a la matriz extracelular y a la laminina en el exterior de la membrana del sarcolema (Bestard, 2000; Campbell, 1995; Silva *et al* 2005) (Gráfico 3). La unión entre la laminina y la actina intracelular está dirigida a reforzar el sarcolema contra el estrés asociado a la contracción muscular.

Aparentemente la distrofina juega un papel de estabilización de la membrana plasmática durante la misma. La existencia de alguna anomalía que pueda interrumpir la integridad o abundancia de la distrofina resulta en la desestabilización de la interacción distrofina-DGC y su función membranaria. La falta de distrofina da lugar a inestabilidad celular en los puntos de unión de esta, dando lugar a una liberación progresiva de los componentes intracelulares. Las formas menos activas de la distrofina pueden mantener hasta cierto punto su función de sujeción al sarcolema, pero no tan efectivamente como la forma normal. Ésta es la clásica distrofia de Becker. En ambos tipos, finalmente la célula muscular muere gradualmente, produciendo la característica distrofia muscular (Bestard, 2000; Campbell, 1995; Do, 2007; Silva *et al*, 2005).

Adicionalmente al sarcolema del músculo esquelético, la distrofina se expresa en el músculo liso y cardíaco, así como en algunos tejidos no musculares, como el cerebro y sistema nervioso periférico: en algunos tipos específicos de neuronas, incluyendo las células de Purkinje y las neuronas de la corteza del cerebro (Michele y Campbell, 2003; Silva *et al*,

2005). Esto último se traduce en el desarrollo de cardiomiopatías y retraso mental (Dunant 2003; Pestronk 2006).



**Gráfico 3 – Complejo de distrofina glicoproteína.** El extremo N-terminal de la distrofina interactúa con la actina en el citoesqueleto y su extremo C-terminal interactúa con el complejo de glicoproteínas intermembranario. El DGC está compuesto de una gran variedad de proteínas. El DGC se encuentra unido a la matriz extracelular (lámina basal) a través de la interacción con la laminina-2/merosina. Esta unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto está dirigida a reforzar el sarcolema contra los movimientos de contracción muscular (Modificado de Bestard, 2000; Michel y Campbell, 2003).

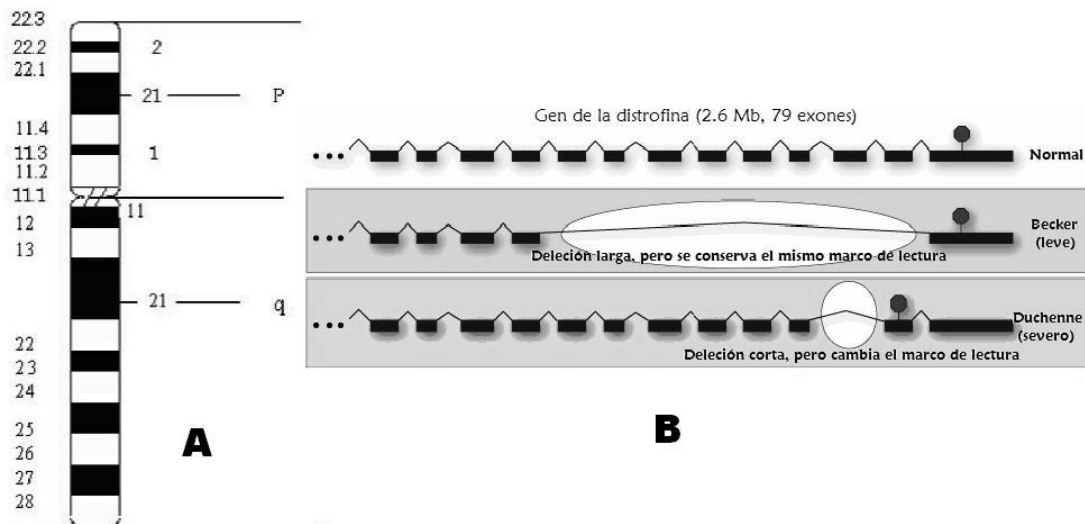
### C. Gen distrofina

El gen que codifica para la proteína distrofina se ubica en el brazo corto del cromosoma X, en la banda Xp21 (Singh *et al* 2006; Silva *et al* 2005; Rodríguez *et al* 1996) (Gráfico 4A). Este gen es uno de los más largos que se conocen, representa el 1.5% del cromosoma X en su totalidad. Abarca alrededor de 2,500 kb de ADN genómico, su transcrito es alrededor de 14 kb y está conformado por 79 exones. El resto del gen corresponde a intrones y se ha estimado que se tarda 16 horas en transcribirse completamente (Bestard, 2000; Dunant 2003; Silva *et al* 2005; Singh *et al* 2006).

Cuando se dan deleciones o inserciones donde se involucran pocos pares de bases, las cuales no son múltiplo de tres, el marco de lectura transduccional se ve alterado a partir del punto donde ocurre la mutación. Esta deleción altera la secuencia de aminoácidos hacia la región carboxiterminal de la proteína a sintetizar, modificando su estructura. Estas deleciones se denominan *mutaciones por fuera del marco de lectura* «out of frame» y aparentemente se encuentran asociadas a una mayor severidad de la enfermedad. Por otro lado, cuando el número de bases eliminadas o agregadas es múltiplo de tres, el marco de lectura no se ve afectado y aunque faltaran secuencias de aminoácidos, se conserva la secuencia de aminoácidos a lo largo del resto de la proteína. Este tipo de mutaciones está asociado a DMB (Silva *et al*, 2005)

También se ha encontrado que dependiendo del segmento del gen donde se da la deleción, el marco de lectura se afecta de forma distinta, dando como resultado un fenotipo o síntomas diferentes. Deleciones dentro de la región N-terminal de la proteína, exones 1 al 8, dan como resultado fenotipos que van del leve (DMB) al severo (DMD), lo que sugiere que la unión de la distrofina con la actina es importante, pero no indispensable en su totalidad. Las deleciones en el área central del gen que conservan el marco de lectura se encuentran asociadas a al fenotipo menos severo, es decir, a DMB. Mutaciones en el dominio rico en cisteína (exones 65 al 67) o que afectan la primera mitad del dominio C-terminal (exones 68 al 70), siempre resultan en el fenotipo severo de DMD, dando mayor importancia a esta región de la proteína. (Silva *et al*, 2005)

Los defectos en el gen de la distrofina que interfieren con el marco de lectura de traducción o con la secuencia promotora que indica el inicio de la síntesis de la distrofina, resultan en una proteína disfuncional, como en el caso de la DMD. La interrupción de la traducción más adelante en la secuencia del gen de la distrofina, resulta en la producción de una proteína de menor masa molecular, que aunque está presente, es menos activa que la proteína normal, conduciendo a la DM de Becker (Do, 2007).

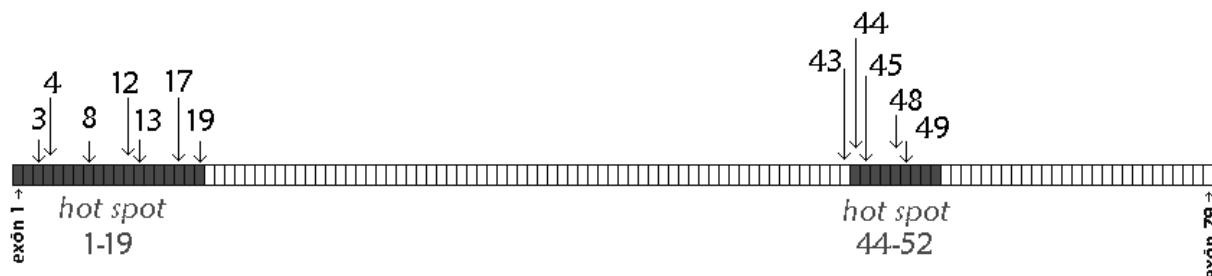


**Gráfico 4 – Gen *distrofina*.** (A) Representación del cromosoma X. Se observa el brazo corto, P, donde se encuentra la región 21, el sitio donde se encuentra el gen de la distrofina. (B) Representación esquemática de los tipos de mutaciones que se pueden dar en el gen de la distrofina. (Modificado de Silva *et al*, 2005; Green, 2006)

Desde que el gen de la distrofina fue clonado en 1986, se ha encontrado que en el 65% de los casos de DMD y DMB ocurren rearrreglos severos como deleciones o duplicaciones dentro de él (Bakker *et al* 1997); más específicamente, la DMD es causada primariamente por deleciones intragénicas en un 65% y por duplicaciones en un 5% (Singh *et al* 2006). El 60% de los casos de DMB se heredan de manera recesiva, de las madres portadoras de una mutación, a la mitad de sus hijos que serán afectados y a la mitad de las hijas que serán portadoras sanas y transmitirán la mutación a la siguiente generación (Silva *et al* 2004). El gen de la distrofina presenta una de las mayores tasas de mutación conocida, lo que explica que en un tercio de los casos no hay antecedentes familiares, sugiriendo que podría deberse a mutaciones *de novo* (casos esporádicos) (Sancho *et al* 2006; Rodríguez *et al* 1996).

En este gen se ha descrito heterogeneidad mutacional que incluye deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales; el 66% de todas las mutaciones corresponden a deleciones o duplicaciones de uno o más exones en el gen. Las deleciones tienen una distribución no al azar a lo largo de la secuencia del gen, pero se agrupan en dos regiones proclives o «*hot spots*»: el 80% se concentran en la región de los exones del 44 al 52 –de las cuales cerca de la mitad afectan al exón 44–, mientras que el 20% restante comprenden los exones del 1 al 19 (Silva *et al* 2004; Do 2006).

Debido al agrupamiento de las deleciones en las regiones «*hot spots*», se ha establecido que el análisis de 18 de los 79 exones del gen de la distrofina permite identificar el 98% de todas las mutaciones del tipo deleción en el gen, de las cuales el 33% se debe a la alteración de un único nucleótido o de unos cuantos nucleótidos (Silva *et al* 2004).

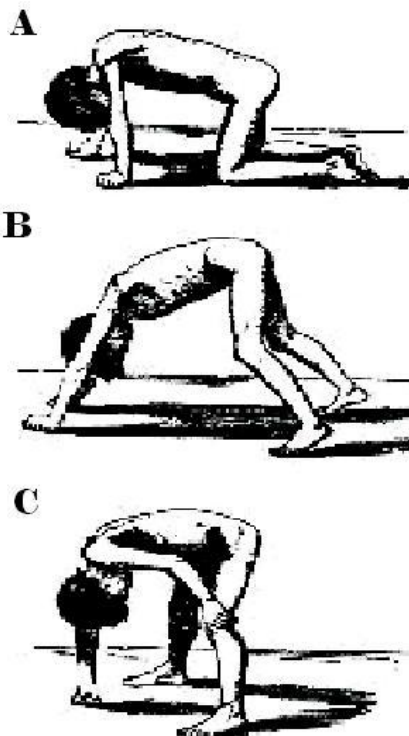


**Gráfico 5 - Representación esquemática del gen *distrofina*.** Las zonas oscuras representan los «*hot spots*», mientras que las flechas señalan los exones que serán evaluados en este estudio (Modificado de Silva *et al* 2004).

#### D. Diagnósticos utilizados

**1. Clínicos.** El diagnóstico se realiza inicialmente de manera clínica con la observación de los síntomas. Aunque predominantemente los retrasos son de tipo muscular, puede haber involucramiento del cerebro. Estudios sicométricos han revelado un coeficiente intelectual (IQ) menor en pacientes con DMD, sin importar su oportunidad educacional, con un IQ promedio de 85, comparado con 105 para la población normal. Adicionalmente, se observa un retraso para iniciar a caminar, ya que éste ocurre alrededor de los 18 meses. Se observa un paso anormal al caminar, que consiste en un contoneo de pasos largos, con hiperlordosis de la espina lumbar y apoyándose en las puntas de los dedos. El contoneo se debe a debilidad en los músculos *gluteus maximus* y *gluteus medius*, lo que dificulta la capacidad de apoyarse en una pierna, por lo que el cuerpo se inclina hacia el otro lado para balancearse. Más adelante se observa mayor dificultad para andar, con tropiezos sin razón aparente. Se dificulta la capacidad de levantarse de un asiento por cuenta propia debido a debilidad en los músculos proximales de la cadera. Esto se identifica por lo que se conoce como el signo de Gower, característico de DMD. Para levantarse, el niño debe apoyarse con sus codos y rodillas y luego extenderlos para elevar el cuerpo; luego, las manos y pies se unen para mover el centro de gravedad sobre las piernas. En este punto el niño debe liberar

una mano a la vez y apoyarla en la rodilla, y luego poder levantarse (Gráfico 6). A pesar que ésta es una observación clásica en DMD, existen otros tipos de distrofias que causan este signo debido a debilidad (Do, 2007)



**Gráfico 6 – Signo de Gower.** (A) El niño inicia el movimiento apoyándose en sus rodillas y manos, (B) luego se levanta estirando las extremidades, (C) para finalmente apoyar las manos en las rodillas y levantarse (Modificado de Mellion y Gilchrist, 2006).

Otras observaciones clínicas incluyen la ausencia de reflejos en los tendones y patellar, dolor en las pantorrillas durante la actividad, pseudohipertrofia de la pantorrilla y macroglosia. Alteraciones a nivel cardiopulmonar se dan desde el inicio de la enfermedad, pero estos no son clínicamente obvios. Diagnóstico para DMB es similar, únicamente estos ocurren en edades más avanzadas. (Do, 2007; Mellion y Gilchrist, 2006)

**2. Laboratorio clínico.** En el laboratorio, una de las alteraciones más características es la elevación del nivel de fosfocreatina kinasa (CPK) sérica. Ésta se encuentra elevada debido a que durante la contracción muscular, la ausencia de *distrofina* en el músculo elimina parte de la protección a lesiones y da inestabilidad de la membrana de las células musculares, permitiendo la liberación de material intracelular a la sangre (Do, 2007). El ensayo se realiza a partir de una muestra de sangre, donde se mide la cantidad de CPK a

través de la intensidad de luz que la enzima luciferasa produce al consumir el ATP sintetizado por la CPK (Zellweger y Antonik, 1975)

El ensayo de medición de CPK es un buen indicador de una distrofia muscular ya que sus resultados son indicador del deterioro de las células musculares. Debido a que la concentración de CPK en los glóbulos rojos no es significativa, el resultado no se ve afectado por la hemólisis a la hora del estudio. La CPK no se ve afectada por disfunciones hepáticas, como lo pueden ser otras enzimas medidas (transaminasas, aldolasas, lactato deshidrogenasas). Las mediciones de CPK realizadas pueden alcanzar cifras considerables (50 a 300 veces por encima de lo normal). Pueden encontrarse valores elevados de CPK entre los recién nacidos, probablemente provocados por la compresión del músculo esquelético durante el nacimiento, que luego tienden a disminuir, pero que en pacientes con DM siempre se conservan por encima de los valores normales. Resultados elevados durante tres mediciones con un mes de diferencia pueden tomarse como un diagnóstico de distrofia muscular. Con menor importancia, se puede contar con los niveles séricos elevados de transaminasa, aldolasa sérica y deshidrogenasa láctica (LDH) (Do, 2007; Silva *et al*, 2005; Zellweger y Antonik, 1975).

La electromiografía (EMG), a pesar de no considerarse como una técnica de diagnóstico definitivo, puede utilizarse para excluir procesos neurogénicos como la atrofia muscular espinal. De manera general, los músculos proximales de las extremidades inferiores pueden exhibir resultados de EMG más prominentes. Los potenciales de acción de unidad motora (MUAP) en pacientes con DMD o DMB son de corta duración y un aumento en las formas polifásicas que reflejan la pérdida de fibra muscular. Sin embargo, es necesario tomar un número suficiente de muestras para establecer la presencia de una distrofia (Mellion y Gilchrist, 2006; Silva *et al*, 2005).

La ultrasonografía es una novedosa técnica no invasiva que puede llegar a sustituir la EMG en lugares donde se cuenta con la tecnología y el entrenamiento apropiado. Incluso en las etapas tempranas de la enfermedad, es posible detectar diferencias en los músculos afectados. También puede resultar una herramienta para monitorear el avance de la enfermedad (Do, 2007; Mellion y Gilchrist, 2006).

El electrocardiograma (ECG) puede constituir una herramienta importante en el diagnóstico de las DM, ya que proporciona signos importantes que evidencian un claro



compromiso del músculo cardíaco; sin embargo, es necesario consultar con un cardiólogo para la interpretación de los resultados (Do, 2007; Silva *et al*, 2005).

La biopsia muscular era considerada el test definitivo para el diagnóstico de una enfermedad muscular. Al analizar ésta, se observan hallazgos típicos de otras distrofias musculares, como necrosis, con presencia de fagocitos, cambios en la miofibrillas, sobrecontracción de las fibras musculares (la longitud del sarcómero es varias veces mayor que su tamaño fisiológico normal) y daño en la membrana (observables por medio de microscopía electrónica) (Do, 2007; Silva *et al*, 2005).

**3. Inmunohistoquímicos.** Este tipo de ensayos se realizan utilizando anticuerpos antidistrofina o contra alguno de los componentes del complejo DGC, evaluándose tanto la cantidad como la calidad de la distrofina y/o de las glicoproteínas asociadas a ella, y el posterior análisis ya sea por medio de *immunoblotting* o fluorescencia. La ausencia completa de la distrofina o cifras de menos de 3% son específicas y características del fenotipo grave de DMD. Al utilizar anticuerpos dirigidos al extremo carboxiterminal de la *distrofina*, se ha observado que pacientes con la forma severa no presentan en su mayoría esta región, mientras que la región amino terminal si está presente. En 85% de los pacientes con DMB, la distrofina tiene un peso molecular anormal, al ser más pequeña por delección (80%), o más grande por duplicación (5%). En 15% de los pacientes restantes, la proteína tiene un tamaño normal. En cuanto a la cantidad de distrofina presente, se observan variaciones y no es un resultado confirmatorio de alguna de las formas de la enfermedad. Al realizar estudios con inmunofluorescencia *in vivo* se han observado diferentes patrones dependiendo del estado de la muestra analizada. Muestras normales presentan bandas fluorescentes en las fibras musculares que corresponden a la distrofina marcada. En pacientes con formas leves de DMB, se observan estas mismas bandas pero con interrupciones, debido a la presencia de una proteína de menor o mayor tamaño, pero aún un poco funcional. En el caso de pacientes con DMD no se observa distrofina. Estos hallazgos inmunohistoquímicos se correlacionan generalmente muy bien con el fenotipo (principalmente *immunoblotting*) e incluso llegan a ser útiles en la determinación del estado de individuo portador (principalmente por inmunofluorescencia) (Arahata *et al*, 1989; Bulman *et al*, 1991; Silva *et al*, 2005).

