

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Estandarización y validación de la amplificación de los 18 exones del gen LDLR para la implementación de una prueba diagnóstica de detección de riesgo de hipercolesterolemia familiar**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Camila Maas Esquivel  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,

2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



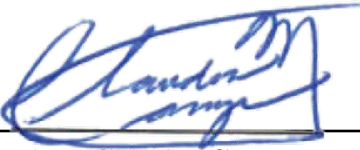
**Estandarización y validación de la amplificación de los 18 exones del gen LDLR para la implementación de una prueba diagnóstica de detección de riesgo de hipercolesterolemia familiar**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Camila Maas Esquivel  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

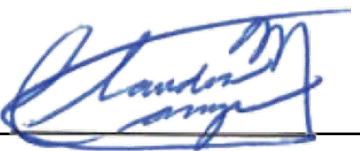
Guatemala,

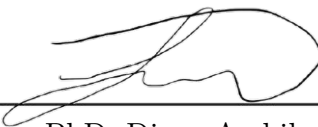
2022

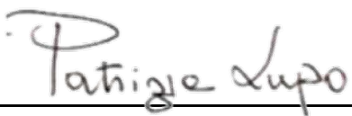
Vo.Bo.:

(f)   
PhD. Claudia Carranza

Tribunal Examinador:

(f)   
PhD. Claudia Carranza

(f)   
PhD. Diego Archila

(f)   
PhD. Patrizia Lupo

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre de 2022.



La elaboración de la presente tesis surge del interés personal de poner en práctica los conocimientos adquiridos durante los últimos años y el deseo de contribuir a la sociedad mediante técnicas diagnósticas de biología molecular.

Quiero agradecer principalmente a Dios y a mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria, agradezco cada consejo y muestras de ánimo, a mis hermanos por su apoyo y cariño durante este largo viaje.

A las instituciones que estuvieron involucradas en la realización de este trabajo. A la Universidad del Valle de Guatemala por haberme formado como una profesional y darme las herramientas necesarias, a los catedráticos por compartir su conocimiento. Especialmente, me gustaría agradecer a mis asesores de tesis, el PhD. Diego Archila y la PhD. Claudia Carranza por todo su apoyo en la elaboración de este trabajo.

Finalmente me gustaría agradecer a todos los amigos que tuve la oportunidad de hacer durante estos 5 años, gracias por las risas, los momentos en el laboratorio y todo lo compartido, sin duda hicieron mi experiencia en la Universidad mucho mejor.

<b>Prefacio</b>	<b>III</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>X</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	3
2.2. Objetivos específicos . . . . .	3
<b>3. Justificación</b>	<b>4</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>5</b>
4.1. Generalidades del colesterol . . . . .	5
4.2. Hipercolesterolemia Familiar (FH) . . . . .	6
4.3. Incidencia de FH . . . . .	6
4.4. Genética de la FH . . . . .	8
4.4.1. <i>LDLR</i> . . . . .	8
4.4.2. <i>ApoB100</i> . . . . .	9
4.4.3. <i>PCSK9</i> . . . . .	9
4.4.4. <i>LDLRAP1</i> . . . . .	9
4.5. Implicación con enfermedades cardiovasculares . . . . .	11
4.6. Diagnóstico . . . . .	13
4.6.1. Diagnóstico clínico . . . . .	13
4.6.2. Diagnóstico genético . . . . .	13
4.7. Terapias . . . . .	16
4.7.1. Estatinas . . . . .	16
4.7.2. Ezetimiba . . . . .	16
4.7.3. Inhibidores de PCSK9 . . . . .	17
4.7.4. Intervenciones quirúrgicas . . . . .	17
<b>5. Alcance</b>	<b>18</b>

