

DetECCIÓN MOLECULAR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA EN UNA FAMILIA MEXICANA. De la biología molecular a la medicina

MARCOS FERNANDEZ
DALIA HERNANDEZ
ESTHER MENENDEZ
EDMUNDO CALVA

Se determinó en una familia mexicana, con dos hijas afectadas por fibrosis quística (FQ; mucoviscidosis), que otras dos hijas sanas son portadoras de un gene FQ. Para ello se utilizó como detector radioactivo el segmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano contenido en el plásmido recombinante pJ3.11. El detector se hibridó con las muestras de ADN total obtenidas de los linfocitos circulantes del padre, la madre, y las cuatro hijas; previa ruptura de estas muestras de ADN con la enzima de restricción *Msp* I, separación por electroforesis en gel de los fragmentos resultantes y transferencia de éstos a un filtro de nitrocelulosa. Esta constituye una primera experiencia en México en el uso de metodologías de la biología molecular en la detección de enfermedades genéticas.

I. Biología molecular y medicina

"Quien posee imaginación sin conocimientos tiene alas pero no pies"

J. Joubert (1754-1824)

Los avances en la biología molecular han permitido el desarrollo vertiginoso de la ingeniería genética.¹ Ello ha abierto las posibilidades de aislar, caracterizar y manipular genes, incluyendo los del ser humano.

Los nuevos conocimientos permiten en la actualidad llevar a cabo el diagnóstico prenatal y la detección de portadores sanos de enfermedades genéticas, por hibri-

dación con detectores específicos de ácido desoxirribonucleico (ADN).^{2,6} Las enfermedades que se han diagnosticado o detectado recientemente por este método incluyen: la anemia de las células falciformes,⁷ la distrofia muscular de Duchenne,⁸ la hemofilia,⁹ la corea de Huntington,¹⁰ la fenilcetonuria¹¹ y la fibrosis quística (FQ).^{12,13}

El uso de detectores específicos de ADN está permitiendo el avance en varios otros campos de la medicina. El posible papel de la predisposición genética a las enfermedades maniaco depresivas y de Alzheimer está siendo explorada.⁶ La descripción de los oncogenes ha constituido, no solamente un avance capital en la concepción de los procesos neoplásicos, sino que también abre las posibilidades de enriquecer el diagnóstico clínico, haciéndolo más rápido y confiable, a través del diagnóstico molecular del cáncer.^{14,15} Asimismo, la utilización genes aislados de agentes patógenos está proporcionando nuevas herramientas para la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Entre otros ejemplos, se han generado nuevas herramientas para el estudio de la epidemiología de las infecciones bacterianas;¹⁶ y es posible la detección temprana de la infección pediátrica por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA).¹⁷ Por otro lado, es posible establecer "huellas digitales moleculares" de cada ser humano, lo cual ha sido útil para discernir disputas de paternidad; y promete ser de gran utilidad en la medicina forense.¹⁸

Se vislumbra por tanto que técnicas y conceptos de la biología molecular repercutirán cada vez más en algu-

Todos los autores. Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

nas áreas de la práctica médica, en la apertura de nuevos horizontes en la investigación clínica y en el concepto mismo de enfermedad.

Con el objeto de colaborar en el acercamiento de la biología molecular y la medicina en nuestro país, aplicamos nuestra experiencia metodológica en hibridaciones de ácidos nucleicos, específicamente en la técnica de Southern, para detectar la segregación del gene relacionado a la FQ (gene o locus FQ) en una familia mexicana. Esta metodología la hemos utilizado en México desde hace varios años en el estudio de genes bacterianos; sin embargo, se requería aumentar su sensibilidad para poder detectar segmentos de ADN presentes en una sola copia en el genoma humano.