**4. Moleculares.** La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ha revolucionado la detección de las deleciones y el análisis de haplotipos. Incluso pueden detectarse, simultáneamente, deleciones de 9 exones mediante PCR en múltiplex (Bakker *et al* 1997). Este método, desarrollado por Chamberlain y colaboradores, es capaz de detectar más del 98% de las deleciones existentes y puede realizarse en un lapso de 24 horas (Silva *et al*, 2005).

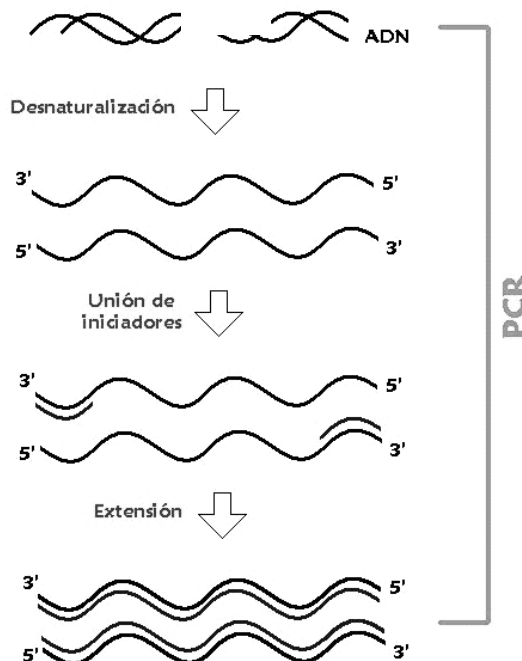
La PCR es un método *in vitro* en el cual secuencias de ADN o transcritos son amplificados selectivamente en forma rápida, con alta especificidad y fidelidad por medio de una reacción de extensión de un iniciador o cebador de oligonucleótidos hibridizado a una región blanco de una doble hebra de ADN, catalizada por la enzima *Taq* ADN polimerasa. La importancia de la PCR radica en su habilidad para amplificar *in vitro* un segmento de ADN a partir de cantidades traza del mismo (Brown 2001).

La mezcla de reacción contiene la plantilla de ADN, la polimerasa, el conjunto de cebadores de la amplificación, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) como cofactor de la polimerasa, una combinación de 4 deoxinucleotidotrifosfato (dNTPs), Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) y citosina (C) como sustrato para la polimerización del ADN y un buffer que mantiene pH, salinidad y osmolaridad adecuada para el óptimo funcionamiento de la enzima. La variación en la combinación de cada elemento presente en la mezcla de reacción puede afectar positiva o negativamente los resultados de amplificación (Henegariu, 1997).

Al inicio de un programa de amplificación, la mezcla de reacción se calienta para desnaturalizar o separar las hebras que conforman el ADN. Subsecuentemente, la mezcla se enfría hasta la temperatura de unión o hibridización de los cebadores, los cuales son complementarios a un corto segmento de la hebra plantilla de ADN. Luego cada uno de los cebadores, que flanquean la región de interés, se extiende enzimáticamente por una polimerasa, permitiendo la síntesis de un segmento específico de ADN complementario a la región de la hebra plantilla flanqueada. Estos tres pasos: desnaturalización, hibridización y extensión, se llevan a cabo a temperaturas predeterminadas, constituyendo un ciclo de la PCR (Brown 2001) (Gráfico 7). Posteriormente, la mezcla de reacción se calienta nuevamente para separar las hebras (original y recién sintetizada) permitiendo que estén disponibles para ciclos posteriores de hibridización y extensión. El resultado neto de una PCR es que al final de  $n$  ciclos, la reacción contiene teóricamente un máximo de  $2^n$

moléculas de ADN doble hebra que son copias de la secuencia de ADN flanqueada por los cebadores (Watson *et al* 1996).

La PCR múltiplex se refiere a una reacción en la que se incluyen dos o más pares de cebadores por cada reacción, permitiendo la amplificación de dos o más regiones de interés a partir de la misma plantilla de ADN en un mismo tubo de reacción (Brown 2001).



**Gráfico 7 - Representación esquemática de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Se observan las tres etapas que conforman un ciclo de la reacción: desnaturalización, hibridación de iniciadores o cebadores y extensión (Modificado de Brown, 2001).

Puesto que la detección de mutaciones por medio de PCR ha resultado ser una técnica certera para el diagnóstico de DMD y DMB, se han realizado numerosos estudios para su identificación en las regiones «hot spots» del gen *distrofina*. Todos estos se han basado principalmente en la metodología propuesta por Chamberlain y colaboradores (1988) y otro realizado posteriormente por Beggs y colaboradores (1990).

Ya en diferentes países latinoamericanos se han realizado estudios para el diagnóstico molecular de DMD y DMB. En un estudio realizado con 17 pacientes mexicanos buscando posibles deleciones en 17 exones pertenecientes a las 2 regiones «hot spots» del gen *distrofina*, se encontró un 60% de deleciones en la región mayor (exones 44-59), un 30% en

la región menor (exones 1-19) y un 10% en ambas regiones (González *et al*, 2004). En otro estudio realizado con 62 pacientes colombianos utilizando 18 exones pertenecientes a ambas regiones, se logró predecir un cuadro clínico en el 79% de los casos analizados (Silva *et al*, 2004). En Cuba, en un estudio realizado con 30 individuos con diagnóstico de DMD se encontró que el 53 % de los casos presentó una delección en el gen DMD y que el 87 % de las delecciones detectadas estuvieron localizadas hacia la región 3' del gen; específicamente, el 62.5 % de ellas involucraban los exones 48-51 de dicho gen (Rodríguez *et al*, 1996). Otro estudio realizado en Colombia utilizó una PCR múltiple que amplifica simultáneamente 6 exones del gen de la *distrofina*, encontrando que la proporción de delecciones corresponde al 31.25%, además el 60% del total de las delecciones involucra los exones 44 al 52. También se logró identificar mujeres portadoras de la enfermedad por medio de la utilización de polimorfismos dinucleotídicos localizados en el interior del gen (Hernández y Restrepo, 2002). En estudios realizados en otras regiones, se encontró que la PCR multiplex es efectiva para el diagnóstico prenatal en recién nacidos y niños que presentan síntomas, con historial familiar de distrofias musculares (Singh y Kabra, 2006). Asimismo, se logró establecer un método para la detección de delecciones en 5 exones del gen *distrofina* en embriones y de esta forma poder utilizarla como un medio de selección de embriones sanos para su implantación (Hussey *et al*, 1999)

También se han realizado estudios para la detección de mutaciones puntuales en el gen *distrofina*, ya que este tipo de mutaciones puede ser la causa del 3% de pacientes con la enfermedad, en los cuales el defecto en el gen no es hereditario (Chaturvedi *et al*, 2001; Roberts *et al*, 1992).

### **E. Distrofias musculares de Duchenne y Becker en Guatemala**

Se efectuó una revisión a los archivos de tesis de las facultades de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de la Universidad Francisco Marroquín, y se encontró que hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio sobre DM. También se consultó en las direcciones de Departamentos de Pediatría del Hospital Roosevelt, San Juan de Dios e IGSS y no se encontró ningún estudio sobre esta enfermedad, solamente se reportan diagnósticos individuales con altas sospechas clínicas. De igual manera, el

Departamento de medicina interna del Hospital Nacional de Antigua no cuenta con registros de estudios sobre las DM (Maza, 2006)

En el Hospital General San Juan de Dios, se reportan 12 casos nuevos por año con diagnóstico clínico de DMD o DMB (Cabrera, 2006). En las clínicas de las Obras Sociales del Santo Hermano Pedro se tiene conocimiento de estudios sobre este tema que se realizan a nivel individual para el diagnóstico clínico de la enfermedad (Calderón, 2006).

## **F. Tratamientos**

Actualmente no se conoce una cura para DMD y DMB; sin embargo, se están logrando avances en búsqueda de un tratamiento eficaz para este tipo de enfermedades. Estas estrategias van enfocadas hacia dos puntos específicos: 1) utilización de medicamentos dirigidos al tratamiento de los síntomas, especialmente para evitar la necrosis y fibrosis muscular y 2) corrección del defecto desde su origen, es decir, de las anomalías en el gen *distrofina*, mediante técnicas moleculares.

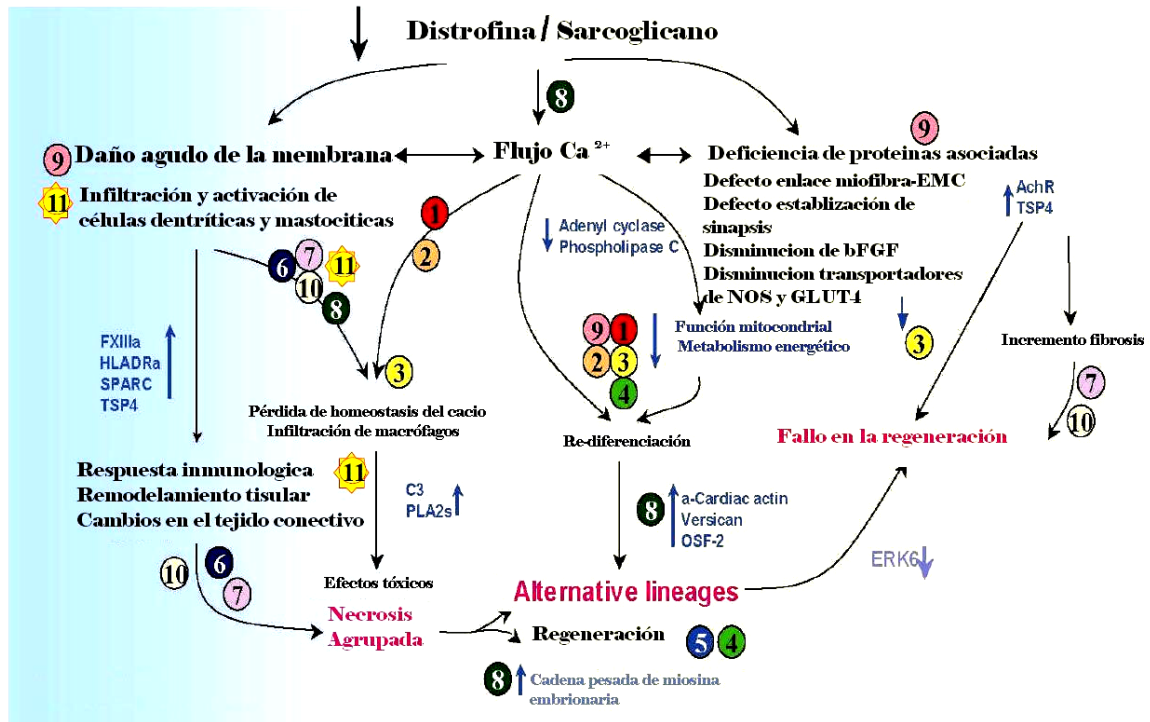
En 1989, se realizó un estudio con 103 pacientes con DMD, a quienes se les aplicó una dosis del esteroide prednisona durante 6 meses. Se observó una mejoría en la fuerza muscular en los pacientes tratados comparados con un grupo control. Se cree que estas mejoras se deben a la supresión de la expresión de células T citotóxicas en los músculos necróticos. Sumado a los efectos adversos de las dosis altas de esteroides (aumento de peso, miopatía, osteoporosis y retraso en el desarrollo), esta mejoría es de corta vida, ya que luego de tres meses la fuerza se pierde gradualmente.

Actualmente se están estudiando otras posibilidades de dosis altas de esteroides, que han mostrado beneficios duraderos antes de los 18 meses y otras sustancias inmunosupresoras como azatioprina y ciclosporinas. A pesar de que estos medicamentos pueden atrasar el daño citotóxico y la necrosis de células musculares, éstos no pueden estimular ni producir la síntesis de la distrofina deficiente (Do, 2007). También se han hecho estudios utilizando pentoxifilina, un inmunomodulador (Gráfico 8). A pesar de sus beneficios, estos medicamentos poseen poca aceptación debido a sus efectos adversos (Escolar *et al*, 2003).

### Medicamentos con el potencial de interrumpir la cascada patofisiológica de DMD

- 1 Piridoxina    3 CoQ10    5 Glutamina    7 IL-1 RA    9 Taurina    11 Prednisona  
 2 Acido nicotínico    4 Creatina    6 Oxatomida    8 EDTA    10 Pentoxifilina

#### Cascadas patofisiológicas en deficiencias de distrofina y sarcoglicano



**Gráfico 8 – Medicamentos con el potencial de interrumpir la cascada fisiopatológica de DMD.** Se observan 8 distintos medicamentos así como su sitio de acción a través de todo el mecanismo que produce la falta de la proteína *distrofina* normal. Todos estos medicamentos tienen un efecto principalmente a nivel de regulación de la citotoxicidad. (Modificado de Escolar *et al*, 2003)

En la actualidad, se han logrado desarrollar nuevas técnicas que podrían ser utilizadas para el tratamiento de DM, basadas en terapias genéticas. Una de ellas se basa en la introducción de mioblastos inmaduros sanos en el tejido muscular anómalo, donde se puede fusionar y estimular la suficiente producción de distrofina para revertir la degeneración en proceso. Esta técnica se ha realizado exitosamente en ratones modificados genéticamente para presentar síntomas equivalentes a los de DM; en ellos se ha logrado expresar distrofina, pero el procedimiento aún no ha sido aplicado en humanos (Do, 2007). Otra técnica estudiada es la implantación de un gen *mini-distrofina* añadido a un promotor específico del músculo MCK. Con esta técnica se observó la expresión del gen en ciertas partes del cuerpo

de ratones, con una buena cantidad de distrofina presente; sin embargo, otras partes no mostraron mayor avance, por lo que su utilización no es recomendable. Otro estudio en ratones involucró un tratamiento utilizando antibióticos aminoglucósidos que tienen la capacidad de interferir en la traducción de la distrofina y pueden pasar por alto un punto de terminación prematuro debido a una mutación. Con esta técnica no se observaron resultados positivos en ratones, ni en cultivos celulares (Dunant, 2003). También se ha intentado la introducción de genes por medio de vectores virales, en especial con *Adenovirus*; sin embargo, esta estrategia tiene como desventaja la capacidad inmunogénica de las cápsides virales (Hauser y Chamberlain, 1996).

### III. JUSTIFICACIÓN

La DMD es una de las enfermedades infantiles hereditarias más comunes a nivel mundial. Además de ser mortal, la enfermedad constituye un impedimento para llevar una vida normal debido a sus síntomas característicos. La falta de libertad de movimientos puede causar problemas de tipo psicológico debido a que los niños afectados se retraen socialmente al no poder realizar las actividades cotidianas de forma normal. Esta situación ha motivado a la comunidad científica a buscar soluciones para el tratamiento de la enfermedad.

Los métodos de diagnóstico moleculares, como la PCR multiplex, constituyen una herramienta novedosa de gran especificidad y rapidez en la obtención de resultados. Esta técnica ha logrado aumentar considerablemente la eficiencia para la identificación de las anomalías heredadas que causan el defecto en la producción de la distrofina.

En este contexto, este estudio pretende sentar las bases para la detección molecular de deleciones en el gen *distrofina*, de manera que, por primera vez en Guatemala, los pacientes que padecen DMD y DMB puedan obtener un diagnóstico más exacto, que en un futuro les permita beneficiarse de tratamientos más específicos.

Se espera que el método estandarizado sea de utilidad para futuras investigaciones en las que desee obtener más información acerca de DMD y DMB en Guatemala.



## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Optimizar un método para la detección de 12 exones del gen *distrofina*, relacionados con la distrofia muscular de Duchenne y de Becker, mediante PCR múltiplex.

### B. Objetivos específicos

- Obtener ADN a partir de linfocitos de sangre periférica de individuos sanos, de individuos diagnosticados clínicamente con DMD o DMB y de sus familiares femeninos cercanos, utilizando dos métodos distintos de extracción.
- Comparar la efectividad de ambos métodos de extracción, por medio de la comparación del rendimiento de extracciones, costo por ensayo y tiempo de duración de la extracción y efectividad en la PCR
- Amplificar 12 exones del gen *distrofina* a partir de muestras de ADN de individuos sanos.
- Identificar los exones del gen *distrofina* que pueden amplificarse en la modalidad de PCR multiplex.
- Optimizar el número de reacciones PCR múltiplex que pueden amplificar la totalidad de los exones a evaluar.
- Aplicar la técnica de PCR múltiplex optimizada con individuos sanos para detectar las deleciones exonales que presentan los pacientes diagnosticados clínicamente con DMD o DMB, y sus familiares femeninos.
- Comparar el patrón de amplificaciones exonales del gen *distrofina* de pacientes y de familiares cercanos femeninos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de cuatro individuos con síntomas de DMD o DMB, seis familiares femeninos y dos individuos sanos. Todos los individuos fueron previamente informados de la finalidad del estudio por el médico especialista por medio de un consentimiento escrito (véase Apéndice 1).

La extracción de sangre fue realizada por una enfermera entrenada para este procedimiento. Se tomaron 5 mL de sangre periférica total, por venopunción (Silva *et al* 2004). Para esto se utilizó el sistema de mariposa Vacutainer® (Becton Dickinson) con aguja No. 23 G  $\frac{3}{4}$ . La sangre se colectó en tubos de ensayo al vacío con 9 mg de K3 EDTA (Becton Dickinson). Se utilizó material nuevo y estéril, descartándolo inmediatamente después de su utilización en un recipiente para desechos punzocortantes. La extracción se llevó a cabo en una clínica para adultos de la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR).

### B. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de linfocitos de sangre periférica, utilizando dos protocolos distintos: un kit comercial y un método salino no enzimático.

En el primero se utilizó el kit comercial *Wizard® genomic DNA purification kit* (Promega) de acuerdo a las especificaciones del manual (véase Apéndice 2). La extracción de ADN se hizo a partir de 1 mL de sangre completa para individuos con síntomas y un control de individuo sano y a partir de 300  $\mu$ L para muestras de familiares femeninos.

El segundo protocolo se realizó a partir de un método salino no enzimático (Lahiri y Nurnberger 1991) (véase Apéndice 3). La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de linfocitos separados por centrifugación. El volumen de sangre a partir del cual se separaron los linfocitos varió entre 2.5 y 4 mL dependiendo de la cantidad total de sangre extraída y del volumen utilizado previamente en el método de extracción por kit.

Todas las muestras de ADN extraído fueron precipitadas en isopropanol o etanol absoluto y almacenadas a  $-20^{\circ}$ .

Las extracciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética de la Fundación Aldo Castañeda.

### C. Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó por espectrofotometría utilizando el *Biophotometer*® (Eppendorf) de acuerdo a las especificaciones del manual (Gráfico 14, véase Apéndice 4). El equipo determina la concentración de ADN en ng/μL y la pureza según la razón  $A_{280}/A_{260}$ . Para las mediciones se utilizaron diluciones 3:80 en agua destilada filtrada y como blanco se utilizó agua.