<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>19</b>
6.1. Consideraciones éticas y obtención de muestras . . . . .	19
6.2. Extracción y purificación de ADN . . . . .	20
6.3. Cuantificación de ADN . . . . .	20
6.4. Estandarización de PCR de punto final . . . . .	20
6.5. Visualización de productos de amplificación . . . . .	21
6.6. Secuenciación de Sanger . . . . .	21
6.7. Análisis de resultados . . . . .	22
6.7.1. Análisis de electroforesis en gel de agarosa . . . . .	22
6.7.2. Análisis de secuencias . . . . .	22
<b>7. Resultados</b>	<b>23</b>
7.1. Estandarización de la amplificación del gen LDLR . . . . .	23
7.1.1. Extracción y purificación de ADN . . . . .	23
7.1.2. Amplificación de los 18 exones del gen LDLR . . . . .	24
7.2. Visualización del los productos de PCR . . . . .	24
7.3. Análisis de secuenciación de Sanger . . . . .	27
<b>8. Discusión</b>	<b>30</b>
8.1. Efectos de las condiciones del programa de amplificación . . . . .	31
8.2. Efectos de los componentes en la mezcla de reacción . . . . .	31
8.3. Efectos de las condiciones de electroforesis . . . . .	33
8.4. Análisis de secuencias . . . . .	34
<b>9. Conclusiones</b>	<b>37</b>
<b>10.Recomendaciones</b>	<b>38</b>
<b>11.Bibliografía</b>	<b>39</b>
<b>12.Anexos</b>	<b>43</b>
12.1. Efecto de las condiciones del programa de amplificación . . . . .	47
12.2. Efecto de los componentes en la mezcla de reacción . . . . .	48
12.3. Efecto de las condiciones de electroforesis . . . . .	50
12.4. Secuencias del gen LDLR estudiadas . . . . .	50
12.4.1. Muestra 1 . . . . .	50
12.4.2. Muestra 2 . . . . .	58
12.4.3. Congruencia entre cebadores . . . . .	66
12.4.4. Alineamiento con secuencia de referencia . . . . .	76
12.5. Variantes detectadas . . . . .	85

---

## Lista de figuras

---

4.1. Ciclo de vida del receptor LDL [5] . . . . .	6
4.2. Prevalencia mundial de FH [2] . . . . .	7
4.3. Signos de hipercolesterolemia familiar [34] . . . . .	7
4.4. Gen y proteína LDLR [53] . . . . .	8
4.5. Defectos en el catabolismo de cLDL[4] . . . . .	10
4.6. Desarrollo de placa aterogénica y oclusión arterial [4] . . . . .	12
4.7. Impacto de mutaciones de FH en el desarrollo de EC [27]. . . . .	12
4.8. Terapias predominantes de FH [13] . . . . .	16
6.1. Diagrama de flujo de la metodología. . . . .	19
7.1. Amplificación de los exones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen LDLR mediante PCR de punto final	25
7.2. Amplificación de los exones 8, 9, 10, 11, 12, 13-14, 15, 15, 17, 18 y 1 del gen LDLR mediante PCR de punto final . . . . .	26
7.3. Ubicación esquemática de los cebadores utilizados en la amplificación del gen LDLR	28
8.1. Comparación de PCR convencional y Hot Start . . . . .	33
12.1. Procedimiento de extracción de ADN con Kit comercial <i>Gentra</i> <sup>®</sup> <i>Puregene</i> <sup>®</sup> <i>Hand-</i> <i>book QIagen</i> [45] . . . . .	44
12.2. Procedimiento de cuantificación de ADN utilizando el fluorómetro <i>Quantus Promega</i> <sup>®</sup> [44] . . . . .	45
12.3. Efecto de la temperatura de hibridación en la amplificación mediante PCR de punto final . . . . .	47
12.4. Efecto del número de ciclos en la amplificación mediante PCR de punto final . . . .	48
12.5. Efecto de la concentración de plantilla de ADN en la amplificación mediante PCR de punto final . . . . .	48
12.6. Efecto de la concentración de cebadores en la amplificación mediante PCR de punto final . . . . .	49
12.7. Comparación de la enzima <i>Go Taq</i> <sup>®</sup> <i>DNA Polymerase</i> y <i>Platinum</i> <sup>™</sup> <i>Taq DNA Poly-</i> <i>merase</i> en la amplificación mediante PCR de punto final. . . . .	49
12.8. Efecto de condiciones de electroforesis . . . . .	50
12.9. Congruencia entre cebadores F y R del exón 1. . . . .	66
12.10Congruencia entre cebadores F y R del exón 2. . . . .	67
12.11Congruencia entre cebadores F y R del exón 3. . . . .	68
12.12Congruencia entre cebadores F y R del exón 4. . . . .	68
12.13Congruencia entre cebadores F y R del exón 5. . . . .	69
12.14Congruencia entre cebadores F y R del exón 6. . . . .	69