II. Clínica de la FQ

La FQ o mucoviscidosis es un trastorno congénito heredado en un patrón autosómico recesivo. Su prevalencia en la población caucásica de los Estados Unidos de América es de cerca de 1 en 2000 nacidos vivos. Clínicamente es una enfermedad generalizada de las glándulas exócrinas, lo cual resulta en la producción de un moco muy espeso. Esta condición está asociada a obstrucción crónica de las vías bronquiales, acompañada de infecciones persistentes y recurrentes; insuficiencia exócrina pancreática; obstrucción intestinal; cirrosis hepática; infertilidad; y niveles muy elevados de sodio y cloro en el sudor. Las alteraciones pulmonares son la causa más frecuente de paro respiratorio, cardíaco, o de ambos. El problema pulmonar más importante son las infecciones crónicas, particularmente con *Staphylococcus aureus* y con *Pseudomonas aeruginosa*. Complicaciones pulmonares incluyen neumotórax, hemoptisis, y, principalmente, cor pulmonale. La terapia habitual es la física-respiratoria con drenajes posturales.¹⁹

El método de diagnóstico de laboratorio más común a la fecha es la medición de niveles de electrolitos en el sudor, por el método cuantitativo de pilocarpina-iontoforesis; los niveles son anormalmente altos debido a la falta de reabsorción de sodio y cloro en los ductos de las glándulas sudoríparas.¹⁹ Este método no permite, sin embargo, el diagnóstico prenatal o la detección de portadores asintomáticos.

Se ha observado asimismo que los valores de las enzimas de las microvelocidades coriónicas, en el líquido amniótico, disminuyen por la obstrucción del fleón terminal en la FQ. Por ello, para el diagnóstico prenatal, se recomienda llevar a cabo la prueba de fosfatasa alcalina de Brock en conjunción con estudios del ADN.²⁰

III. Genética de la FQ.

La base metabólica del defecto en la FQ sigue siendo desconocida. Debido a ello, al menos a la fecha, no se ha aislado el gene responsable; su búsqueda es una tarea

ardua que constituye uno de los retos actuales importantes de la biología molecular.

Sin embargo, se han logrado avances muy importantes en los últimos años. La enzima paraoxonasa fue el primer marcador reportado que mostraba una cercanía genética significativa con el locus FQ. Posteriormente, se han descrito varios segmentos de ADN humano, cada uno clonado en la bacteria *Escherichia coli*, que corresponden a porciones de genoma relativamente cercanas al locus FQ, o sea a menos de 10^3 kilopares de bases nitrogenadas (kp). Algunos de los segmentos son a la fecha "anónimos", pues se desconoce su función. Sin embargo todos permiten detectar secuencias polimórficas de bases nitrogenadas, las cuales se heredan junto con el locus FQ y se localizan en el cromosoma 7. Los estudios de cercanía genética en varios laboratorios, involucrando segmentos de ADN para detectar polimorfismos genéticos en familias de diferentes orígenes geográficos, han establecido que el orden de los loci genéticos con el mayor apoyo estadístico es: COL1A2 (gene para colágena)- D7S13 (detector pB79a)- D7S16 (detector p7C22)- MET (un oncogene)- FQ (el locus de la FQ)- D7S8 (detector J3.11)- TCRB (gene para el polipéptido beta del receptor de las células T).²¹

IV. Detección de la segregación del gene FQ

Las endonucleasas sitio-específicas de restricción, o simplemente enzimas de restricción, cortan el ADN en lugares determinados generalmente por secuencias de cuatro ó seis bases nitrogenadas.^{1,2} El uso de las enzimas de restricción para detectar polimorfismos genéticos, que se reflejan en polimorfismos en la secuencia de bases, ha sido el fundamento para la construcción de un nuevo mapa genético del hombre que permite seguir la segregación de genes o cromosomas particulares dentro de una familia.^{22,23} De esta forma, en ocasiones el ADN de un cromosoma es cortado por una enzima de restricción en un sitio que no se encuentra en el cromosoma homólogo (Fig. 1). Esto genera un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR). Así, los segmentos detectores de ADN permiten el estudio de los PLFRs al formar híbridos con regiones muy cercanas, o que comprenden, a las secuencias polimórficas (Fig. 1).