A partir de los valores de concentración obtenidos, del volumen y la cantidad de las alícuotas de extracción y del volumen de sangre, se determinó la cantidad de ADN total extraída y el rendimiento de la extracción (Gráfico 17, véase Apéndice 8).

La cuantificación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### D. Estandarización de la PCR

Se realizó la amplificación de 12 exones pertenecientes a las dos regiones «*hot spot*» del gen *distrofina*, utilizando las extracciones de ADN de individuos sanos. Los cebadores utilizados para los exones 4, 12, 8, 17 y 19 fueron propuestos por Chamberlain y colaboradores (1988) y para los exones 3, 13, 43, 44, 45, 48 y 49 se utilizaron los cebadores propuestos por Singh y Kabra (2006) (Cuadro 5, véase Apéndice 5). Todos los cebadores fueron obtenidos de la casa comercial Invitrogen.

Se realizó una estandarización de reacciones heptuplex, quintuplex y cuádruplex, basada en lo propuesto por Silva *et al* (2004). Se realizaron combinaciones de exones de acuerdo al tamaño de sus productos de amplificación. Se realizaron dos distintas combinaciones para la PCR heptuplex (Cuadro 6, véase apéndice 6). Ambas reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μL, utilizando 0.25 U/μL de *Gotaq flexi*® DNA polymerase (Promega), *Gotaq flexi*® Buffer incoloro 1x (Promega), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 μM de cada cebador, 0.4 mM de cada dNTP y 500 ng de plantilla de ADN (Silva *et al*, 2004).

Las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores *Program Thermal Controller* (MJ Research) y *GeneAmp 9700* (Applied Biosystems). El programa general consistió de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 50° C y 4 minutos a 65° C, con una

desnaturalización inicial de 6 minutos a 94° C y una extensión final de 7 minutos a 72° C. Los productos de amplificación fueron almacenados a 4° C.

Posteriormente, se realizaron modificaciones de la concentración de reactivos en la mezcla de reacción: polimerasa de 0.12 a 0.2 U/ $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> de 2 a 3 mM; cebadores, variando la concentración individual de cada par de 0.25 a 0.35  $\mu$ M. También se modificó la duración de la etapa de extensión de 2 a 4 minutos y se elevó la temperatura de hibridización de 2 a 4° C

Adicionalmente, se hicieron PCRs con combinaciones uno, dos (duplex) y tres (triplex) pares de cebadores. La estandarización se basó en lo propuesto por Henegariu *et al* (1997) (Gráfico 16, véase apéndice 7). Se inició trabajando con un volumen de reacción de 25 $\mu$ L que contenía 2 U de *GoTaq Flexi® DNA polymerase* (Promega), *GoTaq Buffer* incoloro 1x, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.2  $\mu$ M de cada cebador y 0.2 mM de cada dNTP (Promega).

El programa general consistió de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a la temperatura de hibridización seleccionada para cada par o trío de exones, 2 min a 72° C con una desnaturalización inicial de 4 min a 94° C y una extensión final de 3 min a 72° C. Los productos de amplificación fueron almacenados a 4° C hasta la observación de los resultados.

Posteriormente, se llevaron a cabo modificaciones de la concentración de reactivos en la mezcla de reacción: polimerasa de 1.5 a 2.5 U por reacción; MgCl<sub>2</sub> de 2.5 a 3 mM; cebadores, variando la concentración individual de cada par de 0.15 a 0.4  $\mu$ M; cantidad de plantilla de ADN, variando desde 250 a 450 ng por reacción. Además se modificó la duración del tiempo de extensión de 2 a 4 min y se cambió la temperatura de hibridización, de 2 a 4° C.

Una vez estandarizadas las PCRs multiplex, se amplificaron los exones de muestras de ADN de 4 individuos con síntomas y 6 muestras de ADN de familiares cercanos femeninos.

En cada PCR se utilizó como control negativo interno una mezcla de reacción con agua ultrapura en lugar de plantilla de ADN. Las PCRs se realizaron en el Laboratorio de Genética de la Fundación Aldo Castañeda y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **E. Visualización de productos de amplificación**

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa (Promega) al 2%, 2.5% y 3% en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-Base 90 mM, acetato de sodio 90 mM y 1mM EDTA) o TBE 1X (Tris-Base 0.089 M, Borato 0.089 M y EDTA 1 mM), colocando de 6 a 8  $\mu$ L del producto con 1  $\mu$ L de solución de carga (Promega). La electroforesis se realizó en cámaras *EasyCast® Horizontal Minigel Systems* (Owl Separation Systems), *Mini-horizontal Unit* (Fisher Scientific) o *Sub-Cell model 96* (BioRad), realizando variaciones en el voltaje (80V, 85V, 100V y 110V) y manteniendo la corriente constante a 350 mA. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, antes o después de la electroforesis. La tinción previa a la electroforesis consistió en agregar 40  $\mu$ L de solución de bromuro de etidio 0.625 mg/mL (CLP) a la solución de agarosa previo a su polimerización. La tinción posterior a la electroforesis consistió en sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio 0.1 mg/mL o 50  $\mu$ g/mL. Se realizaron pruebas de tinción dejando el gel en bandeja con solución durante 4, 5, 7 minutos y dejando lavar en bandeja con agua durante 2, 5, 10 y 15 min.

Los geles se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador Slimline® Series (Spectroline) y el resultado se registró utilizando una cámara digital Cyber-Shot® (Sony) (Gonzales *et al*, 2004; Silva *et al*, 2004).

La electroforesis y visualización de los productos de amplificación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## **VI. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **A. Unidad experimental**

Amplificación de exones del gen *distrofina* por medio de un PCR multiplex.

### **B. Tamaño de muestra**

La muestra estudiada se compone de dos individuos sanos, cuatro individuos con síntomas de DMD o DMB y 6 familiares femeninos, la madre de cada individuo enfermo y una hermana de dos de ellos, haciendo un total de 10 casos a analizar.

### **C. Análisis estadístico**

Se comparó si existen diferencias significativas entre las medias de los valores de rendimiento y pureza entre los dos métodos de extracción utilizados. Para esto se realizó un análisis utilizando la prueba t de student para muestras independientes de varianzas iguales con un nivel de confianza del 95% (Pértega y Pita, 2001).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo un total de 12 muestras de ADN: dos pertenecientes a controles sanos, cuatro de individuos con síntomas y seis de familiares femeninos de los anteriores. Once de estas muestras se extrajeron utilizando el kit comercial: una de las muestras control y todas las muestras de individuos con síntomas se extrajeron a partir de 1 mL de sangre completa; todas las muestras de los familiares femeninos se extrajeron a partir 300  $\mu$ L de sangre completa. Nueve de las muestras se extrajeron utilizando el método salino no enzimático: una muestra control, dos muestras de individuos con síntomas y todas las muestras de familiares femeninos.

Los resultados (Cuadro 7, véase Apéndice 8) indican que los diferentes volúmenes de sangre a partir del cual se extrajo (0.3, 1 y 2.5-4 mL) afecta la cantidad total de ADN obtenida: a mayor cantidad de sangre utilizada, mayor cantidad de ADN extraída. Por tal razón, no resulta conveniente comparar los dos métodos de extracción utilizados en base a la cantidad total de ADN. En cambio, la comparación de los métodos de extracción en base su rendimiento (Cuadro 2) es más adecuada debido a que este valor no varía según el volumen de sangre total, sino de la cantidad de ADN extraído por unidad de volumen. Por otra parte, la razón  $A_{260}/A_{280}$  indica la relación entre cantidad de ADN con la presencia de otros contaminantes (proteínas, ARN y solventes orgánicos). Esta relación se utiliza como un indicador de la pureza de la extracción, en la que los valores entre 1.8 y 2.0 se toman como alta pureza. Los valores fuera de este rango indican contaminación de algún tipo (Warburg y Christian, 1942).

Los resultados de las muestras de ADN extraído (Cuadro 2) presentan valores de rendimiento (Gráfico 18, véase Apéndice 9) y pureza (Gráfico 19, véase Apéndice 9) aparentemente mejores en extracciones realizadas con el kit de extracción en comparación con los valores obtenidos con el método de extracción salino (Cuadro 8, Apéndice 10). De la misma forma, al comparar el rendimiento y la pureza de las muestras extraídas con el kit comercial a partir de 1 mL y 300  $\mu$ L de sangre completa, se observa que las medias de ambos parámetros son mejores para las muestras extraídas a partir de 300  $\mu$ L. A pesar de que

estas observaciones, no se encontró una diferencia significativa entre en ninguno de los dos casos.

**Cuadro 2**

Rendimiento y pureza de extracciones de 12 muestras, mediante los dos métodos utilizados.

Muestra	Rendimiento ( $\mu\text{g ADN} / \text{mL Sangre completa}$ )		Pureza ( $A_{280}/A_{260}$ ) <sup>b</sup>	
	Kit	Método salino	Kit	Método salino
C1	31.80	-	2.18	-
C2	-	32.85	-	1.94
P3	7.00	-	1.94	-
P4	2.20	-	2.75	-
P7	<b>16.00</b>	5.52	1.50	<b>1.64</b>
P9	<b>26.00</b>	23.66	1.95	<b>1.86</b>
F2 <sup>a</sup>	45.78	<b>193.95</b>	<b>1.81</b>	<b>1.81</b>
F3 <sup>a</sup>	<b>272.00</b>	111.60	1.70	<b>1.83</b>
F4 <sup>a</sup>	<b>516.00</b>	11.25	<b>1.80</b>	1.88
F9 <sup>a</sup>	<b>110.67</b>	3.00	<b>1.80</b>	2.50
F10 <sup>a</sup>	<b>63.11</b>	2.70	<b>1.82</b>	3.60
F13 <sup>a</sup>	<b>52.44</b>	116.40	1.74	<b>1.83</b>
Promedio	<b>103.91 ± 156.38</b>	55.66 ± 68.51	<b>1.91 ± 0.31</b>	2.12 ± 0.23

<sup>a</sup> Muestras extraídas a partir de 300  $\mu\text{L}$  de sangre completa con kit comercial.

<sup>b</sup> Valores de pureza de 1.80 o cercanos indican mayor pureza. Los valores mayores indican presencia de impurezas como ARN u otros componentes. Valores menores indican presencia cantidades muy altas de proteínas (Warburg y Christian, 1942).

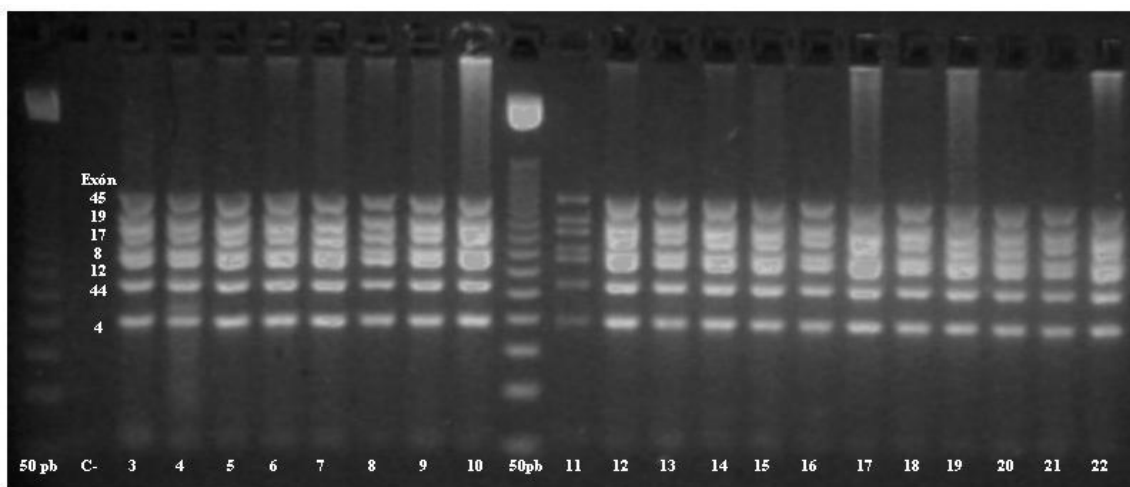
Los números resaltados con negrilla indican los valores más altos de rendimiento y pureza para la misma muestra.

Es importante considerar que el rendimiento de la extracción es afectado por la concentración de linfocitos en la sangre, ya que esta varía de persona a persona (Promega corporation, 2005) y por consiguiente, también varía la cantidad de ADN disponible para su extracción. Así, al comparar individualmente cada muestra en sus dos formas de extracción (Cuadro 2), se observa que en cinco de ocho de ellas se obtuvo un mejor rendimiento con el kit comercial. En cuanto a pureza, seis de las ocho muestras presentaron valores similares y cercanos al rango de 1.8-2.0. Únicamente dos muestras presentaron valores de pureza superiores a 2.5 con la extracción por el método salino.

Aunque estas estimaciones de pureza obtenidas mediante la razón  $A_{280}/A_{260}$  son aceptadas, poseen la desventaja de no es posible detectar la contaminación por bajas concentraciones de proteína. Además, otros contaminantes (ARN, fenol y otros solventes orgánicos) pueden alterar la medición de absorbancia a estas longitudes de onda, afectando los resultados. Otra desventaja es que la absorbancia a 260 nm depende de la composición A/T y G/C de la muestra de ADN y puesto que esta composición varía de una muestra a otra, también lo hace su absorbancia (Glasel, 1995).



La eficiencia de la extracción de ADN a partir de sangre completa de los individuos se refleja en un análisis por PCR, por lo que además de presentar un rendimiento y pureza adecuados, la extracción de ADN debía constituir una plantilla efectiva para amplificación por PCR. Para ello, las diferentes extracciones de ADN se compararon por medio de una PCR para la amplificación de siete exones, donde se observó una adecuada amplificación para todos los casos (Gráfico 9).



**Gráfico 9 – Amplificación de diferentes extracciones de ADN.** Electroforesis de PCR heptuplex en un gel de agarosa al 3% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Se observan escaleras de 50 pb (Promega) (columnas 1 y 2) y la amplificación de controles sanos (columnas 3 y 4), muestras de individuos enfermos (columnas 5-10) y de individuos de familiares femeninos (columnas 12-23). En la columna 2 se observa el control negativo. Se observa la amplificación de muestras extraídas con método salino (columnas 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 20 y 22) y kit comercial (columnas 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21 y 23).

Con base a lo anterior, se deduce que ambos métodos de extracción son adecuados para utilización en análisis por PCR multiplex. Sin embargo al momento de elegir uno de ellos, se recomienda evaluar otros criterios como tiempo de extracción y costo. En el caso del método salino no enzimático, el tiempo aproximado de extracción fue de tres horas y media, mientras que con el kit comercial fue de 1 hora y media. Aunque la extracción con por el kit comercial es más rápida, puede utilizarse cualquiera de los dos métodos, ya que el procedimiento de extracción debe continuarse un día después para su purificación y dos horas menos implica mayor rapidez del procesamiento de las muestras.

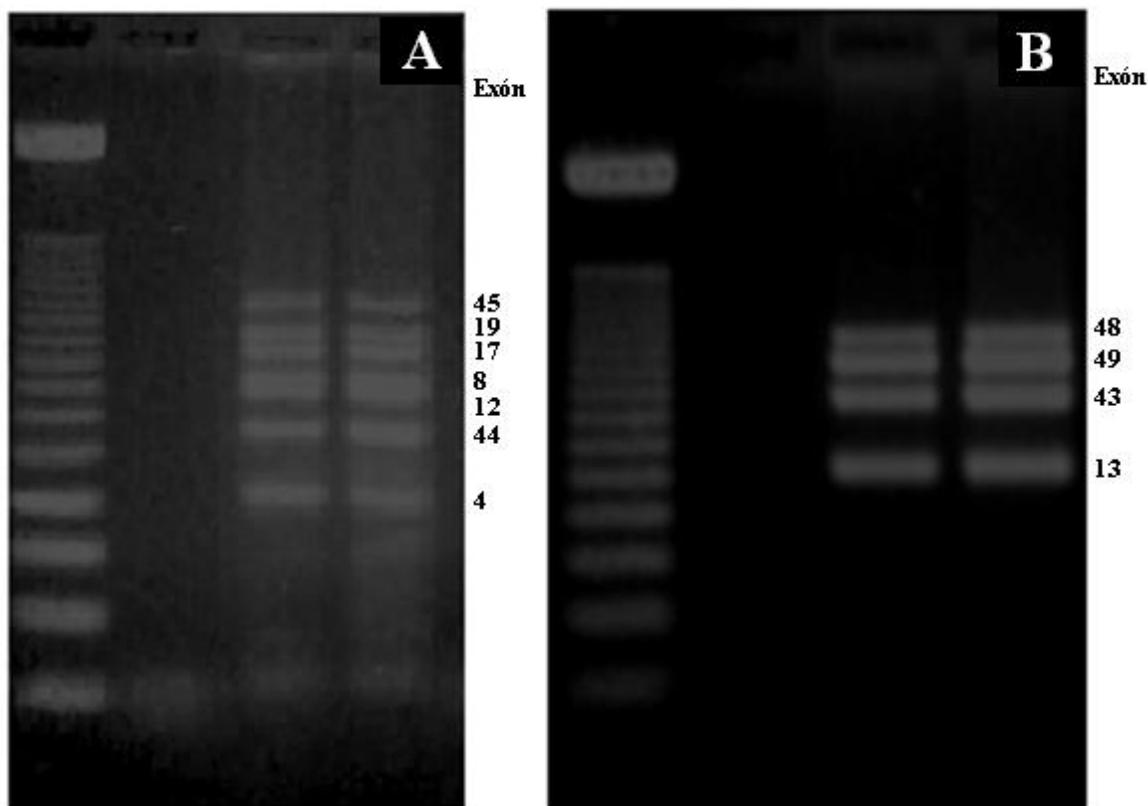
También se comparó el costo de cada método de extracción de acuerdo a los reactivos y materiales utilizados (Cuadro 9, véase Apéndice 11). Con base al volumen, masa o cantidad de cada componente utilizado, se determinó que el costo por extracción con kit es de Q 38.38 a partir de 1 mL de sangre y Q 11.34 a partir de 300  $\mu$ L de sangre; en cambio, el costo de una extracción por el método salino es de Q 8.73 para cualquier volumen de sangre utilizado. De acuerdo a estas estimaciones, sería posible realizar casi 5 extracciones por el método salino con el costo de una sola extracción con kit comercial a partir de 1 mL de sangre. En el caso de la comparación de costos de extracción con kit comercial a partir de 300  $\mu$ L y con el método salino, la diferencia es menor, por lo que podría pensarse que ambos métodos son igualmente eficientes; sin embargo, deben considerarse otros aspectos a la hora de decidir el método más conveniente. Por un lado, aunque el volumen de sangre requerido para la extracción de ADN con kit comercial es menor que el que se requiere con el método salino, en ambos casos se toma la misma cantidad de sangre durante la venopunción, y por lo tanto, el volumen de sangre a utilizar no es una limitante en el proceso. Adicionalmente, la extracción a partir de un mayor volumen de sangre puede resultar en la obtención de una mayor cantidad de ADN total, especialmente en el caso de que haya pocos linfocitos en la sangre.