12.15	Congruencia entre cebadores F y R del exón 7. . . . .	70
12.16	Congruencia entre cebadores F y R del exón 8. . . . .	70
12.17	Congruencia entre cebadores F y R del exón 9. . . . .	71
12.18	Congruencia entre cebadores F y R del exón 10. . . . .	71
12.19	Congruencia entre cebadores F y R del exón 11. . . . .	71
12.20	Congruencia entre cebadores F y R del exón 12. . . . .	72
12.21	Congruencia entre cebadores F y R del exón 13-14. . . . .	72
12.22	Congruencia entre cebadores F y R del exón 15. . . . .	73
12.23	Congruencia entre cebadores F y R del exón 16. . . . .	73
12.24	Congruencia entre cebadores F y R del exón 17. . . . .	74
12.25	Congruencia entre cebadores F y R del exón 18. . . . .	75
12.26	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 1 . . . . .	76
12.27	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 2 . . . . .	77
12.28	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 3 . . . . .	78
12.29	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 4 . . . . .	79
12.30	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 5 . . . . .	79
12.31	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 6 . . . . .	80
12.32	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 7 . . . . .	80
12.33	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 8 . . . . .	81
12.34	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 9 . . . . .	81
12.35	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 10 . . . . .	82
12.36	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 11 . . . . .	82
12.37	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 12 . . . . .	83
12.38	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exones 13-14 . . . . .	83
12.39	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 15 . . . . .	84
12.40	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 16 . . . . .	84
12.41	Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 17 . . . . .	85
12.42	Variante heterocigota c.941-148A>AG en intrón 6-7 del gen LDLR. . . . .	85
12.43	Variante homocigota c.1060+7T>C y variante heterocigota c.1060+10G>GC en intrón 7-8 del gen LDLR. . . . .	86
12.44	Variante heterocigota c.1359-30C>CT en intrón 9-10 del gen LDLR. . . . .	86
12.45	Variante heterocigota c.1413A>AG en exón 10 del gen LDLR. . . . .	87
12.46	Variante heterocigota c.1706-55A>AC en intrón 11-12 del gen LDLR. . . . .	87
12.47	Variante heterocigota c.1773C>CT en exón 12 del gen LDLR. . . . .	88
12.48	Variante heterocigota c.1959T>TC en exón 13-14 del gen LDLR. . . . .	88
12.49	Delección c.1846-96_1846-93del en intrón 12-13 del gen LDLR. . . . .	89
12.50	Variante homocigota c.2232A>G en exón 15 del gen LDLR. . . . .	89
12.51	Variante heterocigota c.2389+46C>CT en intrón 16-17 del gen LDLR. . . . .	90
12.52	Variante heterocigota c.2390-136G>GA en intrón 16-17 del gen LDLR. . . . .	90
12.53	Variante heterocigota c.2548-80G>GA en intrón 17-18 del gen LDLR. . . . .	91
12.54	Variante heterocigota c.2548-42A>AG en intrón 17-18 del gen LDLR. . . . .	91
12.55	Variante heterocigota c.2548-19G>GA en intrón 17-18 del gen LDLR. . . . .	92
12.56	Variante heterocigota c.*52G>GA en exón 18 del gen LDLR. . . . .	92
12.57	Variante homocigota c.*315G>C en exón 18 del gen LDLR. . . . .	93
12.58	Cantidad de mutaciones exónicas detectadas. . . . .	93
12.59	Mutaciones benignas y probablemente benignas identificadas . . . . .	94

---

## Lista de cuadros

---

4.1. Variantes más comunes de LDLR causantes de FH en Latino América [36]. . . . .	11
4.2. Ventajas y limitaciones de las técnicas diagnósticas genéticas de FH [38]. . . . .	15
7.1. Concentración de ADN obtenido a partir de la extracción de ácidos nucleicos mediante el kit comercial <i>Gentra<sup>®</sup>Puregene<sup>®</sup> Handbook QIagen</i> . . . . .	23
7.2. Condiciones estandarizadas de amplificación de los 18 exones del gen LDLR . . . . .	24
7.3. Resultados de alineamiento local . . . . .	27
7.4. Mutaciones detectadas en el gen LDLR . . . . .	28
12.1. Secuencia de cebadores a utilizar y tamaño del amplicon esperado [62] . . . . .	46
12.2. Preparación de mezcla de reacción <i>Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase</i> [43]. . . . .	46
12.3. Preparación de mezcla de reacción <i>Platinum<sup>™</sup> Taq DNA Polymerase</i> [58]. . . . .	47