En general, la metodología consiste en formas híbridos entre el ADN detector de una región específica, marcada radioactivamente, y el ADN total de la persona en estudio. De esta forma, se pueden identificar los fetos afectados, que poseen dos genes para la FQ, aislando ADN de amniocitos; y los portadores sanos, de un gene para la FQ, aislando ADN de linfocitos circulantes.²³ Recientemente se ha descrito el aislamiento de ADN de células del epitelio bucal para el estudio del locus FQ.²⁴

El ADN total se corta con la enzima de restricción correspondiente; los fragmentos generados se separan por electroforesis en un gel de agarosa y se transfieren

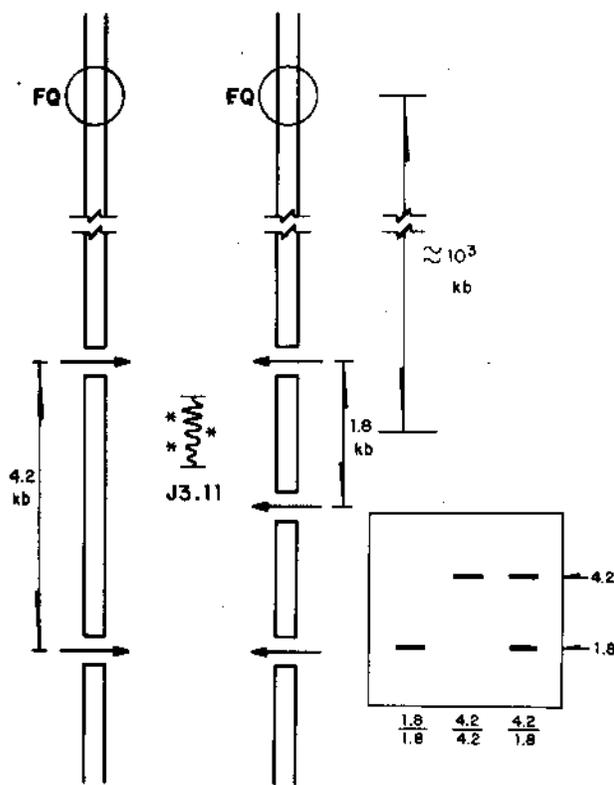


Figura 1. Esquema que muestra un segmento de dos cromosomas humanos número 7; cada uno portando el locus FQ. La línea ondulada (***) representa una población de segmentos de ADN humano (J3.11) de cadena sencilla, marcados radioactivamente, que hibridan con una porción de las moléculas de ADN correspondientes a cada cromosoma. Las flechas que atraviesan los cromosomas simulan los cortes realizados por la enzima de restricción *Msp*I; dos sitios están presentes en ambos cromosomas y un sitio sólo está presente en el cromosoma de la derecha. Este último corresponde a un sitio polimórfico. Por tanto, el J3.11 puede hibridar con un segmento de 1.8 ó 4.2 kb. Los híbridos radioactivos son aparentes en un autorradiograma de una transferencia e hibridación tipo Southern, representada en el cuadro del lado inferior derecho (4.2/1.8); también se muestran homocigotos para las bandas de 1.8 ó de 4.2 kb.

del gel a un filtro de nitrocelulosa. El detector se hibrida con el ADN fijado al filtro de nitrocelulosa y los híbridos radioactivos se visualizan, después de lavar el filtro para remover el detector unido inespecíficamente, por autorradiografía, exponiendo el filtro a una película de rayos X. Esto se conoce como la técnica de Southern^{2,3} y ha sido fundamental en el binomio biología molecular y medicina.