Además de la elección de un método adecuado de extracción, hay que tomar en cuenta otros aspectos importantes durante la obtención y conservación de las muestras. La utilización de tubos adecuados y agitación inmediata a la extracción para evitar la coagulación de la sangre; la preservación de la muestra al mantener la cadena de frío y la realización de la extracción de ADN lo antes posible, son procedimientos recomendados para obtener un buen rendimiento de extracción de ADN (Promega corporation, 2005).

## **B. PCR heptuplex, cuádruplex y quintuplex**

Se logró amplificar 11 de los 12 exones seleccionados, distribuidos en dos PCRs. La selección de los exones a amplificar en cada reacción en base a tamaño del amplicón permitió su observación en geles de agarosa. Así, se obtuvieron combinaciones a modo de abarcar cuatro exones (cuádruplex) en una PCR y siete exones (heptuplex) en la otra, ya que no se logró integrar el exón 3 en una PCR quintuplex.

Se realizó la amplificación de los exones 13, 43, 49 y 48 mediante la PCR cuadruplex. La amplificación de los exones 4, 44, 12, 8, 17, 19 y 45 se hizo en la PCR heptuplex (Cuadros 8 y 9, véase Apéndice 12). En el Gráfico 10 se presentan las electroforesis en gel de agarosa de ambas reacciones de amplificación.

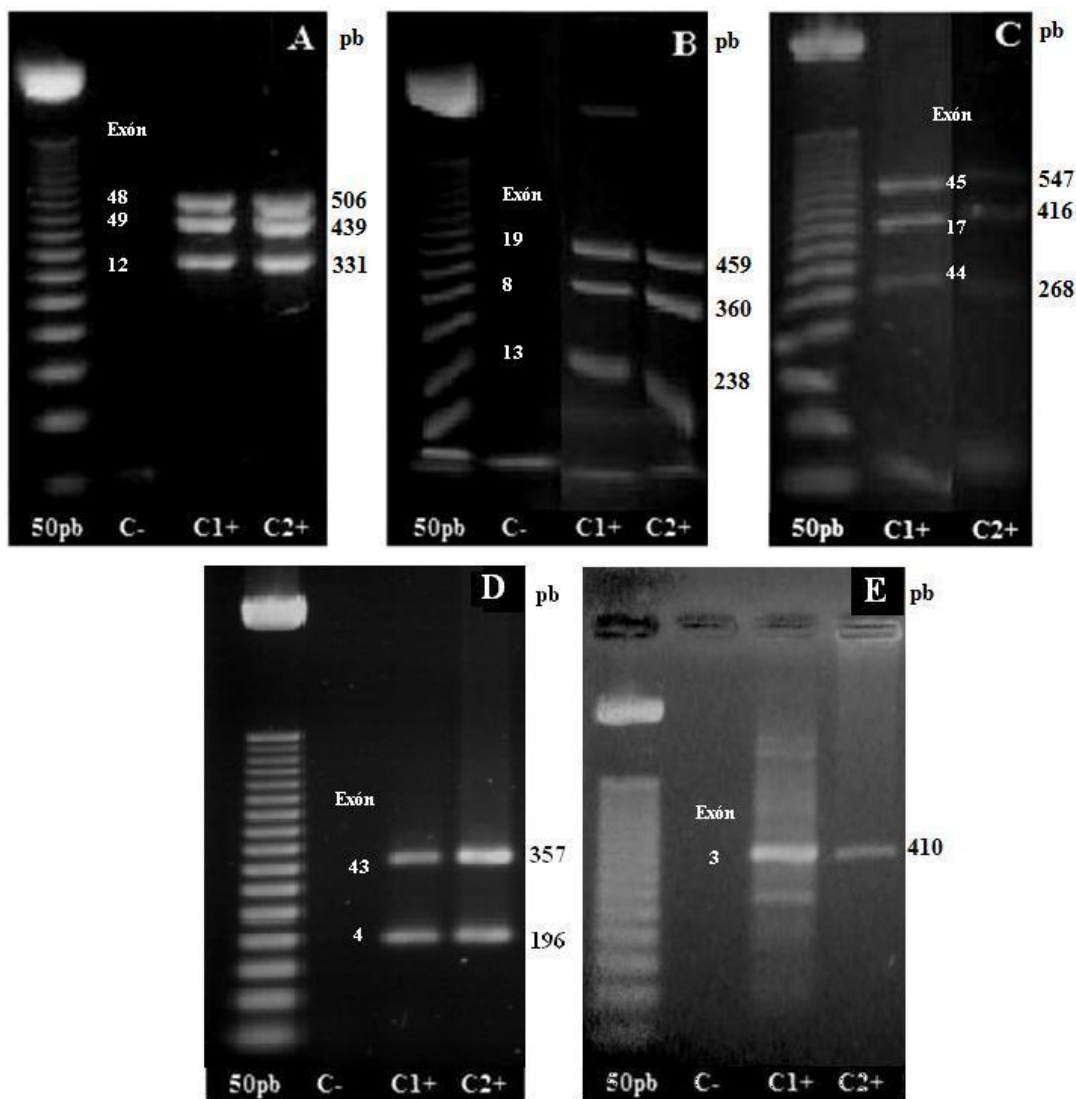


**Gráfico 10 – Amplificación de 11 exones mediante PCR heptuplex y cuadruplex.** Geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. (A) Amplificación de exones 4 (296 pb), 44 (263 pb), 12 (331 pb), 8 (360 pb), 17 (416 pb), 19 (459 pb) y 45 (547 pb). (B) Amplificación de exones 13 (238 pb), 43 (357 pb), 49 (249 pb) y 48 (506 pb).

Se estandarizó un método para la amplificación de los 11 exones utilizando el mismo programa de termociclador y dos mezclas de reacción distintas. Esto reduce el consumo de reactivos, muestra y tiempo, en comparación con lo que se consumiría en caso de analizar los 12 exones de manera individual.

### C. PCR duplex y triplex

Se logró la amplificación de 9 de los 12 exones en PCRs triplex (Gráfico 11). Asimismo, se realizaron combinaciones de PCR duplex para determinar si era posible obtener una amplificación de los exones escogidos para cada reacción de PCR triplex, agrupándolos en pares (Gráfico 16, véase Apéndice 7). Aunque no fue posible obtener el producto de amplificación del exón 3, 4 y 43 mediante PCR triplex, sí fue posible hacerlo en una PCR individual del exón 3 y una PCR duplex de los exones 4 y 43 (Gráfico 11).



**Gráfico 11 – Amplificación de exones mediante PCR triplex y duplex.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% en TAE 1x, teñido con bromuro de etidio. Amplificación de (A) exones 12 (331 pb), 48 (506 pb) y 49 (439 pb); (B) exones 8 (360 pb), 13 (238 pb) y 19 (459 pb); (C) exones 17 (416 pb), 44 (439 pb) y 45 (547 pb); (D) exones 4 (196 pb) y 43 (357 pb) y (E) exón 3 (410 pb). La primera columna de cada imagen corresponde a una escala de 50 pb (Promega).

Adicionalmente a la PCR cuadruplex y heptuplex, se agruparon los exones en PCRs triplex, con el fin de utilizarlas para confirmar la ausencia de algún exón que no presente una amplificación bien definida. Al igual que en las PCRs heptuplex y cuadruplex, con la estandarización de PCRs triplex no hubo necesidad de estandarizar las PCRs con cada exón individualmente, lo que habría resultado en un mayor consumo de reactivos y tiempo. Con una PCR triplex o duplex es posible confirmar la presencia o ausencia de producto de amplificación de dos o tres exones simultáneamente.

No fue posible amplificar el exón 3 en PCR multiplex debido a la competencia de amplificación entre los exones combinados: competencia por reactivos, enzima e incluso, espacio físico dentro de la reacción. Mientras mayor cantidad de cebadores se encuentre en la mezcla de reacción, tanto la plantilla de ADN como los dNTPs pueden verse limitados durante la extensión de los cebadores. De igual forma, la cantidad de enzima agregada puede ser insuficiente para amplificar un mayor número de amplicones. Si algún par de cebadores en la reacción requiere de condiciones más restringidas que el resto, la competencia podría disminuir, o incluso, impedir completamente su amplificación. En este estudio se encontró que el exón 3 requiere de condiciones más específicas que los demás para su amplificación y por consiguiente, únicamente se obtuvieron productos de amplificación en una PCR individual. Sin embargo, sería adecuado lograr la amplificación simultánea del exón 3 en una PCR multiplex, ya que la incapacidad de amplificarlo junto a otros impide confirmar si realmente está presente o ausente en una muestra, o si la amplificación no se logra por causa de otros factores.

Para la amplificación del exón 3 en una PCR multiplex se recomienda modificar las condiciones, reactivos y programa de la reacción, de manera que favorezcan la amplificación del exón, sin perjudicar los resultados del resto de los exones. Por el momento, para confirmar la amplificación del exón 3, se recomienda la evaluación de este en duplicado o triplicado.

#### **D. Efecto de los componentes en la mezcla de reacción**

**1. Cloruro de magnesio y polimerasa.** Tanto la concentración de la enzima polimerasa como la de su cofactor ( $MgCl_2$ ) influyen en la obtención de los resultados, de modo que al aumentar la concentración de alguno de estos se favorece la amplificación. En

el caso de reacciones multiplex, este efecto es generalizado para la totalidad de los exones, no para uno específico. Sin embargo, concentraciones muy altas de estos dos componentes también pueden favorecer la amplificación de productos no específicos.

En este estudio, para la estandarización de las reacciones se partió de la concentración de  $MgCl_2$  recomendada por el fabricante (2.5 mM), realizando modificaciones al aumentar y disminuir esta concentración inicial. Se observó que la disminución de la concentración elimina la amplificación de los productos inespecíficos; no obstante, también puede disminuir la efectividad en la amplificación del producto esperado (Gráfico 20, véase Apéndice 13).

Por otra parte, se observó que el aumento en la concentración de polimerasa tiene un efecto similar al del  $MgCl_2$ . Sin embargo, la utilización de mayor cantidad de la enzima implica un mayor costo, por lo que se recomienda modificar la concentración de  $MgCl_2$ , con la menor concentración de polimerasa posible. Finalmente, se observó que una adecuada combinación de ambos componentes puede aumentar rendimiento de amplificación y disminuir especificidades (Gráfico 20).

**2. Cebadores y dNTPs.** En todas las reacciones se inició con una concentración equimolar de los cebadores utilizados. En algunos casos, esta combinación resultó efectiva, lográndose la amplificación de todos los exones. En los casos en los que no se logró la amplificación de alguno de ellos, se aumentó la concentración de los cebadores dirigidos a su amplificación, al mismo tiempo que se redujo la concentración del resto de los cebadores, principalmente de los que se había obtenido mayor intensidad de amplificación (Henegariu *et al*, 1997) (Gráfico 21, véase Apéndice 13). La actividad de cualquier enzima se ve afectada por la afinidad y concentración de su sustrato (Nelson y Cox, 2000). En este caso, al aumentar la concentración de algún par de cebadores (sustrato) se promueve la actividad de la enzima polimerasa, es decir, se incrementa la amplificación del exón específico.

A diferencia de los resultados de amplificación obtenidos al aumentar cloruro de magnesio o enzima polimerasa, la variación en las concentraciones de cebadores mejora el rendimiento de una forma específica, ya que mejora el rendimiento de un exón particular. De esta forma, al modificar las condiciones de cada exón individualmente, es posible obtener bandas de intensidad similar, lo que facilita el análisis de resultados de la amplificación.

La modificación de la concentración de dNTPs no se consideró como un elemento determinante para aumentar o disminuir la amplificación de exones específicos. Sin embargo, es importante mantener una concentración adecuada dependiendo de la cantidad de amplicones que se esperan, ya que estos componentes pueden constituir el reactivo limitante de la reacción, y por lo tanto, disminuir la amplificación.

Por otra parte, los dNTPs son muy sensibles a ciclos de congelamiento-descongelamiento y tienden a degradarse luego de 4 ó 5 ciclos (Henegariu *et al*, 1997). Por esta razón, se trabajó siempre utilizando alícuotas de volumen pequeño para evitar que esto afectara la amplificación.

**3. Volumen de reacción, plantilla de ADN y solución amortiguadora.** Se utilizaron dos volúmenes de reacción: 25  $\mu$ L para las reacciones simples, duplex y triplex y 50  $\mu$ L para las reacciones heptuplex, quintuplex y cuádruplex, correspondientes a lo recomendado en la literatura consultada (Silva *et al*, 2005; Henegariu *et al*, 1997). Se utilizó mayor volumen para el segundo grupo de reacciones probablemente debido a la mayor cantidad de cebadores agregados y por ende, mayor cantidad de productos esperados. Un volumen mayor implica mayor espacio disponible para que la enzima pueda realizar su trabajo. El efecto del volumen de reacción en las PCRs multiplex no se evaluó en este estudio, por lo que recomienda tomarlo en cuenta en estudios posteriores.

Además de la necesidad de un mayor volumen de reacción, es probable que a mayor número de exones a amplificar se requiera de mayor cantidad de ADN plantilla. Esta suposición se comprobó al observar que una mayor cantidad de plantilla agregada, se mejora el rendimiento de la amplificación (Gráfico 22, véase Apéndice 13)

Al evaluar el efecto de la concentración de la solución amortiguadora, se observó que al aumentar su concentración disminuye la efectividad de la amplificación (Gráfico 22). Se ha demostrado que el aumento de la concentración de solución amortiguadora mejora la amplificación (Henegariu *et al*, 1997); no obstante, se propone utilizar una solución amortiguadora preparada, mientras que la solución utilizada en este estudio es específica para la enzima polimerasa y se adquiere junto con la misma. Esta solución amortiguadora esta optimizada por la casa comercial para dar buenos resultados a concentración 1X (Promega corporation, 2005). La elaboración de una solución amortiguadora incrementa las

posibles fuentes de contaminación y cantidad de trabajo, por lo que se recomienda utilizar el del fabricante a la concentración sugerida.

## **E. Efecto de los componentes del programa de amplificación**

**1. Temperatura de hibridización.** El efecto de los cambios de temperatura se evaluó únicamente en PCRs en las que no se logró una buena amplificación. En todas las reacciones la temperatura de desnaturalización se mantuvo constante, modificando solamente la temperatura de hibridización y extensión. La selección de una adecuada temperatura de hibridización se consideró importante para mejorar la amplificación. Para las reacciones multiplex, se ha reportado que temperaturas de hibridización de 4 a 6 grados centígrados por debajo de la temperatura de hibridización utilizada en reacciones individuales (Henegariu *et al*, 1997, Chamberlain *et al*, 1988). Esta selección fue adecuada para la obtención de resultados en el caso de reacciones triplex, en donde las combinaciones de exones se basaron en la temperatura de hibridización, combinando exones cuyos cebadores tuvieran temperaturas de hibridización similares. Por otro lado, la combinación de exones en reacciones cuadruplex y heptuplex se basó principalmente en el tamaño de los amplicones (Silva *et al* 2004), y por lo tanto, el rango de temperatura de hibridización de los cebadores fue mayor que en las reacciones triplex, por lo que se seleccionaron temperaturas de hibridización menores que las de éstas.

Además, en base a los resultados obtenidos se determinó que en las reacciones multiplex, el aumento de la temperatura puede mejorar el rendimiento de la amplificación de exones que poseen temperaturas de hibridización más altas, pero puede llegar a interferir con la amplificación de exones con temperaturas de hibridización menores (Gráfico 23, véase Apéndice 14).

**2. Duración de cada etapa del programa de amplificación.** Se evaluó la duración de la etapa de extensión de los cebadores, trabajando con 2 y 4 minutos, ya que algunos estudios indican que a mayor tiempo de extensión mejor amplificación de productos con mayor tamaño y, por el contrario, a menor tiempo de extensión, se amplifican mejor los de menor tamaño (Henegariu *et al* 1997). No se encontró diferencia entre la utilización de 2 y 4



minutos, lo que sugiere que se pueden obtener los mismos resultados con cualquiera de los dos.

Otro factor evaluado fue el número de ciclos dentro del programa. Se utilizaron 25 y 30 ciclos, observando que a mayor número de ciclos, se obtiene una mayor intensidad de bandas, por lo que la detección de exones que producen amplicones en menor cantidad, puede aumentarse al utilizar una mayor cantidad de ciclos. Sin embargo, en casos donde todos los exones amplificaron adecuadamente, la disminución del número de ciclos puede ser de utilidad para mejorar la resolución de las bandas al observarlos por electroforesis, ya con una cantidad menor de amplicon, se obtienen bandas más pequeñas y claras (Gráfico 24, véase Apéndice 14).

**3. Termocicladores.** Se utilizaron dos termocicladores diferentes, obteniendo con ambos la amplificación de los productos esperados; sin embargo, las amplificaciones realizadas con el termociclador PTC presentan una mayor intensidad en comparación con aquellas obtenidas con el termociclador *GeneAmp 9700*. El hecho que ambos aparatos produzcan amplificación, además de indicar que funcionan adecuadamente bajo las condiciones anteriormente indicadas, las reacciones son lo suficientemente robustas para ser efectuadas en diferentes equipos (Gráfico 25, véase Apéndice 14).

## **F. Electroforesis y tinción de geles**

Se obtuvo una apropiada separación de los resultados bajo las siguientes condiciones: geles de agarosa al 3% en solución amortiguadora TAE 1X y 6  $\mu$ L de cada producto de PCR mezclado con 1  $\mu$ L de buffer de carga 6X y separación a 80V durante 45 y 90 min.

Se observó que durante la preparación del gel, el calentamiento durante un tiempo adecuado (2 a 3 minutos) con agitación es necesario para homogenizar bien la mezcla. De igual forma, verter inmediatamente la mezcla en la cámara de electroforesis evita que se inicie la polimerización antes de tiempo, la cual, debido a la alta concentración de agarosa, se da más rápidamente. En el caso contrario, se obtuvieron separaciones irregulares que dificultaron la interpretación de los resultados (Gráfico 26, véase Apéndice 15).

Además de una adecuada preparación del gel de agarosa, la selección del voltaje y tiempo fue importante para una buena separación. La combinación de ambos dio lugar a una

mayor resolución y por lo tanto, una observación más precisa de los resultados. Se observó que un voltaje de 80 V produce una separación más lenta de las bandas, pero incrementa la resolución. Por el contrario, la utilización de voltajes más elevados (100 a 110 V) disminuye la resolución, produce una separación distorsionada y dificulta la observación de resultados. Puesto que un menor voltaje realiza la separación de forma más lenta, un tiempo de separación muy corto no es suficiente para separar las bandas adecuadamente. Así también, un tiempo demasiado grande causa efectos similares a los de utilizar voltajes altos (Gráfico 27, véase Apéndice 15). Con base a lo anterior, se recomienda utilizar 80 V durante 90 minutos para obtener una buena resolución de resultados. También se determinó que un mayor volumen de muestra cargado en el gel aumenta la intensidad de las bandas, pero al mismo tiempo disminuye la resolución (Gráfico 27).