La Hipercolesterolemia Familiar (FH) es un trastorno genético de herencia autosómica dominante con una prevalencia de aproximadamente 30 millones de personas en todo el mundo (0.32 %). Se caracteriza principalmente por niveles plasmáticos elevados de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (cLDL) [4], lo que conlleva al desarrollo de placas ateroscleróticas y el riesgo de enfermedades cardiovasculares prematuras [13]. La causa principal de la FH se debe a mutaciones de pérdida de función en el gen receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Dada la importancia clínica y la alta prevalencia que presenta, la FH se ha convertido en un problema de salud pública. Sin embargo, esta enfermedad aun permanece poco diagnosticada y tratada. A nivel mundial solo el 9 % de las personas que la padecen se encuentran diagnosticadas. En América Latina, la prevalencia de FH es gran parte desconocida; específicamente en Guatemala no existen registros. Debido a ello, el objetivo principal de este estudio fue desarrollar un protocolo de diagnóstico genético para la amplificación de los 18 exones del gen LDLR, los cuales están asociados a hipercolesterolemia familiar. Esto se realizó mediante técnicas moleculares de extracción de ADN a partir de muestras de sangre venosa, seguido de una amplificación por PCR de punto final y visualización de productos por electroforesis en gel de agarosa, finalmente una validación por secuenciación de sanger. Fue posible estandarizar la amplificación del gen LDLR e identificar las bandas características de los 18 exones utilizando electroforesis en gel de agarosa. A partir del análisis de secuencias se determinó que las secuencias amplificadas pertenecen al gen LDLR en el cromosoma 19. Así mismo, se detectaron 17 variantes benignas y probablemente benignas en el gen LDLR, 6 de las cuáles corresponden a variantes exónicas sinónimas y 11 a variantes intrónicas previamente reportadas. Finalmente, se recomienda aumentar el número de muestras y analizar pacientes con fenotipos clínicos de FH para evaluar posibles mutaciones patogénicas.

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant-inherited genetic disorder with a prevalence of approximately 30 million people worldwide (0.32 %). It is mainly characterized by high plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDLc), [4], which leads to the development of atherosclerotic plaques and the risk of premature cardiovascular diseases [13]. The primary cause of FH is due to loss-of-function changes in the low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene. Given its clinical importance and high prevalence, FH has become a public health problem. However, this disease still remains poorly diagnosed and treated. Worldwide, only 9 % of people who suffer from it are diagnosed. In Latin America, the prevalence of FH is largely unknown; specifically in Guatemala there are no records. Because of this, the main objective of this study was to develop a genetic diagnosis protocol for the amplification of the 18 exons of the LDLR gene, which are associated with familial hypercholesterolemia. This was done by molecular techniques of DNA extraction from venous blood samples, followed by endpoint PCR amplification and product visualization by agarose gel electrophoresis and finally validation by Sanger Sequencing. It was possible to standardize the LDLR gene amplification and identify the characteristic bands of the 18 exons using agarose gel electrophoresis. From sequence analysis it was determined that the amplified sequences belong to the LDLR gene on chromosome 19. Likewise, 17 benign and probably benign variants were detected in the LDLR gene, 6 of which correspond to synonymous exonic variants and 11 to intronic variants. Finally, it is recommended to increase the number of samples and analyze patients with clinical FH phenotypes to evaluate possible pathogenic alterations.



A través de los años, la preocupación por los eventos cardiovasculares y enfermedades coronarias ha aumentado. Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que las enfermedades cardiovasculares causan 17.3 millones de muertes en el mundo cada año, y se estima que para el 2030 este valor alcance los 23.6 millones. La principal causa de los eventos cardiovasculares y enfermedades coronarias es el aumento de los niveles de colesterol en la sangre por encima de los niveles estimados [4]. Una de las enfermedades características de esto se conoce como hipercolesterolemia familiar (FH).