En la Figura 1 se esquematiza el uso del detector J3.11, que hibrida con un segmento de ADN que se encuentra a 10^3 kb del locus de la FQ. Se muestra una situación hipotética en la que en un cromosoma hay dos sitios de corte para la enzima de restricción *Msp* I, en la vecindad del detector, que genera un fragmento de 1.8 kb. En el otro cromosoma sólo se encuentra uno de estos sitios y por ello se genera un fragmento de 4.2 kb. En la

parte inferior derecha de la Figura 1 se muestra un cuadro que esquematiza el autorradiograma de una transferencia e hibridación tipo Southern de individuos homocigotos, 1.8/1.8 y 4.2/4.2, y de un heterocigoto 1.8/4.2, para estos segmentos polimórficos.

Los PLFRs así detectados constituyen "huellas digitales" de los cromosomas; lo cual permite seguir su segregación en las familias y determinar qué patrones polimórficos están asociados al gene mutado.²⁻¹³

VI. Bioquímica de la FQ

Se ha descrito que en los homocigotos y los heterocigotos para el locus FQ hay niveles elevados de una proteína sérica, conocida como el antígeno FQ. El gene para este antígeno se ha localizado en el cromosoma 1, ha sido aislado, y se conoce su secuencia nucleotídica. La secuencia de aminoácidos correspondiente al gene, deducida de la secuencia nucleotídica, ha permitido determinar que tiene una similitud significativa con proteínas que fijan calcio en intestino y encéfalo.²⁵

El defecto celular que más claramente se ha demostrado en la FQ es en el transporte de iones cloro a través de epitelios. Sin embargo, la actividad de los canales de cloro aislados de los tejidos más afectados en la FQ presenta características de conducta similares a los aislados de tejidos normales. Por otro lado, en células enteras de individuos con FQ (células FQ) no se observa la estimulación beta-adrenérgica de la actividad de los canales de cloro que se observa en células normales, como la generación de AMP cíclico en las células FQ no está alterada, se piensa que el defecto está en otro sistema transductor de señales, como la vía fosfatidilinositol que conlleva a la movilización de calcio intracelular. Además se ha demostrado que el calcio modula la actividad de canales iónicos en neutrófilos.²⁵

De esta manera, es posible que el antígeno FQ y el producto del gene del cromosoma 7 formen un complejo multimolecular que pudiera estar involucrado en el transporte de iones mediado por calcio. Si el producto del gene del cromosoma 7 está disminuido o ausente en heterocigotos u homocigotos para la FQ, respectivamente, esto pudiera causar el acúmulo del antígeno FQ.²⁵ Es probable por tanto que este antígeno no esté mutado en la FQ y por ello su gene no sea un marcador adecuado para el diagnóstico por hibridación con ADN.

VII. Segregación del gene FQ en una familia mexicana

Las principales razones para escoger la FQ fueron que es probablemente la enfermedad genética monofactorial preponderante en México, con una incidencia similar a la de poblaciones caucásicas, alrededor de 1 en cada 2000 nacidos vivos (Dr. Javier Luengas, Asociación Mexicana de Fibrosis Quística; comunicación personal), y que se contaba con la infraestructura clínica y

logística proporcionada por la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística.

En la Figura 2 se muestra el resultado del estudio de una familia mexicana. Los datos se obtuvieron tras resolver escollos metodológicos en los procesos de purificación del ADN de linfocitos circulantes, en la transferencia del ADN al filtro de nitrocelulosa, y en el marcaje a alta actividad específica del detector.

La familia estudiada consiste del padre, la madre y

asterisco. las hijas enfermas son heterocigotas 1.8/4.2. Esto significa que uno de los genes FQ está asociado a la banda de 4.2 kb, la cual proviene de la madre y se ha marcado asimismo con un asterisco. Como las hijas sanas muestran una banda de 4.2 kb son portadoras de un gene FQ; en estos dos casos la banda de 1.8 kb debe estar asociada a un gene normal, ya que clínicamente se ha determinado que las niñas no están afectadas.