Se determinó que la tinción puede realizarse efectivamente antes y después de la electroforesis. Para el método de tinción luego de la electroforesis se determinó que el tiempo adecuado de tinción es de 7 minutos en solución de bromuro de etidio 0.1 mg/mL y 15 minutos para el lavado en agua, ambos con agitación constante. La utilización de menores tiempos de lavado resulta en un fondo brillante que dificulta la observación de bandas (Gráfico 28, véase Apéndice 15).

A diferencia del la tinción después de la electroforesis, la tinción previa evita el proceso de lavado; sin embargo, con ésta se contamina más área, equipo y materiales (área donde se realiza electroforesis, cristalería donde se prepara el gel, cámara, buffer, pipetas, puntas, etc.) con bromuro de etidio. En cambio, con la tinción posterior a la electroforesis únicamente se contamina el área de tinción (bandejas para tinción y espátulas). Adicionalmente, con éste método la solución de bromuro de etidio puede rehusarse (hasta 25 veces) y por lo tanto, disminuirse la cantidad de desechos. La resolución de las bandas alcanzada por tinción previa es mejor, pero esto es igualable por el otro método de tinción si se manejan bien las condiciones de corrida y de tinción.

En pocas ocasiones se discute acerca de la tinción de los geles de agarosa; no obstante, esta etapa del procedimiento también debe ser optimizada, ya que si la observación de resultados no es la adecuada, puede conducir a la detección de falsos positivos o negativos, aunque la extracción y la PCR se hayan realizado correctamente.

## **G. Otras consideraciones**

Ninguno de los factores mencionados anteriormente es independiente, es decir, cualquier modificación probablemente demande la modificación de otro factor. Es la combinación de estos factores lo que permite llegar a las condiciones bajo las cuales se pueden obtener resultados confiables, sensibles, específicos y reproducibles.

Adicionalmente a estos factores existen otros que deben considerarse para obtener buenos resultados. El manejo adecuado de reactivos y muestras es de gran importancia, sobre todo en los casos en que se requieran condiciones especiales de temperatura e iluminación.

La utilización de controles junto con las muestras es importante para asegurar la confiabilidad de los resultados: un control negativo interno permite verificar que no hay contaminación de ADN en ninguno de los reactivos y materiales utilizados, mientras que un control positivo permite evaluar la amplificación de cada exón. Durante la estandarización del método propuesto se utilizaron como controles positivos dos muestras de individuos sanos que no presentaban historial familiar de distrofias, y por lo tanto se esperaba que en estos casos se amplificaran todos los exones. El uso de este tipo de control posee la desventaja que la muestra es limitada y no es posible adquirir una muestra idéntica, aunque provenga del mismo individuo. Valdría la pena considerar el uso de un control más seguro, como clones de las secuencias a amplificar, o productos de PCR de todos los exones purificados. Otro modo de obtener resultados más confiables es la utilización de un control interno de amplificación, el cual es necesario para asegurar que las condiciones de la reacción son propicias para dar lugar a la amplificación. En este estudio no se utilizó un control interno ya que al combinar más de par de cebadores a la vez, la observación de al menos uno de los productos indica que las condiciones son adecuadas para permitir la amplificación; sin embargo, en estudios posteriores, se sugiere la utilización de un gen constitutivo.

## **H. Amplificación de muestras de individuos con síntomas y sus familiares**

La estandarización del método para la detección de 12 exones del gen de la distrofina se realizó utilizando dos muestras de individuos sanos, obteniendo, como era de esperar, la amplificación de todos los exones. Asimismo, se analizaron los 12 exones en individuos con síntomas de DMD o DMB y sus familiares femeninos, obteniendo la amplificación de 11

exones (Gráfico 25, véase Apéndice 14), lo que indica que no existen deleciones en el área específica de unión de los cebadores a estos exones. No se detectó amplificación del exón 44 por PCR triplex en dos muestras de familiares (Gráfico 29), pero este exón también fue amplificado por la PCR heptuplex, donde sí se obtuvieron productos de amplificación correspondientes al mismo, descartándose la posibilidad de una deleción en el sitio de unión de los cebadores al exón en estas dos muestras. De igual manera, no se obtuvo producto de amplificación del exón 3 en una muestra de individuo con síntomas y una muestra de familiar (Gráfico 29), que corresponde una de las muestras que no presentó producto de amplificación del exón 44. Esto evidencia la necesidad de una PCR de confirmación para cualquier aparente deleción detectada, ya que en el caso del exón 3, no fue posible confirmar con otra PCR esta deleción, que pudo deberse a otros factores como ocurrió en el caso del exón 44. Por todo esto, se recomienda incluir el exón 3 en una PCR multiplex para tener una prueba confirmatoria de cualquier deleción observada.

En el caso de los familiares femeninos se ha reportado que la técnica de PCR multiplex no es 100% efectiva para la detección de las deleciones debido a que las portadoras asintomáticas son heterocigotas para la deleción que presentan, por lo que siempre hay amplificación, aunque puede ser de menor intensidad (Silva *et al*, 2005). Esto no se evaluó en este estudio debido a que el número de muestras no fue suficiente.

En este estudio se trabajó con una muestra de tamaño muy pequeño, por lo que se asume que no tiene significancia estadística, por lo que el hecho que el 20% (2 de 10) de las muestras analizadas presentara aparentes deleciones no puede generalizarse a la población. La utilización de muestras de individuos con síntomas y sus familiares con la técnica optimizada se llevo a cabo para comprobar si era posible la aplicación de la misma en el estudio de la enfermedad. Se determinó que sí es posible amplificar estos 12 exones en individuos sanos, individuos con síntomas y sus familiares femeninos.

Con la técnica optimizada, este trabajo no sólo constituye el inicio del estudio de DMD y DMB en Guatemala, sino también, sienta las bases para el diagnóstico de ambas enfermedades mediante métodos moleculares. Además de los 12 exones evaluados en este estudio, existen seis exones más con alta tasa de mutación en el gen *distrofina* (Chamberlain *et al*, 1988), los cuales pueden ser objeto de estudio en un futuro y proporcionar información importante para conocimiento de la enfermedad.

## VIII. CONCLUSIONES

- No se encontró una diferencia significativa entre los dos métodos de extracción utilizados con respecto al rendimiento y la pureza de las extracciones. Adicionalmente, estos métodos presentaron una eficiencia similar en cuanto a su utilización en PCR.
- Se determinó que aunque el método salino tiene un menor costo por extracción en comparación al método que utiliza por kit comercial, ambos pueden utilizarse obteniendo resultados similares.
- Se optimizó la amplificación de 11 exones por medio de una PCR heptuplex y una cuadruplex. Además, se lograron amplificar los mismos exones mediante 3 PCRs triplex y una duplex. No fue posible integrar el exón 3 en una reacción multiplex; sin embargo fue posible amplificarlo y analizarlo de forma individual.
- Durante la estandarización de PCR multiplex es importante considerar ciertos factores que pueden ser determinantes en la obtención de resultados. Se determinó que el tamaño del amplicón y la temperatura de hibridización son factores que deben tomarse en cuenta para la selección de las posibles combinaciones en PCR multiplex. Se determinó que la modificación de la concentración de polimerasa, cloruro de magnesio, cebadores de cada exón o la cantidad de plantilla de ADN agregado puede afectar los resultados de amplificación. Se determinó que para el diseño del programa de amplificación se debe considerar la temperatura de hibridización y el número de ciclos.
- Al analizar muestras de individuos con síntomas y sus familiares femeninos, se determinó que las PCRs optimizadas amplificaron eficazmente los 12 exones en estudio.
- Se detectaron aparentes deleciones del exón 3 en dos muestras, una de individuo con síntomas y otra de familiar, sin embargo éstas no fueron confirmadas por otra PCR.

- Por medio de este estudio fue posible la estandarización de dos grupos de PCRs multiplex que abarcan 11 exones cada uno, con lo cual es posible estudiar la presencia de deleciones con un grupo y confirmarlas con el otro.

## IX. RECOMENDACIONES

- Conservar adecuadamente las muestras de sangre, manteniendo la cadena de frío. Además se recomienda extraer el ADN lo antes posible mediante el método salino no enzimático para optimizar los recursos.
- Optimizar reacciones multiplex que incluyan al exón 3. También se recomienda realizar nuevas combinaciones de reacciones multiplex.
- Optimizar reacciones multiplex que involucren otros exones del gen *distrofina* que poseen alta tasa de mutación
- Aumentar el número de muestras de individuos con síntomas y sus familiares y crear una base de datos de las deleciones más comunes presentes en la población guatemalteca.
- Indagar sobre otros posibles análisis para la DMD y DMB, como la detección temprana, detección de individuos portadores, e incluso la detección previa a la fecundación.

## X.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Arahata, K., *et al.* 1989. «Dystrophin diagnosis: Comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses (Duchenne muscular dystrophy/Becker muscular dystrophy)» *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 7154-7158

Bakker, E., *et al.* 1997. «*Duchenne and Becker Muscular Dystrophies.*» en *Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders* de Emery, A. (ed.). 2ª ed. Inglaterra, Royal Society of Medicine Press Limited. págs, 1-4.

Baruch A y D. Herrington. 1996. «Applied physiology for the frustrated phlebotomist» (Letter to Editor). *Am J Med.* 100: 121.

Beggs, A. H., *et al.* 1990. «Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction» *Hum Genet.* 86 (1): 45-48.

Bestard, Jennifer. 2000. «Dystrophin gene regulation in muscle» *Tesis para optar al grado de Master en Ciencias del departamento de Biofísica médica de la Universidad de Toronto.* National library of Canada. 106 págs.

Brown, Terence Austen. 2001. «*Gene Cloning and DNA Analysis, an Introduction*» 4ª ed. Blackwell Science Ltd. Inglaterra. 363 págs.

Bulman, D. E., *et al.* 1991. «Differentiation of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Phenotypes with Amino- and Carboxy-Terminal Antisera Specific for Dystrophin» *Am. J. Hum. Genet.* 48: 295-304.



Cabrera, Julio. 2006. Comunicación personal. Hospital General San Juan de Dios. Zona 1, ciudad de Guatemala, departamento de Guatemala, Guatemala, CA.

Calderón, Carlos. 2006. Comunicación personal. Clínicas de las Obras Sociales del Hermano Pedro. Antigua Guatemala, Sacatepéquez, Guatemala, CA.

Campbell, K. 1995. «Three Muscular Dystrophies: Loss of Cytoskeleton-Extracellular Matrix Linkage» *Cell*. 80: 675-679.

Chamberlain, J. S., *et al.* 1988. «Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification» *Nucleic Acids Res.* 16: 11,141-11,156

*Custom primers.* 2007. Invitrogen life technologies. Estados Unidos. [Visitado 01 de Agosto 2007] Disponible en: <http://www.invitrogen.com>

Do, Twee. Actualizada el 30 de marzo del 2007. «Muscular Dystrophy» *e-medicine. Web MD.* [Visitado 02 de Agosto 2007] Disponible en: <http://www.emedicine.com/orthoped/topic418.htm>

Dunant, P. 2003. «Strategies for Molecular Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy» *Tesis para optar al grado de Doctorado en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Ludwig-Maximilian.* München, Alemania. 97 págs.

*Eppendorf Biophotometer® short operating instructions.* 2007. Eppendorf North America. [Visitado 04 de Agosto 2007] Disponible en: <http://www.eppendorfnna.com/manuals/manuals-BS.asp#BioPhotometer>

Glasel J. 1995. «Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios» *BioTechniques*. 18: 62-63.

González, N. C., *et al.* 2004. «Identificación de deleciones en el gen DMD mediante PCR múltiple en pacientes mexicanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker» *Rev med hosp general de México*. 67 (4):196-202.

Green, E. 2006. «The Dystrophin Story» Brenner Research Group, UC Berkeley. [Visitado 04 de Agosto 2007] Disponible en: <http://compbio.berkeley.edu/people/ed/rust/Dystrophin.html>

Hauser, M. A. y J. S. Chamberlain. 1996. «Progress towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy» *Journal of Endocrinology*. 149: 373–378.

Henegariu O., *et al.* 1997. «Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol» *BioTechniques*. 23 (3): 504-511.

Hernandez R., P. y C. M. Restrepo. 2002. «Identificación de deleciones en afectados de distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/DMB) y diagnóstico de portadoras por metodologías moleculares» *Universitas Scientiarum*. 1 (1).

Hussey, N., *et al.* 1999. «Analysis of five Duchenne muscular dystrophy exons and gender determination using conventional duplex polymerase chain reaction on single cells» *Mol Hum Reprod*. 5 (11): 1089-1094.

Lahiri D. K., y J. I. Nurnberger, Jr. 1991. «A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies» *Nucleic Acids Res*. 19 (19): 5444.

Maza, Erwin. 2007. Comunicación personal. Departamento de medicina interna, Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Sacatepéquez, Guatemala. CA.

Mellion, M. L. y J. M. Gilchrist. Actualizada el 10 de Julio de 2006. «Dystrophinopathies» *e-medicine. Web MD*. [Visitado 02 de Agosto 2007] Disponible en: <http://www.emedicine.com/neuro/topic670.htm>

Michele, D. E. y K. P. Campbell. 2003. «Dystrophin-glycoprotein complex: Post-translational processing and dystroglycan function» *J Biol Chem*. 278 (18):15457-15460.

Nelson, D. L. y M. M. Cox. 2000. «Lehninger principles of biochemistry» 3<sup>a</sup> ed. Worth publishers. Estados Unidos. 1152 págs.

Pértega Díaz S. y S. Pita Fernández. 2001. «Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. t de Student» *Cat Aten Primaria*. 8: 37-41. [Visitado 02 de Agosto 2007] Disponible en: [http://www.fisterra.com/mbe/investiga/t\\_student/t\\_student2.pdf](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/t_student/t_student2.pdf)

Pestronk, A. Actualizado 1 de mayo de 2007. «Dystrophinopathies» *Neuromuscular Disease Center, Washington University*. [Visitado 02 de Agosto 2007] Disponible en: <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/musdist/dmd.html#cardiomyopathy>

Rodríguez, M., *et al.* 1996. «Diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne mediante análisis del ácido desoxinucleotico y su aplicación en la prevención» *Rev Cubana Pediatr*. [online]. 68, (1): 10-20. [Visitado 02 Agosto 2007] Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75311996000100003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75311996000100003&lng=es&nrm=iso). ISSN 0034-7531.

Sancho, V., *et al.* 2006. «Tamizaje de deleciones en pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD) o Becker-Kiener (BMD) mediante PCR Multiplex en Costa Rica, 1998-2000» *Acta pediátr costarric.* [online]. 15 (2): 78-85. [Visitado 01 Agosto 2007] Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00902001000200006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00902001000200006&lng=es&nrm=iso)

Scheinert, P., *et al.* 2007. «Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®» Eppendorf. North America. [Visitado 04 Agosto 2007] Disponible en: [http://www.eppendorfnna.com/applications/PCR\\_appl\\_protocolsMC.asp](http://www.eppendorfnna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp)

Silva, C., *et al.* 2004. «Deleciones en el gen de la distrofina en 62 familias colombianas: correlación genotipo-fenotipo para la distrofia muscular de Duchenne y Becker» *Colombia Médica* (35): 191-198.

Silva, C., *et al.* 2005. «Distrofia muscular de Duchenne y Becker, una visión molecular» *Acta médica colombiana.* 30 (3): 112-116

Singh, R. y M. Kabra. 2006. «Multiplex PCR for rapid detection of exonal deletions in patients of Duchenne muscular dystrophy» *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 21(1): 147-151.

Warburg, O., W. Christian. 1942. «Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase» *Biochem Z.* 310: 384-421.

Wizard® Genomic DNA purification kit: Technical manual. 2005. Promega Corporation.

Zellweger, H. y A. Antonik. 1975. «Newborn screening for Duchenne Muscular Dystrophy» *Pediatrics.* 55: 30-34

# **XI. APÉNDICE**

## **APÉNDICE 1. Consentimiento informado**

### **CONSENTIMIENTO**

#### **Detección de deleciones exonales asociadas a las distrofias musculares de Duchenne y de Becker en Guatemala, mediante la reacción en cadena de la polimerasa en múltiplex.**

##### **Antecedentes**

Las distrofias musculares de Duchenne y Becker son enfermedades que afectan los músculos, especialmente los involucrados en los movimientos como caminar, correr, entre otros. Estas enfermedades se deben a defectos en el gen que posee la información para la producción de la proteína distrofina, que es importante para la estructura de los músculos. En este estudio se analizarán estos defectos genéticos tanto en pacientes afectados por estas distrofias como en sus familiares femeninas (especialmente madre y hermana). Es importante no solo analizar al paciente sino también a sus familiares ya que en la mayoría de casos (no en todos), el defecto genético es hereditario, y las mujeres acarrean este defecto sin padecer la enfermedad.

##### **Información importante**

Para este estudio se recolectarán muestras de sangre, tanto en pacientes que padecen una de estas distrofias, como en 2 familiares femeninas del paciente. Estas muestras se utilizarán para el análisis del gen de la distrofina y para la determinación de la concentración de la enzima creatinfosfoquinasa (CPK), que es un indicador bioquímico del padecimiento de estas enfermedades.

A los pacientes que padecen una de estas distrofias se les realizará un electrocardiograma y un ecocardiograma, con el fin de correlacionar los defectos genéticos con alteraciones de la función cardíaca.

A cada una de las muestras de sangre se le asignará un código antes de ser analizada y únicamente se utilizarán para este estudio.

No se entregarán resultados individuales a terceras personas sin la autorización del paciente.

##### **Procedimientos**

- Se extraerá una muestra de sangre de aproximadamente 5mL de su brazo, en una sola punción.
- Si ha sido clínicamente diagnosticado con una de estas distrofias, se le realizará un electrocardiograma y se le dará una cita para que se realice un ecocardiograma. Si es un familiar femenino del paciente, no se le realizarán estos exámenes.
- Se solicitará que complete (o se le ayudará a completar) un cuestionario sobre su historia médica y familiar.

**Potenciales riesgos e incomodidades**

Posiblemente tendrá una pequeña molestia y/o hematoma causados por la extracción de sangre, los cuales desaparecerán después de unos días.

Existe el riesgo que al compartirle los resultados, usted escuche información no deseada; o bien, es posible que la información que escuche únicamente confirme su situación actual.

**Potenciales beneficios**

Proporcionarle, por primera vez, un diagnóstico certero de distrofia muscular de Duchenne o de Becker.

Informar a los pacientes que padecen alguna de estas distrofias si tienen algún indicio de enfermedad cardiaca.