La FH es un trastorno genético de herencia autosómica dominante con una prevalencia de aproximadamente 1:250 en su forma heterocigota (HeFH) y 1:1000000 en su forma homocigota (HoHF). Se caracteriza principalmente por niveles plasmáticos elevados de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (cLDL) [4], lo que conlleva al desarrollo de placas ateroscleróticas y el riesgo de enfermedades cardiovasculares prematuras en pacientes con FH, especialmente en aquellos que no reciben tratamiento [13].

La causa principal de la FH se debe a mutaciones de pérdida de función en el gen receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Variantes en el gen de la apolipoproteína B (APOB), la proteína convertasa subtilisina/kexina gen tipo 9 (PCSK9) y la proteína adaptadora del receptor de LDL1 (LDLRAP1), también se han identificado, pero en menor proporción [10]. Según la base de datos de mutación de genes humanos (HGMD) se han reportado más de 1800 mutaciones en el gen LDLR en todo el mundo, en donde las mutaciones varían según cada región [54].

La FH acelera la enfermedad aterosclerótica coronaria de una a cuatro décadas [19]. Estudios han mostrado que el riesgo de presentar un infarto de miocardio antes de los 50 años es de aproximadamente 50 % en hombres y 30 % en mujeres sin tratamiento [30]. Dada la importancia clínica y la alta prevalencia que presenta, la FH se ha convertido en un problema de salud pública. Sin embargo, esta enfermedad aun permanece poco diagnosticada y tratada. A nivel mundial solo el 9 % de las personas que la padecen se encuentran diagnosticadas. En América Latina, la prevalencia de FH es gran parte desconocida; específicamente en Guatemala no existen registros, esto probablemente por la falta de conocimiento público sobre la FH y las limitadas técnicas para su diagnóstico [36].

Actualmente, el diagnóstico de FH se realiza mediante criterios clínicos, tales como antecedentes familiares, niveles basales de cLDL en plasma y manifestaciones cardiovasculares [35]. Recientemente, gracias a los avances en las técnicas moleculares de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y secuenciación, la identificación de mutaciones genéticas se ha facilitado, lo que ha permitido un

diagnóstico más certero [38].

Debido a ello, el objetivo principal de este estudio es desarrollar un protocolo de diagnóstico genético para la amplificación de los 18 exones del gen LDLR, los cuales están asociados a hipercolesterolemia familiar, con el fin de generar un diagnóstico certero que permita guiar un posible tratamiento y/o medidas preventivas para reducir el riesgo cardiovascular [49].

### 2.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo de diagnóstico genético para la amplificación de los 18 exones del gen *LDLR*, los cuales están asociados a hipercolesterolemia familiar.

### 2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la amplificación del gen *LDLR* mediante PCR punto final a partir de muestras de sangre venosa.
- Identificar los 18 exones del gen *LDLR* por medio de electroforesis en gel de agarosa.
- Validar la amplificación del gen *LDLR* para la detección de riesgo de hipercolesterolemia familiar mediante secuenciación de Sanger y análisis de secuencias.

La FH es el trastorno genético de herencia autosómica dominante más común, causado principalmente por mutaciones en los genes *LDLR*, *ApoB100* y *PCSK9* [4]. Se estima que afecta a unos 30 millones de sujetos en todo el mundo (0.32%) [2], aunque esta cifra puede ser mucho mayor; pues la mayoría de países no presenta registros de esta enfermedad, incluido Guatemala [36].

Generalmente, el diagnóstico se realiza hasta que se observan manifestaciones clínicas, como aterosclerosis y eventos cardiovasculares que conllevan a infartos de miocardio y muerte en pacientes menores de 50 años, especialmente en aquellos que no reciben tratamiento. Es por esto que, un diagnóstico certero temprano permite mejorar la calidad de vida de los pacientes al reducir el riesgo cardiovascular y la morbilidad asociada [13]. Actualmente, el diagnóstico se realiza mediante criterios clínicos y niveles de cLDL [35], sin embargo, debido a las variaciones individuales en estos criterios, para un diagnóstico definitivo de FH es necesario el uso de pruebas genéticas que utilizan técnicas moleculares como PCR y secuenciación para detectar una mutación identificada de FH [38].

A pesar de que el diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar se encuentra estandarizado y validado en países desarrollados [35], en Guatemala esta metodología no se realiza, por lo que no es posible diagnosticar esta enfermedad de manera certera y contar con registros a nivel nacional de la prevalencia de la misma.