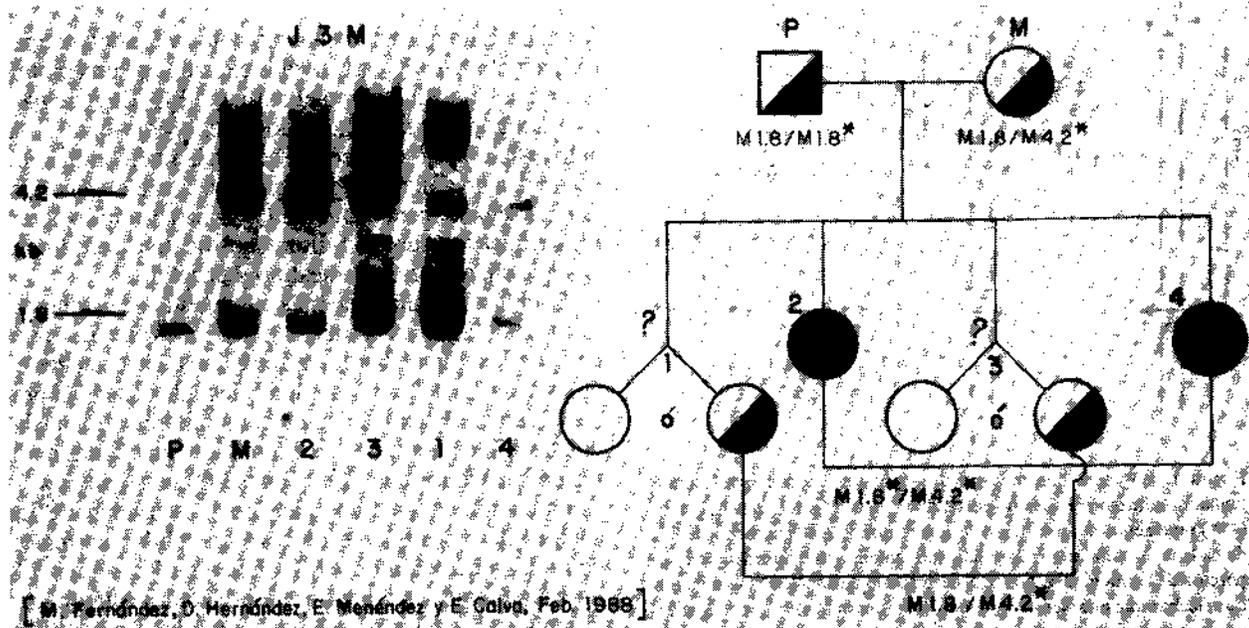


Figura 2. Detección de la segregación del gene FQ en una familia mexicana. Del lado derecho se muestra el árbol genealógico de la familia con padre (P) y madre (M) portadores, y las cuatro hijas; las núm. 2 y 4 afectadas con FQ. El lado izquierdo muestra el autorradiograma correspondiente a la transferencia e hibridación tipo Southern del ADN de cada miembro de la familia cortado con *Msp*I e hibridado con el detector J3.11. Para mayor explicación ver el texto.

cuatro hijas; éstas numeradas del 1 a 4, de edades 15, 13, 10 y 4 años, respectivamente. Las hijas 2 y 4 están afectadas con FQ y por tanto son homocigotas para el gene mutado y se esquematizan con un círculo negro. Por otro lado, el padre y la madre, al ser asintomáticos, son portadores sanos del gene recesivo para la FQ y se esquematizan con un cuadrado y un círculo, respectivamente, mitad negro y mitad blanco. La pregunta era si las hijas sanas eran o no portadoras de un gene FQ. La respuesta fue que ambas hijas eran portadoras y se llegó a esta conclusión de la siguiente manera.