Informar a las familiares femeninas sobre los potenciales riesgos de ser portadora de estos defectos genéticos.

Ofrecer consejo genético a las familias afectadas por estas enfermedades.

**Este estudio no tiene ningún costo para usted**

**AUTORIZACIÓN**

Su firma en este formulario indica que ha recibido toda la información sobre el estudio, que sus preguntas han sido respondidas y que acepta voluntariamente participar en él.

Se le dará una copia del formulario para su información. Después de firmarlo, si por algún motivo desea dejar el estudio, puede ponerse en contacto con el personal del proyecto para suspender su participación.

Nombre	Firma	Fecha
Nombre del representante legal o pariente cercano	Firma	Fecha

Si usted desea contactar al personal encargado del estudio, puede comunicarse a los teléfonos 2472-4053 al 55, extensión 279, o avocarse a Obras Sociales del Hermano Pedro para que le informen cómo contactarlos.

## APÉNDICE 2. Protocolo de extracción de ADN de kit Wizard® Genomic DNA purification kit



**Gráfico 12 – Procedimiento kit comercial.** Metodología para la extracción de ADN utilizando el kit comercial Wizard Genomic DNA purification kit. Extracción a partir de un volumen de Muestra de 300 µL o 1 mL de sangre completa. (Promega corporation, 2005)

**APÉNDICE 3. Método de extracción de ADN salino no enzimático****Cuadro 3**

Reactivos utilizados para la extracción de ADN por el método salino no enzimático.

Reactivos
Tris-HCl 0.1 M pH 7.6
KCl 0.1 M
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M
EDTA 0.1 M
SDS 10%
H <sub>2</sub> O estéril
NaCl 3 M
Etanol absoluto
Etanol 70%
Triton x-100



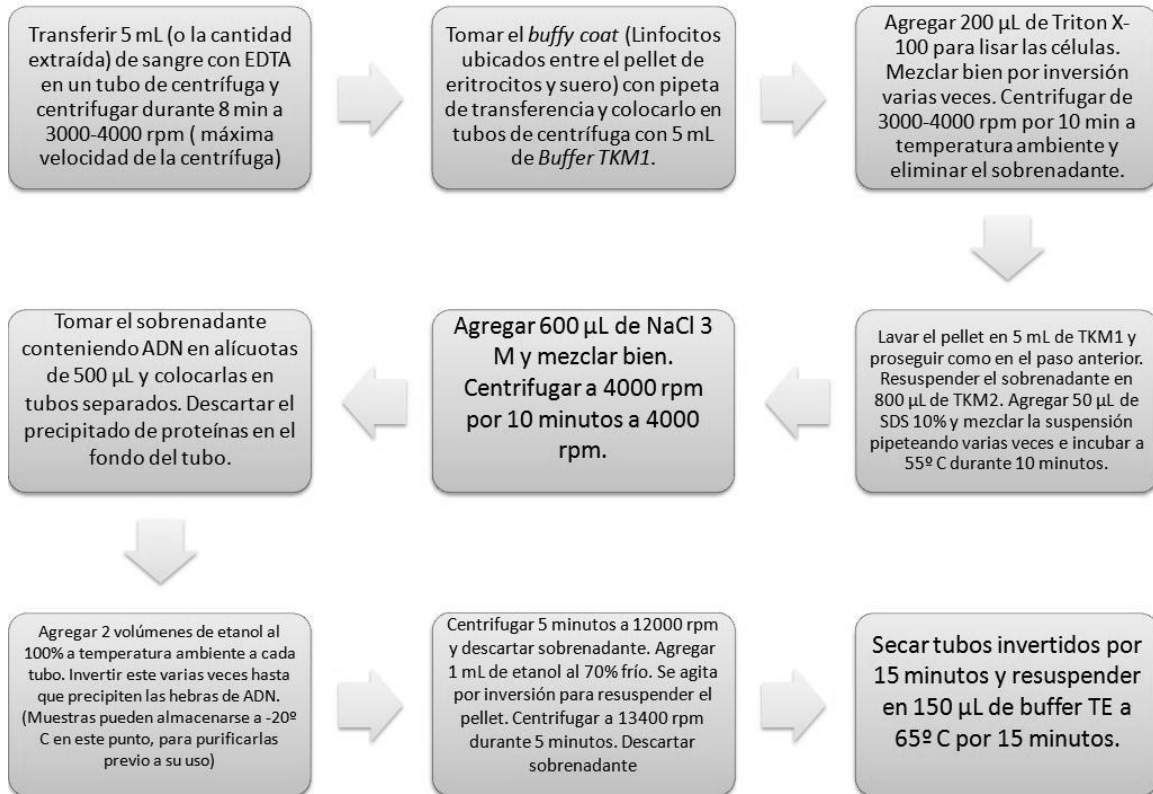
**Cuadro 4**

Preparación de soluciones amortiguadoras utilizadas en extracción salina no enzimática

Reactivo	Concentración inicial	Volumen a agregar	Concentración final
Buffer Low-Salt (TKM1) – Para 1 muestra (2 volúmenes de 5 mL)			
Tris-HCl pH 7.6	0.1 M	1 mL	10 mM
KCl	0.1 M	1 mL	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	0.1 M	1 mL	10 mM
EDTA	0.1 M	200 µL	2 mM
H <sub>2</sub> O estéril		6.8 mL	
Buffer High salt (TKM2) – Para 1 muestra (Volumen de 1 mL)			
Tris-HCl	0.1 M	100 µL	10 mM
KCl	0.1 M	100 µL	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	0.1 M	100 µL	10 mM
NaCl	3 M	133.33 µL	0.4 M
EDTA	0.1 M	20 µL	2 mM
H <sub>2</sub> O estéril		546.67 µL	
Buffer TE – Para un volumen de 500 µL (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8)			
Tris-HCl	0.1 M	50 µL	10 mM
EDTA	0.1 M	5 µL	1 mM

Llevar a pH 8 con NaOH

Fuente: Lahiri y Nurnberber, 1991



**Gráfico 13 – Procedimiento método salino no enzimático.** Metodología utilizada para la extracción de sangre por medio del método salino no enzimático, a partir de los linfocitos de sangre periférica (Modificado de Lahiri y Nurnberger, 1991).

## APÉNDICE 4. Procedimiento para cuantificación de ADN doble hebra en Biophotometer®

### Procedimiento para Medir ADNdh

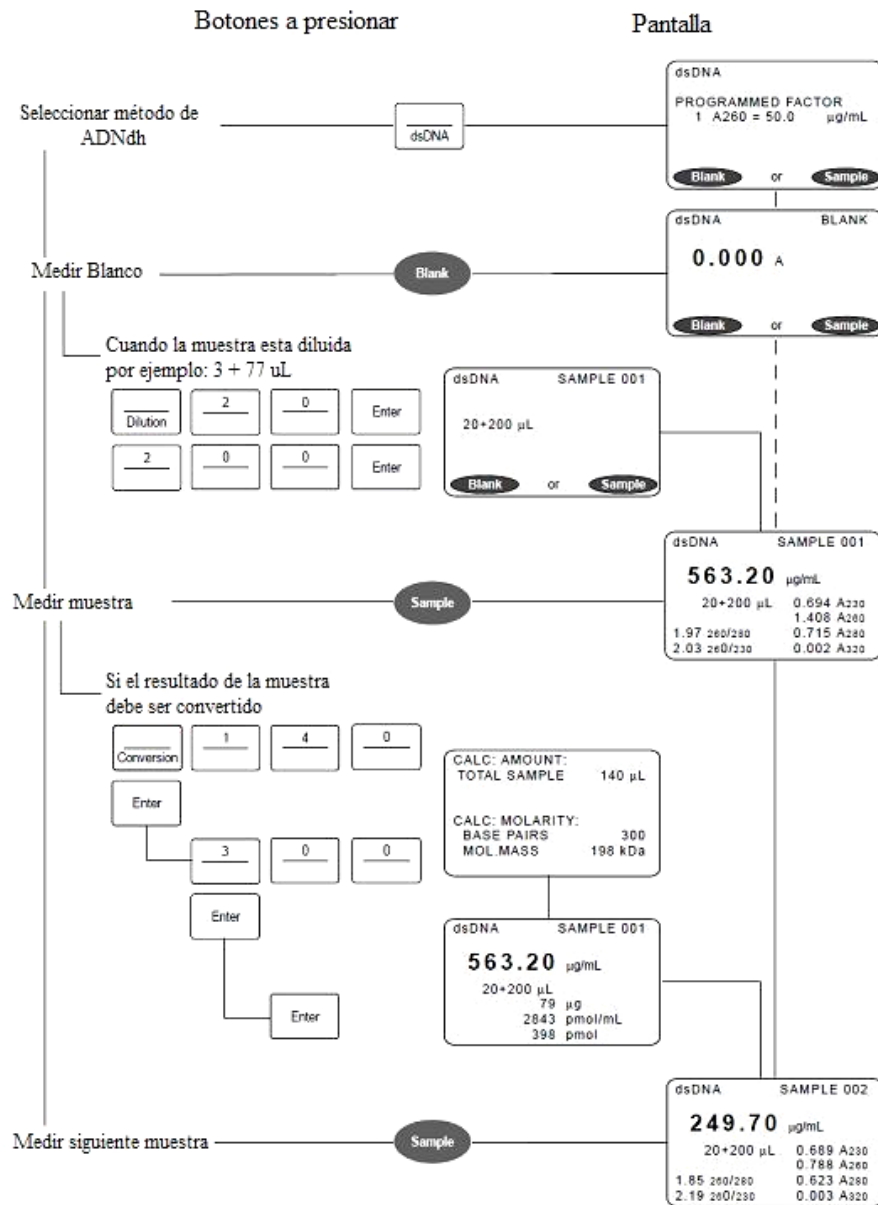


Gráfico 14 – Diagrama de flujo para el uso del Biophotometer® (Modificado de Eppendorf, 2006)

## APENDICE 5. Exones estudiados y cebadores a utilizar

**Cuadro 5**

Secuencia de cebadores a utilizar con cada exón, temperatura de hibridización (T<sub>m</sub>) de cada uno y tamaño del amplicon a obtener por PCR.

Exón	Nombre	Secuencia	T <sub>m</sub> (° C)	Amplicon
45	45F	5' – AAA CAT GGA ACA TCC TTG TGG GAC - 3'	65	547 pb
	45R	5' – CAT TCC TAT TAG ATC TAT CGC CCT AC – 3'	62	
48	48F	5' – TTG AAT ACA TTG GTT AAA TCC CAA CAT G – 3'	65	506 pb
	48R	5' – CCT GAA TAA AAG TCT TCC TTA CCA CAC – 3'	62	
49	49F	5' – GTG CCC TTA TGT ACC AGG CAG AAA TTG – 3'	68	439 pb
	49 R	5' – GCA ATG ACT CGT TAA TAG CCT TAA GAT C – 3'	63	
43	43F	5' – GAA CAT GTC AAA GTC ACT GGA CTT CAT GG – 3'	69	357 pb
	43R	5' – ATA TAT GTT GTT ACC TAC CCT TGT CGG TCC – 3'	66	
44	44F	5' – CTT GAT CCA TAT GCT TTT ACC TGC A – 3'	63	268 pb
	44R	5' – TCC ATC ACC CTT CAG AAC CTG ATC T – 3'	66	
19	19F	5' – TTC TAC CAC ATC CCA TTT TCT TCC A – 3'	65	459 pb
	19R	5' – GAT GGC AAA AGT GTT GAG AAA AAG TC – 3'	63	
3	3F	5' – TCA TCC ATC ATC TTC GGC AGA TTA AA – 3'	67	410 pb
	3R	5' – CAG GCG GTA GAG TAT GCC AAA TGA AAA TCA – 3'	71	
8	8F	5' – GTC CTT TAC ACA CTT TAC CTG TTG AG – 3'	60	360 pb
	8R	5' – GGC CTC ATT CTC ATG TTC TAA TTA G – 3'	60	
13	13F	5' – AAT AGG AGT ACC TGA GAT GTA GCA GAA AT – 3'	61	238 pb
	13R	5' – CTG ACC TTA AGT TGT TCT TCC AAA GCA G – 3'	65	
17	17F	5' – GAC TTT CGA TGT TGA GAT TAC TTT CCC – 3'	63	416 pb
	17R	5' – AAG CTT GAG ATG CTC TCA CCT TTT CC – 3'	66	
12	12F	5' – GAT AGT GGG CTT TAC TTA CAT CCT TC	60	331 pb
	12R	5' – GAA AGC ACG CAA CAT AAG ATA CAC CT – 3'	64	
4	4F	5' – TTG TCG GTC TCC TGC TGG TCA GTG – 3'	70	196 pb
	4R	5' – CAA AGC CCT CAC TCA AAC ATG AAG C – 3'	67	
	PMF	5' – AAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG - 3'	-	535 pb
	PMR	5' – TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCCAGATCTGAGTCC – 3'	-	

Fuente: Chamberlain *et al*, 1988; Invitrogen, 2007; Singh y Kabra, 2006.

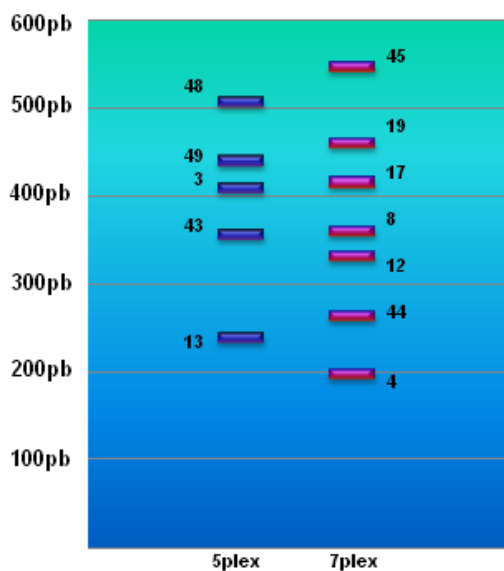
## APÉNDICE 6. Combinaciones de exones utilizadas para PCR hexuplex y quintuplex

**Cuadro 6**

Combinación de exones a utilizar en reacciones de PCR heptuplex y quintuplex

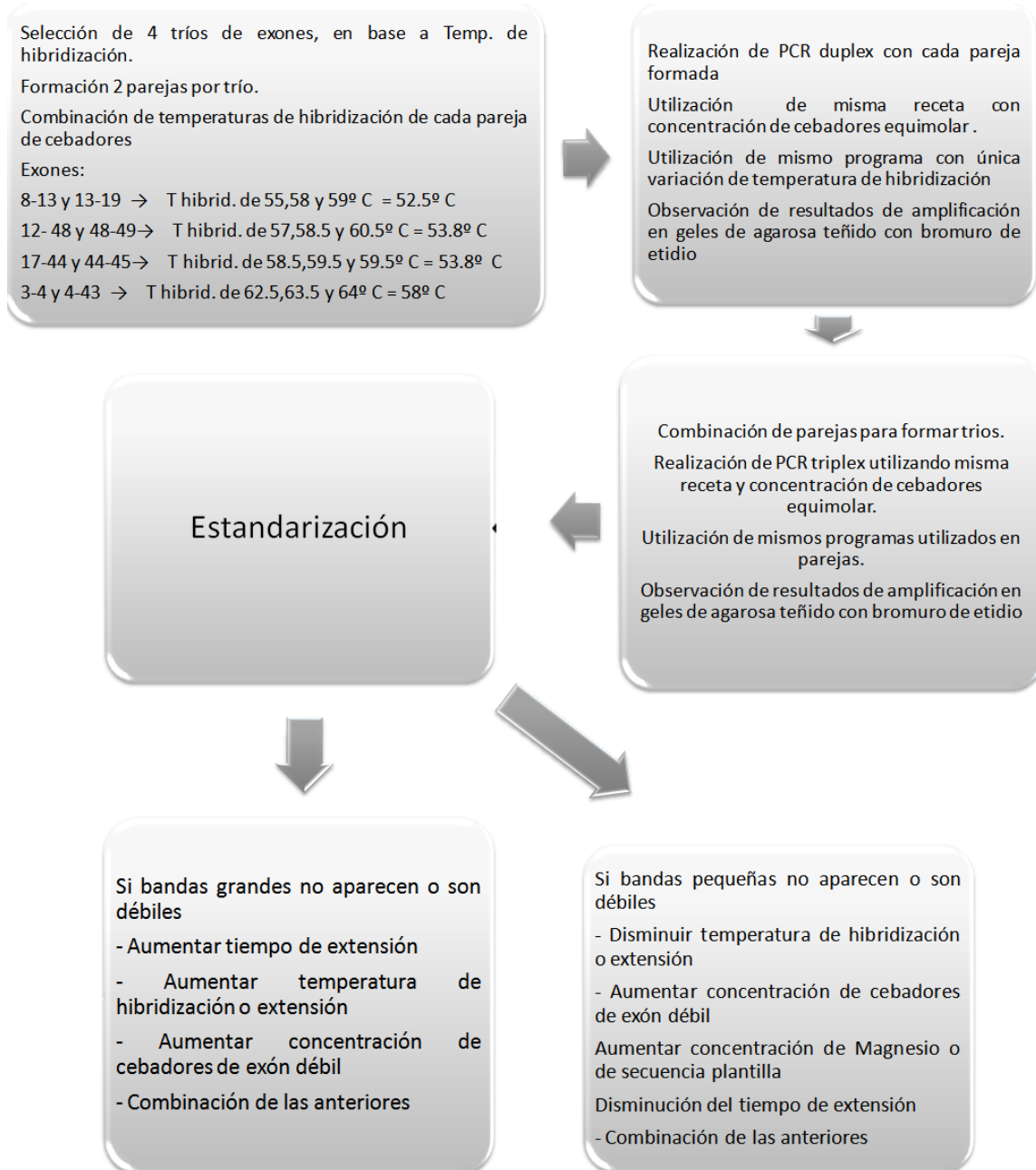
Exón	Temperatura de Hibridización (° C)	Tamaño de producto de amplificación (pb)
PCR Heptuplex		
4	63.5	196
44	59.5	263
12	57	331
8/48*	55/58.5	360/506
17	59.5	416
19	59	459
45	58.5	547
PCR Quintuplex		
13	58	238
43	62.5	357
3	64	410
49	60.5	439
48	58.5	506

\*Se realizaron 2 versiones de reacción de PCR heptuplex. En la primera (A) se utilizó exón 48, y en la segunda (B) exón 8. (Fuente: Silva *et al*, 2004)



**Gráfico 15 – PCR heptuplex y quintuplex.** Esquematización de cómo se observarían los productos de amplificación al ser separados por electroforesis en geles de agarosa, para reacciones de PCR heptuplex y quintuplex, en un individuo que no presentara una mutación para estos exones.

## APÉNDICE 7. Diagrama de flujo de combinaciones para estandarización de PCR



**Gráfico 16 – PCR triplex.** Diagrama de flujo de combinaciones para estandarización de PCR triplex utilizando cebadores para 12 exones del gen *distrofina*. (Henegariu *et al*, 1997)

## APÉNDICE 8. Resultados extracción y cuantificación ADN

**Cuadro 7**

Resultados de cuantificación de ADN por Biophotometer® y otras mediciones realizadas de efectividad de extracción

Muestra	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>320</sub>	[ADN] ng/μL	Vol. dilu. (μL)	No. Alicuotas	ADN total (ug)	Vol sangre. (mL)	μg ADN/ mL sangre
C1 KIT <sup>a</sup>	0.178	0.092	0.019	212.00	150	1	31.80	1	31.80
C2	0.220	0.114	0.001	292.00	150	3	131.40	4	32.85
P3 KIT <sup>a</sup>	0.049	0.032	0.014	46.67	150	1	7.00	1	7.00
P4 KIT <sup>a</sup>	0.012	0.005	0.001	14.67	150	1	2.20	1	2.20
P7	0.023	0.014	0.000	30.67	150	3	13.80	2.5	5.52
P7 KIT <sup>a</sup>	0.025	0.017	0.001	32.00	150	1	4.80	0.3	16.00
P9	0.138	0.074	0.000	184.00	150	3	82.80	3.5	23.66
P9 KIT <sup>a</sup>	0.039	0.020	0.000	52.00	150	1	7.80	0.3	26.00
F2	1.293	0.713	0.000	1724.00	150	3	775.80	4	193.95
F2 KIT	0.103	0.057	0.000	137.33	100	1	13.73	0.3	45.78
F3	0.773	0.436	0.029	992.00	150	3	446.40	4	111.60
F3 KIT	0.615	0.364	0.003	816.00	100	1	81.60	0.3	272.00
F4	0.075	0.040	0.000	100.00	150	3	45.00	4	11.25
F4 KIT	1.163	0.648	0.002	1548.00	100	1	154.80	0.3	516.00
F9	0.020	0.008	0.000	26.67	150	3	12.00	4	3.00
F9 KIT	0.249	0.138	0.000	332.00	100	1	33.20	0.3	110.67
F10	0.018	0.005	0.000	24.00	150	3	10.80	4	2.70
F10 KIT	0.142	0.078	0.000	189.33	100	1	18.93	0.3	63.11
F13	0.776	0.424	0.000	1034.67	150	3	465.60	4	116.40
F13 KIT	0.119	0.069	0.001	157.33	100	1	15.73	0.3	52.44

<sup>a</sup> Muestras extraídas a partir de 300 μL de sangre completa

$$\text{ng ADN} / \mu\text{L} = (A_{260} - A_{320}) \times (50 \text{ ng} / \mu\text{L}) \times (80 / 3)$$

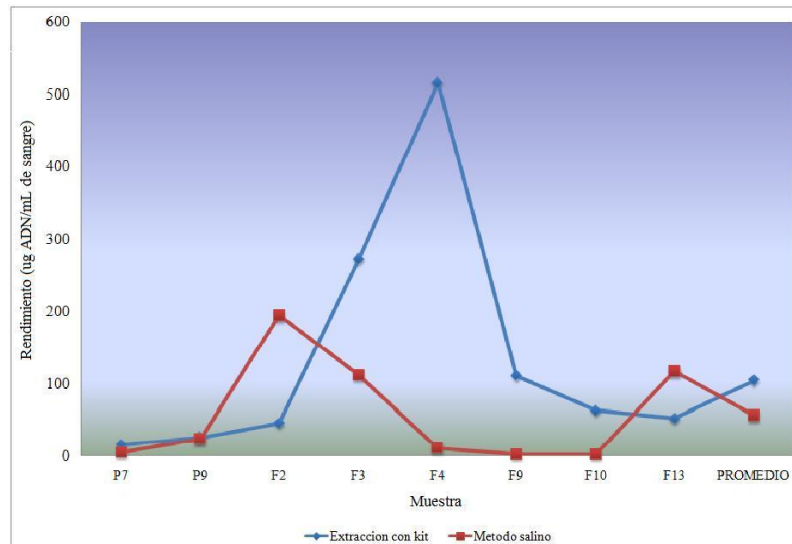
$$\text{Pureza} = \frac{(A_{260} - A_{320})}{(A_{280} - A_{320})}$$

$$\mu\text{g ADN total} = \text{ng ADN} / \mu\text{L} \times \text{volumen dilucion} \times \frac{1 \mu\text{g}}{1000 \text{ ng}}$$

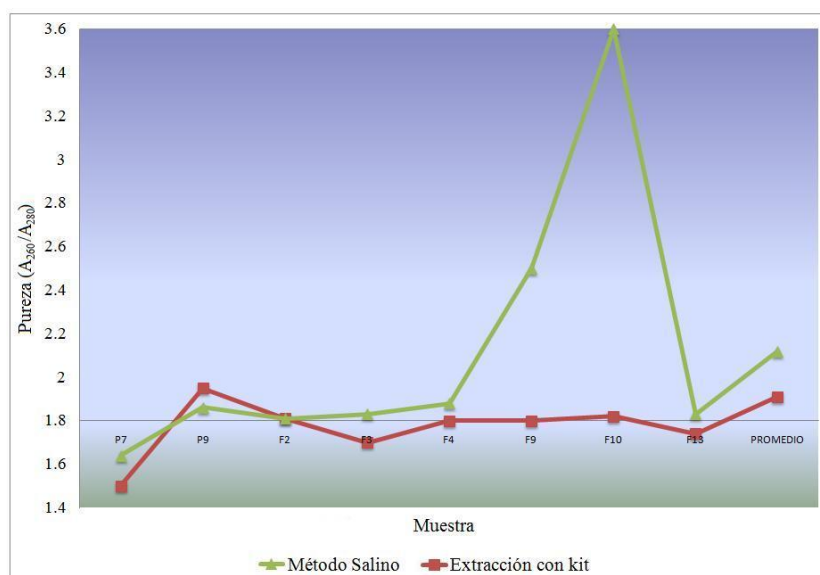
$$\mu\text{g ADN} / \text{mL sangre} = \frac{\mu\text{g ADN total}}{\text{Vol. Sangre}}$$

**Gráfico 17** – Ecuaciones utilizadas para la determinación de la cantidad de ADN extraído.

**APÉNDICE 9. Comparación de rendimiento y pureza obtenidos a partir de los dos métodos de extracción utilizados.**



**Gráfico 18 – Rendimiento de extracción.** Comparación entre el rendimiento para los dos métodos de extracción utilizados con muestras extraídas a partir de los dos métodos. El valor final de cada línea representa el promedio.



**Gráfico 19 – Pureza de extracción.** Comparación entre la pureza para los dos métodos de extracción utilizados, para cada muestra extraída con los dos métodos. Se observa al final de la gráfica el valor promedio.



**APÉNDICE 10. Análisis de la prueba t para dos medias independientes suponiendo varianzas iguales.**

**Cuadro 8**

Resultados obtenidos para prueba t para dos medias independientes suponiendo varianzas iguales

Parámetro	Comparación entre métodos de extracción				Comparación entre volumen de sangre utilizado para extracción con kit			
	Concentración ADN ( $\mu\text{g ADN/ mL sangre}$ )		Pureza ( $A_{280}/A_{260}$ )		Concentracion ADN ( $\mu\text{g ADN/ mL sangre}$ )		Pureza ( $A_{280}/A_{260}$ )	
	Kit	Salino	Kit	Salino	300 $\mu\text{L}$	1 mL	300 $\mu\text{L}$	1 mL
Media	103.91	55.66	1.91	2.10	176.67	16.60	1.78	2.06
Varianza	24454.55	4693.89	0.11	0.37	34809.96	154.82	0.00	0.21
No. de Observaciones	11	9	11	9	6	5	6	5
Varianza reunida	15672.03		0.22		19407.68		0.09	
Diferencia entre medias hipotética	0		0		0		0	
Grados de libertad	18		18		9		9	
<b>t Estadístico</b>	<b>0.858</b>		<b>0.895</b>		<b>1.897</b>		<b>1.543</b>	
P(T<=t) una cola	0.201		0.191		0.045		0.079	
t Crítica una cola	1.734		1.734		1.833		1.833	
P(T<=t) dos colas	0.402		0.383		0.090		0.157	
<b>t Crítica dos colas</b>	<b>2.101</b>		<b>2.101</b>		<b>2.262</b>		<b>2.262</b>	

\*Valores obtenidos utilizando programa Microsoft Excel® con la aplicación de análisis de datos, prueba t para dos medias independientes con varianzas iguales, con un 95.% de confianza

**APÉNDICE 11. Comparación de precios de reactivos y materiales utilizados con cada extracción.**

**Cuadro 9**

Comparación del precio por cada reactivo utilizado en los dos métodos de extracción.

Reactivo	Valor	Cantidad total	Concentración de trabajo		Volumen a utilizar		masa molecular (g/mol)	Cantidad por reacción		Reacciones por producto	Precio por reacción
Extracción con kit (volumen de sangre 1 mL)											
Kit	Q985.60	30.00	Rxn	-	-	-	-	1.00	Rxn	30.00	Q32.85
Isopropanol	Q314.07	5,000.00	mL	100 %	1.00 mL	-	-	1.00	mL	5000.00	Q0.06
Etanol absoluto	Q277.86	2,500.00	mL	70.00 %	1.00 mL	-	-	1.00	mL	2500.00	Q0.11
Tubos 15 mL	Q106.47	50.00	U	-	-	-	-	2.00	U	25.00	Q4.26
Puntas 50-1000	Q63.36	500.00	U	-	-	-	-	6.00	U	83.33	Q0.76
Puntas 02-200	Q109.34	1,000.00	U	-	-	-	-	1.00	U	1000.00	Q0.11
Punta 0.5-20	Q226.53	1,000.00	U	-	-	-	-	1.00	U	1000.00	Q0.23
										<b>TOTAL</b>	<b>Q38.38</b>
Extracción con kit (Volumen de sangre 300 µL)											
Kit	Q985.60	100.00	Rxn	-	1.00	Rxn	-	1.00	Rxn	100.00	Q9.86
Isopropanol	Q314.07	5,000.00	mL	100 %	0.30 mL	-	-	0.30	mL	16666.67	Q0.02
Etanol absolute	Q277.86	2,500.00	mL	70.00 %	0.30 mL	-	-	0.30	mL	8333.33	Q0.03
Tubos 1.5 mL	Q88.70	500.00	U	-	-	-	-	2.00	U	250.00	Q0.35
Puntas 50-1000	Q63.36	500.00	U	-	-	-	-	5.00	U	100.00	Q0.63
Punta 02-200	Q109.34	1,000.00	U	-	-	-	-	2.00	U	500.00	Q0.22
Punta 0.5-20	Q226.53	1,000.00	U	-	-	-	-	1.00	U	1000.00	Q0.23
										<b>TOTAL</b>	<b>Q11.34</b>

### Continuación cuadro 9

Extracción con método salino												
Tris-HCl	Q2,480.00	1,000.00	g	0.01	M	10.80	mL	157.60	0.02	g	58751.65	Q0.04
KCl	Q600.00	500.00	g	0.01	M	10.80	mL	74.55	0.01	g	62101.00	Q0.01
MgCl <sub>2</sub>	Q300.60	250.00	g	0.01	M	10.80	mL	203.30	0.02	g	11386.20	Q0.03
EDTA	Q382.50	250.00	g	0.002	M	10.80	mL	292.50	0.01	g	39569.48	Q0.01
SDS	Q858.14	1,000.00	g	10%	%	0.05	mL	-	0.005	g	200000.00	Q0.00
NaCl	Q160.12	500.00	g	3	M	0.60	mL	87.66	0.16	g	3168.81	Q0.05
	Q160.12	500.00	g	0.4	M	1.00	mL	87.66	0.04	g	14259.64	Q0.01
Etanol	Q277.86	2,500.00	mL	100	%	2.00	mL	-	2.00	mL	1250.00	Q0.22
absoluto	Q277.86	2,500.00	mL	70.00	%	1.00	mL	-	0.70	mL	3571.43	Q0.08
Triton	Q500.00	250.00	mL	100.00	%	0.20	mL	-	0.20	mL	1250.00	Q0.40
X-100												
Tubo	Q106.47	50.00	U	-				-	2.00	U	25.00	Q4.26
15 mL												
Tubos	Q88.70	500.00	U	-				-	3.00	U	166.67	Q0.53
1.5 mL												
Puntas	Q63.36	500.00	U	-				-	20.00	U	25.00	Q2.53
50-1000												
Punta	Q109.34	1,000.00	U	-				-	3.00	U	333.33	Q0.33
02-200												
Punta	Q226.53	1,000.00	U	-				-	1.00	U	1000.00	Q0.23
0.5-20												
<b>TOTAL</b>											<b>Q8.73</b>	

## APÉNDICE 12. Mezclas de reacción y programas utilizados en las PCRs

**Cuadro 10**

Concentración de reactivos en la mezcla de PCR

Reactivo	Concentración						
	PCR heptuplex	PCR cuádruplex	PCR triplex			PCR duplex	PCR individual
Exones	45, 8, 19, 17, 44, 4 y 12	13, 43, 49 y 48	12, 48 y 49	8, 13 y 19	17, 44 y 45	4 y 43	3
Volumen final	50 µL	50 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
<i>GoTaq</i> <sup>®</sup> <i>Polymerase</i> (Promega)	0.12 U/µL	0.12 U/µL	0.06 U/µL	0.06 U/µL	0.06 U/µL	0.06 U/µL	0.06 U/µL
<i>GoTaq</i> <sup>®</sup> <i>Buffer</i> incolore(Promega)	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	3 mM	2 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	3 mM	5 mM
Cebadores (Invitrogen)	0.25 µM y 0.3 µM <sup>a</sup> c/u	0.25 µM c/u	0.25 µM c/u y 0.35 µM <sup>b</sup>	0.25 µM c/u	0.20 µM c/u	0.15 µM c/u	0.25 µM c/u
dNTPs (Promega)	0.4 mM c/u	0.4 mM c/u	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u	0.25 mM c/u	0.25 mM c/u
Plantilla de ADN	500 ng	500 ng	400 ng	500 ng	500 ng	500 ng	750 ng

<sup>a</sup> Se utilizó 0.25 µM para exones 45, 8, 19, 17, 44 y 4; 0.30 µM para exón 12.

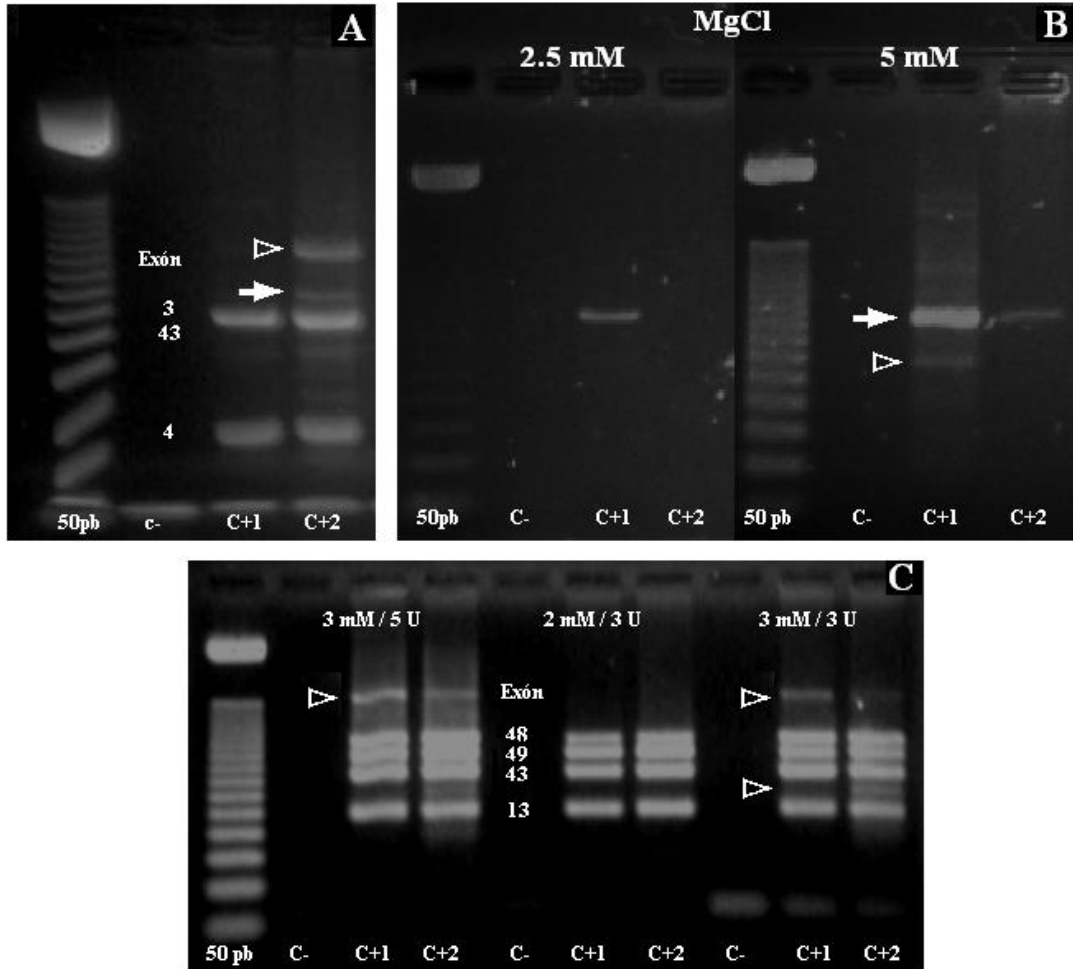
<sup>b</sup> Se utilizó 0.25 µM para exones 12 y 49 y 0.35 µM para exón 48

**Cuadro 11**

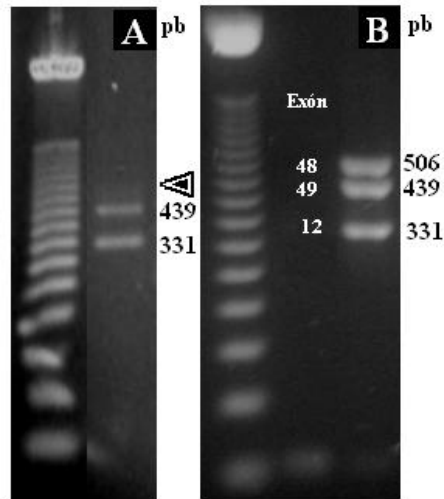
Programas de termociclador

Etapa del programa	Temperatura y tiempo					
	PCR heptuplex y cuádruplex	Exones 12, 48 y 49	PCR triplex Exones 8, 13 y 19	Exones 17, 44 y 45	PCR duplex Exones 4 y 43	PCR Exón 3
Desnaturalización inicial	94° C, 6 min	94° C, 4 min	94° C, 4 min	94° C, 4 min	94° C, 4 min	94° C, 4 min
Número de ciclos	30	30	30	30	30	30
Desnaturalización	94° C, 30 s	94° C, 30 s	94° C, 30 s	94° C, 30 s	94° C, 30 s	94° C, 30 s
Hibridación	50° C, 30 s	53° C, 30 s	52.5° C, 30 s	53.8° C, 30 s	61° C, 30 s	62° C, 30 s
Extensión	65° C, 4 min	72° C, 2 min	72° C, 2 min	72° C, 2 min	72° C, 2 min	72° C, 2 min
Extensión final	65° C, 7 min	72° C, 3 min	72° C, 3 min	72° C, 3 min	72° C, 3 min	72° C, 3 min

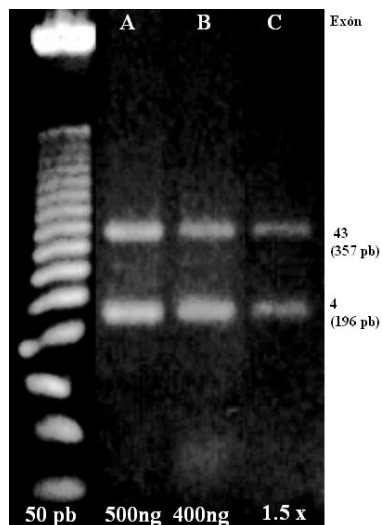
### APÉNDICE 13. Efecto de los componentes de la mezcla de reacción en los resultados



**Gráfico 20 – Efecto de la concentración de MgCl<sub>2</sub> y Taq polimerasa en los resultados de amplificación.** Electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio de amplificación de (A) exones 3 (410 pb), 4 (196 pb) y 43 (357 pb). El aumento de concentración de cloruro de magnesio de 2 mM a 3 mM da lugar a la aparición del producto esperado (flecha blanca), pero también a la aparición de productos inespecíficos (flecha negra); (B) exón 3, donde se observa que el aumento en la concentración de cloruro de magnesio da lugar a la aparición del producto y aumento de su intensidad (flecha blanca), pero también se observan productos inespecíficos (Flecha negra); (C) exones 13 (238 pb), 43 (357 pb), 48 (506 pb) y 49 (439 pb); en este caso la combinación de concentraciones de cloruro de magnesio y polimerasa, da variaciones en la aparición de productos inespecíficos. La primera columna a la izquierda corresponde a una escalera de 50 pb.