La madre mostró ser heterocigota para las bandas de 1.8 y 4.2 kb, correspondientes al detector J3.11 cuando la enzima de restricción fue *Msp*I (ver autorradiograma del lado izquierdo de la Figura 2). (La prueba es denominada J3M para reconocer el detector y la enzima de restricción). El padre es homocigoto 1.8/1.8, por tanto una de las bandas de 1.8 kb está asociada a un gene sano y otra a un gene FQ; esta última se ha marcado con un

VIII. Conclusiones y perspectivas

El uso de detectores cercanos al locus de la FQ permite, hasta el momento, hacer el diagnóstico prenatal para alrededor del 70 por ciento de las parejas con riesgo de engendrar un hijo afectado.^{12,13} No será hasta que el gene responsable sea aislado, que la FQ pueda ser diagnosticada en todos los casos por hibridación con ácidos nucleicos. Es por esto que es recomendable el combinar este tipo de diagnóstico con la determinación de fosfatasa alcalina en líquido amniótico, a la semana 17 de gestación.²⁰

Los resultados presentados, más que el diagnóstico de un caso particular, muestran que es posible hacer en nuestro país el diagnóstico prenatal y la detección de portadores para enfermedades genéticas usando sondas de ADN.

Este refuerzo, como cualquier inicio, requirió de tiempo y recursos económicos que aparentemente ha-

cen que este tipo de diagnóstico no sea accesible a la población general. Para superar esta situación hay al menos dos caminos. El primero depende de las mejoras inherentes a la tecnología *per se*, a las cuales nos referiremos en primer lugar. El segundo es contar con una mayor infraestructura material y humana, que nos permita vincular la medicina con la tecnología y conceptos actuales de la biología molecular; como nos referimos en segundo término.

A través de nuestras actividades cotidianas nos podemos percatar de la simplificación y abaratamiento de procesos, equipos, medicamentos, etc., como resultado de avances científicos y tecnológicos. Este debe de ser también el destino del diagnóstico molecular.

Como perspectiva inmediata se encuentra el desarrollo de sistemas que utilicen detectores no-radioactivos. Un primer avance sustancial ha sido la "reacción en cadena de la polimerasa" o RCP ("polymerase chain reaction" o PCR).^{5,7,9,11,13,17,24} Brevemente, el sistema consiste en sintetizar grandes cantidades (varios microgramos) del gene a detectar, aunque se encuentre inmerso en todo el genoma de un organismo. La síntesis la lleva a cabo la ADN polimerasa, iniciada a partir de segmentos pequeños de ADN, u oligonucleótidos, hibridados específicamente a regiones adyacentes del gene. El gene se detecta después de cortarlo con enzimas de restricción, separar por electroforesis en gel y tefir con bromuro de etidio los fragmentos resultantes. La principal desventaja de este procedimiento es que no puede aplicarse a muestras crudas; lo que es altamente deseable sobre todo en la detección de patógenos en heces, sangre, orina, saliva, etc.

Se trabaja arduamente en varios países, incluyendo México, en sistemas alternos a la RCP, buscando mayor rapidez y sencillez.

Un área de perspectiva a mediano plazo es la concierne al proyecto para obtener la secuencia completa de los, aproximadamente, 3000 millones de bases que conforman el genoma humano haploide, o sea que corresponden a un juego de 23 cromosomas. Este proyecto se basa en los, cada vez más detallados, mapas de polimorfismos.²³ Esto abrirá las perspectivas para que en el futuro la secuenciación de genomas completos sea tarea rutinaria. La información generada de esta manera permitirá hacer el diagnóstico y predicción de caracteres genéticos con mayor rapidez y precisión.

El manejo de tecnología de vanguardia no necesariamente hace al buen médico, como tampoco hace al buen investigador en ciencias básicas. Son la intuición, la capacidad de observación y reflexión, y el cúmulo de experiencias, algunos de los elementos que pueden llevar al acto creativo; el cual permitirá ver, deducir, o conjuntar, en forma independiente y novedosa. En el caso del médico, para quien cada paciente debería ser un caso de investigación clínica, la base es su contacto con los enfermos. Así, de la observación y diagnóstico clínico se han derivado muchos de los grandes avances en la medicina.

Sin embargo, aún considerando lo anterior, es la tecnología en muchas ocasiones la que permite convertir en hechos los planes y proyectos; y abrir nuevas perspectivas en el pensamiento humano. Ante la interacción inevitablemente mayor entre la biología molecular y la medicina, sería deseable que diferentes sectores de la medicina nacional tuvieran un plan de desarrollo concertado para incorporar nuevas tecnologías al país, algunas de ellas derivadas de la biología molecular. Ello implicaría la obtención y administración de recursos económicos para investigación, desarrollo y entrenamiento de recursos humanos.

En este último renglón, se podría lograr que el currículo de la carrera de médico cirujano enfatizara no sólo los conceptos básicos de la biología molecular, sino también sus técnicas y aplicaciones prácticas a la medicina.

Estamos convencidos de que este es el único camino para que la medicina mexicana esté en la posición adecuada para asimilar los desarrollos internacionales, hacer contribuciones fundamentales, y enfrentar con lucidez las implicaciones morales, éticas y filosóficas de la medicina del futuro.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo entusiasta a este trabajo por parte del Dr. Antonio Velázquez A., Jefe de la Unidad de Genética de la Nutrición de la Universidad Nacional Autónoma de México. Asimismo, agradecemos a la Méd. Cir. Verónica Álvarez S. y al Dr. Edmundo Calva C. sus comentarios al manuscrito.

REFERENCIAS

1. BOLIVAR ZAPATA, F.: *Ingeniería genética molecular*. Ciencia, 1980; 31: 155.
2. WHITE, R.L.: *DNA in medicine: human genetics*. Lancet, 1984; ii: 1257.
3. WOO, S.L.C.; LIDSKY, A.S.; GÜTTLER, F.; THIRUMALACHARY, C. y ROBSON, K.J.H.: *Prenatal diagnosis of classical phenylketonuria by gene mapping*. JAMA, 1984; 251: 1998.
4. WOO, S.L.C.: *Prenatal diagnosis and carrier detection of classic phenylketonuria by gene analysis*. Pediatrics, 1984; 74: 412.
5. ORKIN, S.H.: *Genetic diagnosis by DNA analysis: progress through amplification*. N. Eng. J. Med. 1987; 317: 1023.
6. MARTIN, J.B.: *Genetic linkage in neurologic diseases*. N. Eng. J. Med. 1987; 316: 1018.
7. EMBURY, S.H.; SCHARF, S.J.; SAIKI, R.K.; GHOLSON, M.A.; GOLBUS, M.; ARNHEIM, M. y ERLICH, H.A.: *Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis*. N. Eng. J. Med. 1987; 316: 656.