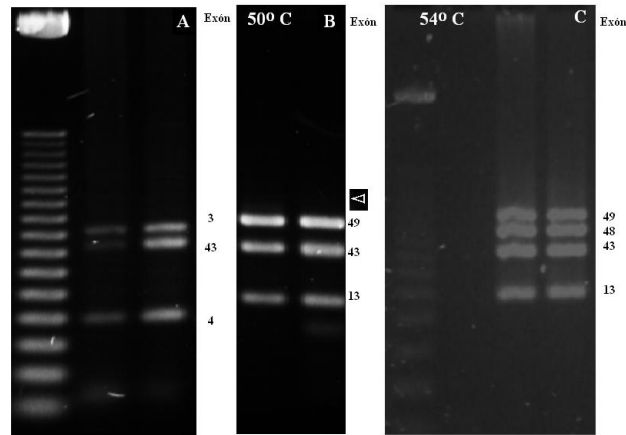


**Gráfico 21 – Efecto de la concentración de cebadores en la amplificación.** Electroforesis de exones 12 (331 pb), 48 (506 pb) y 49 (439 pb) en geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. Amplificación utilizando (A) concentración equimolar de cebadores de 0.2  $\mu$ M. No se observa el amplicon del exón 48 (506 pb, flecha negra); (B) concentración de cebadores de 0.25  $\mu$ M para exones 12 y 49 y 0.35  $\mu$ M para exón 48. Se observa una mejora en la amplificación. La primera columna a la izquierda de cada imagen corresponde a una escalera de 50 pb

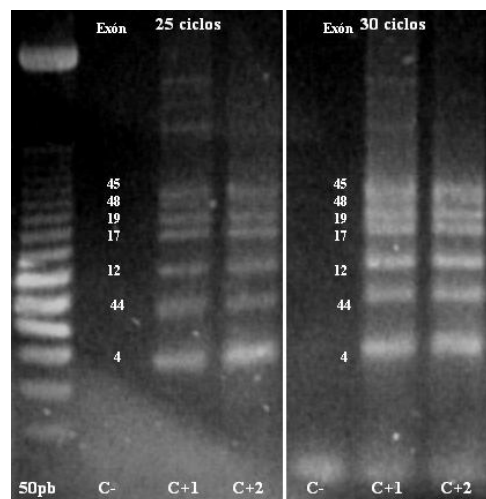


**Gráfico 22 – Efecto de la cantidad de plantilla de ADN.** Electroforesis de amplificación de exones 4 (196 pb) y 43 (357 pb) en gel de agarosa al 3% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Se observa mayor intensidad de la amplificación al agregar (A) 500 ng de plantilla que al agregar (B) 400 ng. (C) Al agregar buffer en concentración 1.5 x se disminuye la amplificación, manteniendo la cantidad de plantilla de ADN en 400 ng. La primera columna a la izquierda corresponde a una escalera de 50 pb

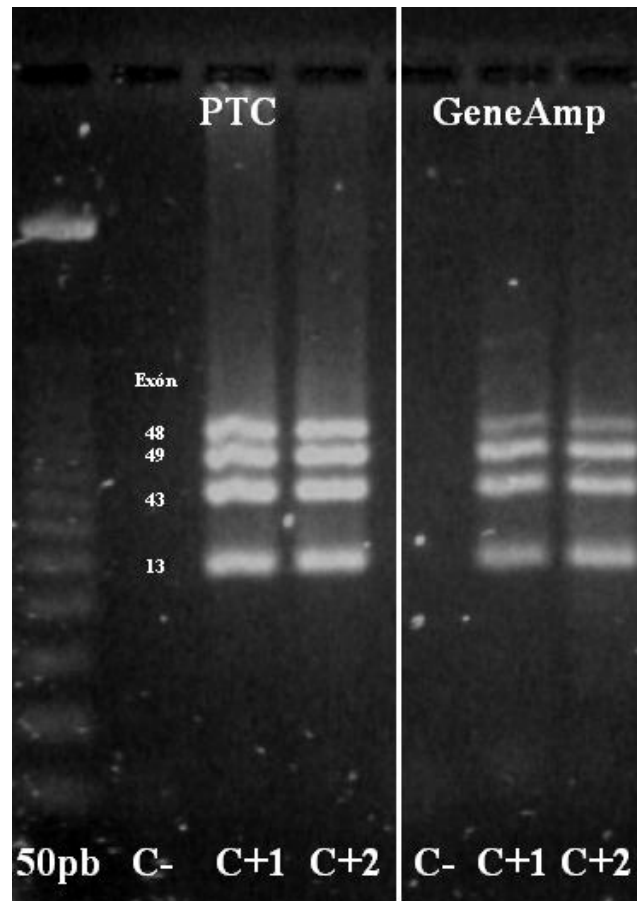
## APENDICE 14. Efecto de los componentes del programa de amplificación



**Gráfico 23 – Efecto de la temperatura de hibridación.** Electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. Amplificación de (A) exones 3 (410 pb), 4 (196 pb) y 43 (357 pb). El aumento de temperatura de hibridación de 58° C a 61° C da como resultado la amplificación de banda de exón 3 (410 pb) que no aparecía anteriormente; (B y C) exones 13 (238 pb), 43 (357 pb), 48 (506 pb) y 49 (439 pb). El aumento de temperatura de hibridación de 50° C a 54° C, tuvo un efecto contrario en la banda del exón 48 (506 pb), la cual no apareció luego del aumento de temperatura. La primera columna a la izquierda corresponde a una escalera de 50 pb.



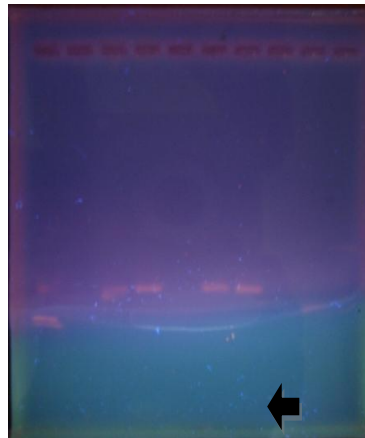
**Gráfico 24 – Efecto del número de ciclos.** Reacción de PCR heptuplex en geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. Se observa una mayor intensidad de bandas en la reacción con 30 ciclos en comparación con la de 25 ciclos. La primera columna a la izquierda corresponde a una escalera de 50 pb



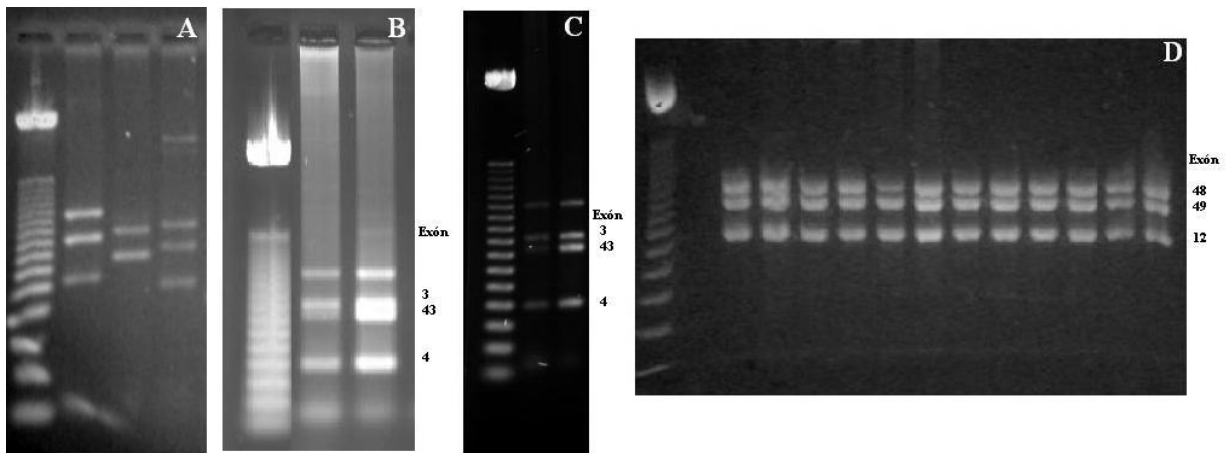
**Gráfico 25. Efecto del termociclador.** Electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. Amplificación de exones 13 (238 pb), 43 (357 pb), 48 (506 pb) y 49 (439 pb) en los dos termocicladores disponibles. Se observa mayor intensidad de bandas en productos del termociclador PTC en comparación con los productos del termociclador *GeneAmp*. La primera columna a la izquierda corresponde a una escalera de 50 pb.



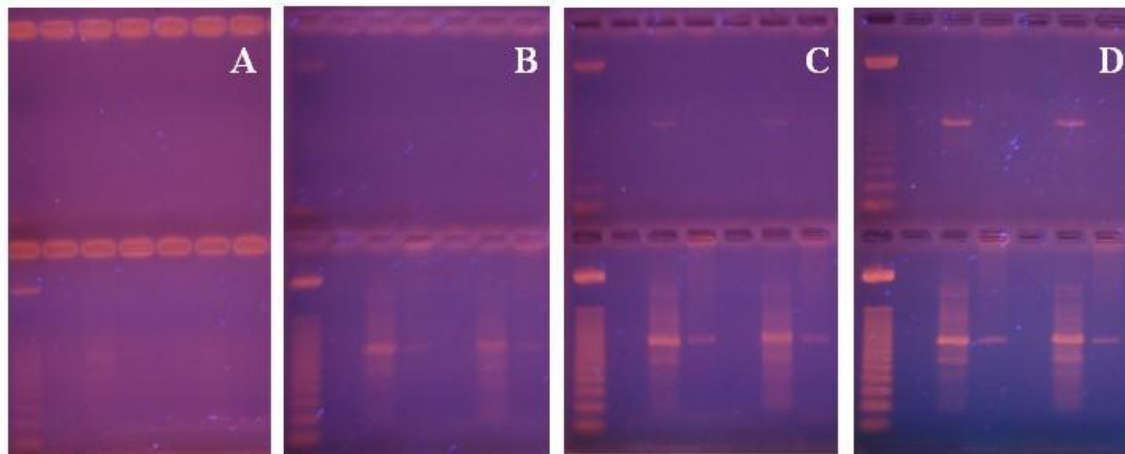
## APÉNDICE 15. Efecto de la electroforesis y tinción de geles de agarosa



**Gráfico 26 – Efecto de la polimerización de agarosa.** Electroforesis de PCR triplex en gel de agarosa al 3% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Debido a la inadecuada polimerización del gel, no se logró una separación de bandas homogénea. Se observa una banda delgada justo donde el gel inicia un cambio de color. Este cambio de color también se debe a la polimerización irregular del gel, impidiendo su tinción homogénea.

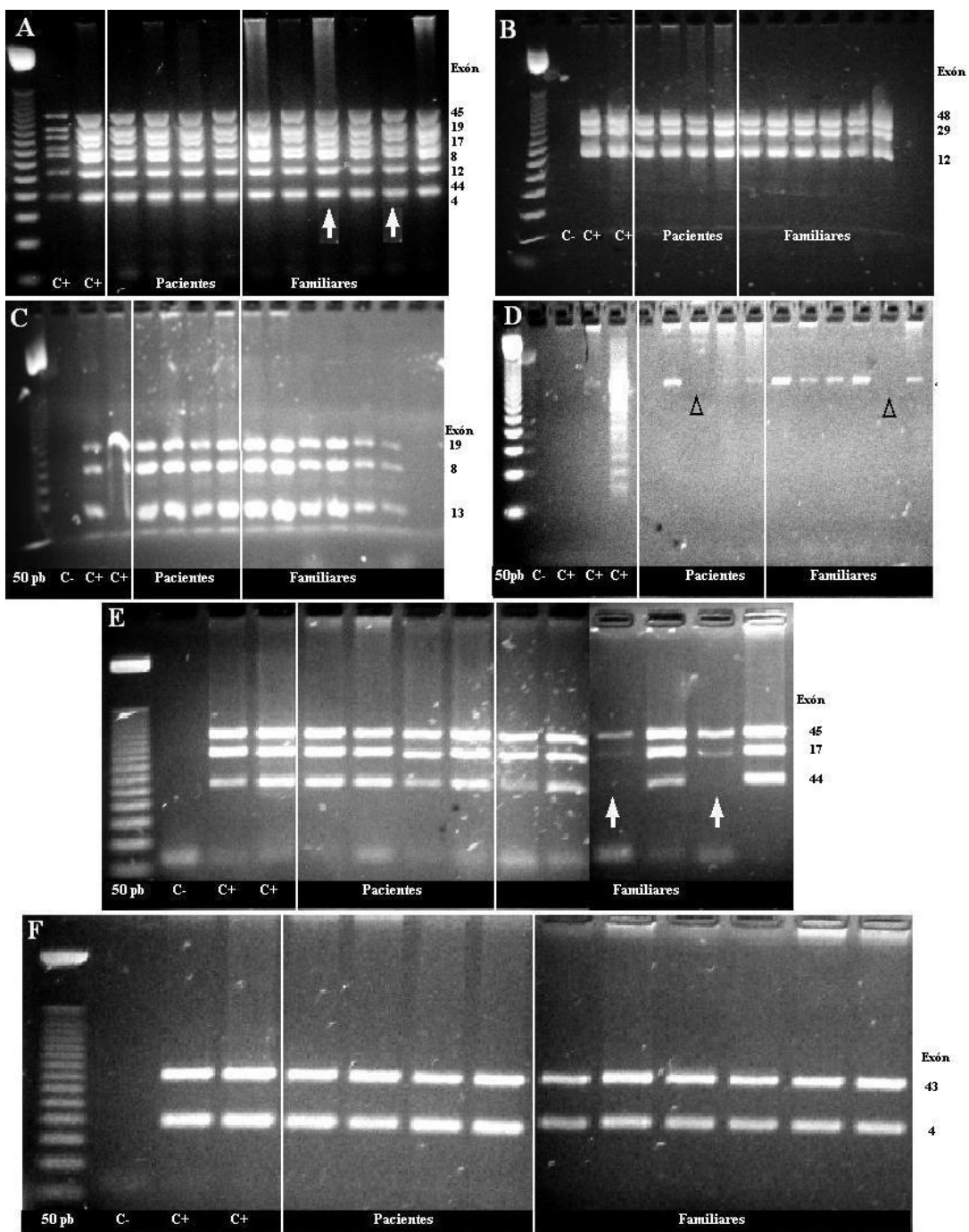


**Gráfico 27 – Efecto de tiempo, voltaje y volumen de muestra.** Electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. (A) Al utilizar un voltaje alto (110 V) se produce una separación irregular de las bandas. La visualización de los mismos resultados cargando (A) 8 µL de muestra con una separación de 45 minutos, es de menor calidad a la obtenida cargando (C) 6 µL de muestra con una separación de 90 minutos. (D) La separación de las bandas durante un tiempo muy largo (120 minutos) produce distorsión en las bandas.



**Gráfico 28 – Efecto del tiempo de lavado.** Electroforesis de PCR de exón 3 en gel de agarosa al 3% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. (A) Al visualizar el gel bajo luz UV sin lavar con agua apenas es posible distinguir la escalera de 50 pb de la fila izquierda inferior. (B) Después de 5 minutos de lavado con agua y agitación se empiezan a visualizar bandas únicamente en la fila inferior. (C) Luego de 10 minutos las bandas y la escalera de la fila inferior son evidentes y empiezan a distinguirse bandas en la parte superior (D) Con 15 minutos, es posible observar bandas definidas tanto en la parte superior como inferior.

**APÉNDICE 16. Amplificación de exones en muestras de individuos que presentan síntomas y sus familiares femeninos**



**Gráfico 29 - Amplificación de muestras de individuos con síntomas y sus familiares femeninos** en agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. (A) Resultados de reacción de PCR heptuplex. Las 10 muestras analizadas presentaron amplificación de los 7 exones. (B) Resultados de amplificación de exones 12, 48 y 49. Todas las muestras mostraron amplificación de los 3 exones. (C) Resultados de amplificación de exones 8, 13 y 19. Todas las muestras mostraron amplificación. (D) Amplificación individual de exón 3. Se observa amplificación en 3 de 4 pacientes y en 5 de 6 familiares (Flechas negra) (E) Amplificación de exones 17, 14 y 45. Se observa deleciones en 2 muestras de familiares, sin embargo estas si aparecen en PCR heptuplex, donde también se realizo amplificación del exón 44 (Flechas blancas). (F) Amplificación de exones 4 y 43. Se observa amplificación de ambas bandas en todas las muestras.