8. DARRAS, B.T.; HARPER, J.F. y FRANCKE, U.: *Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy*. N. Eng. J. Med. 1987; 316: 985.
9. KOGAN, S.C.; DOHERTY, M. y GITSCHIER, J.: *An improved method of prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences: application to hemophilia*. A. N. Eng. J. Med. 1987; 317: 985.
10. MEISSEN G.J.; MYERS, R.H.; MASTROMAURO, C.A.; KOROSCHETZ, W.J.; BIRD, E.D. y MARTIN, J.B.: *Predictive testing for Huntington's disease with use of a linked DNA marker*. N. Eng. J. Med. 1988; 318: 535.
11. DILELLA, A.G., HUANG, W. -M. y WOO, S.L.C.: *Screening for phenylketonuria mutations with the polymerase chain reaction*. Lancet, 1988; i: 497.
12. FELDMAN, G.L., WILLIAMSON, R.; BEAUDET, A.L. y O'BRIEN, W.E.: *Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism*. Lancet, 1988; ii:102.
13. WILLIAMS, C.; WILLIAMSON, R.; COUTELLE, C.; LOEFFLER, F.; SMITH, J. y IVINSON, A.: *Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification*. Lancet, 1988; ii: 102.
14. SLAMON, D.J.: *Proto-oncogenes and human cancer*. N. Eng. J. Med. 1987; 317: 955.
15. LAYTON, D.M.; MUFTI, G.J.; LYONS, J.; JANSSEN, J.W.G. y BARTRAM, C.R.: *Loss of ras oncogene mutation in a myelodysplastic syndrome after low-dose cytarabine therapy*. N. Eng. J. Med. 1988; 318: 1468.
16. WACHSMUTH, K.: *Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks*. Rev. Infect. Dis. 1986; 8: 682.
17. DE ROSSI, A.; AMADORI, A; CHIECO-BIANCHI, L.; GIACQUINTO, C., ZACCHELLO, F.; BUCHBINDER, A.; WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C. y PECKHAM, C.S.: *Polymerase chain reaction and in-vitro antibody production for early diagnosis of paediatric HIV infection*. Lancet, 1988; ii: 278.
18. HELMINEN, P.; EHMHOLM, C.; LOKKI, M. J.; JEFFREYS, A. y PELTONEN L.: *Application of DNA "fingerprints" to paternity determinations*. Lancet, 1988; i: 574.
19. TALAMO, R.C.; ROSENSTEIN, B.J. y BERNINGER, R.W.: *Cystic Fibrosis*. En: Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B.; Fredrickson, D.S.; GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (eds.) *The metabolic basis of inherited disease*. Nueva York. McGraw-Hill, 1983, Pág. 1889.
20. SUPER, M.: *Prenatal diagnosis of cystic fibrosis*. Lancet, 1986; i: 510.
21. LATHROP, G.M.; FARRALL, M.; O'CONNELL, P.; WAINWRIGHT, B.; LEPPERT, M; NAKAMURA, Y.; LENCH, N.; KRUYER, H.; DEAN, R. y WHITE, R.: *Refined linkage map of chromosome 7 in the region of the cystic fibrosis gene*. Am. J. Hum. Genet. 1988; 42: 38.
22. WHITE, R.; LEPPERT, M.; BISHOP, D.T.; BARKER, D.; BERKOWITZ, J.; BROWN, C.; CALLAHAN, P.; HOLM, T. y JEROMINSKI, L.: *Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes*. Nature, 1985; 314: 101.
23. DONNIS-KELLER, H.; GREEN, P.; HELMS, C.; CARTINHO, S.; WEIFFENBACH, B.; STEPHENS, K.; KEITH, T.P.; BOWDEN, D.W.; SMITH, D.R.; LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D.; AKOTS, G.; REDIKER, K.S.; GRAVIUS, T.; BROWN, V.A.; RISING, M.B.; PARKER, C.; POWERS, J.A.; WATT, D.E.; KAUFFMAN, E.R.; BICKER, A.; PHIPPS, P.; MULLER-KAHLE, H.; FULTON, T.R.; NG, S.; SCHUMM, J.W.; BRAMAN, J.C.; KNOWLTON, R.G.; BARKER, D.F.; CROOKS, S.M., LINCOLN, S.E. y DALY, M.J. y ABRAHAMSON, J.: *A genetic linkage map of the human genome*. Cell, 1987; 51: 319.
24. LENCH, N.; STANIER, P. y WILLIAMSON, R.: *Simple non invasive method to obtain DNA for gene analysis*. Lancet, 1988; i: 1356.
25. DORIN J.R.; NOVAK, M.; HILL, R.E.; BROCK, D.J.H.; SECHER, D.S. y VAN HEYNIGEN, V.: *A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene*. Nature, 1987; 326: 614.

Donativos

Este trabajo fue apoyado por donativos del Fondo de Estudios e Investigaciones "Ricardo J. Zevada" (núm. 15/85) y de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (de marzo de 1987 a marzo de 1988).