Tomando en cuenta lo anterior, este estudio propone implementar el diagnóstico genético mediante amplificación del gen *LDLR* y secuenciación de sanger para la detección de riesgo de hipercolesterolemia familiar en Guatemala. Esto permitirá guiar un posible tratamiento y/o medidas preventivas para reducir el riesgo cardiovascular, así como obtener un registro de la prevalencia de FH a nivel nacional.

## 4.1. Generalidades del colesterol

El colesterol es un lípido esencial en la formación de la membrana plasmática y la transducción de señales celulares. También es el precursor de muchas moléculas de esteroides como sales biliares, hormonas y vitaminas. El colesterol celular se adquiere de dos fuentes, mediante la dieta o sintetizado intracelularmente por el hígado [4]. Debido a sus funciones complejas como precursor y su participación en vías metabólicas, el colesterol requiere una alta regulación para coordinar la entrada y salida de este.

El hígado es el órgano principal que regula la homeostasis del colesterol, así como la síntesis, secreción y eliminación de lipoproteínas. En el hígado, todas las células nucleadas expresan LDLR, los cuales permiten la internalización de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL son las principales transportadoras de colesterol en el organismo, están compuestas principalmente por ésteres de colesterol y moléculas apoB100. En los hepatocitos, las LDL se internalizan mediante el complejo LDLR-LDL y son sometidos a endocitosis y a una disminución de pH que permite el reciclaje del receptor y la degradación de colesterol (Figura 4.1) [5]. En este proceso interactúan también diversos puntos de control tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, por lo que si alguno de estos factores presenta variaciones, puede eventualmente resultar en niveles altos de LDL plasmático [47].

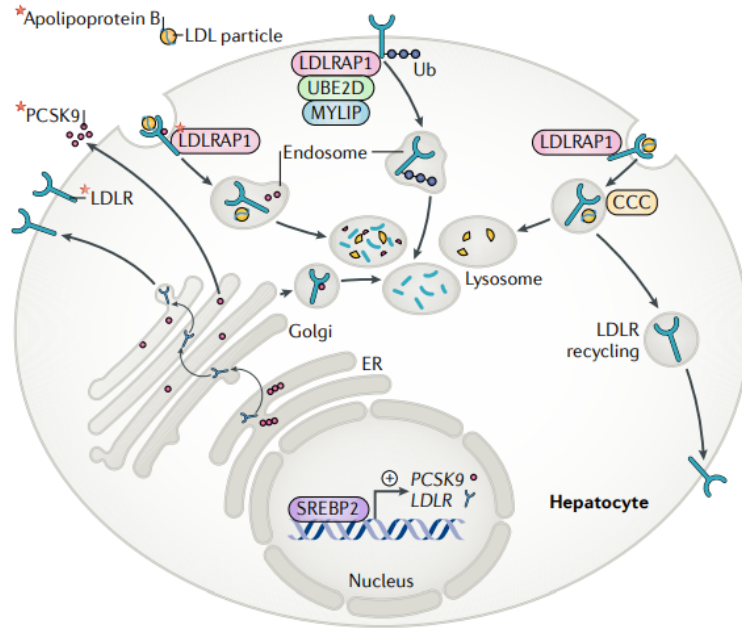


Figura 4.1: Ciclo de vida del receptor LDL [5].

Adaptado de: Berberich & Hegele, 2018.

## 4.2. Hipercolesterolemia Familiar (FH)

La hipercolesterolemia familiar (FH) es el trastorno genético de herencia autosómica dominante más común, perteneciente a la familia de las dislipidemias primarias [32]. Pacientes con FH se caracterizan por presentar niveles altos de colesterol total y principalmente colesterol de lipoproteínas de baja densidad (cLDL) circulante desde el nacimiento [46]. Esto da como resultado el rápido desarrollo de aterosclerosis y eventos cardiovasculares prematuros que resultan en infartos de miocardio y muerte en pacientes menores de 50 años, especialmente en aquellos que no reciben tratamiento [13], [17].

## 4.3. Incidencia de FH

La FH afecta a unos 30 millones de sujetos en todo el mundo (0.32%) y se estima que la prevalencia aumenta en 10 veces más en pacientes con cardiopatías isquémicas, 20 veces más en pacientes con cardiopatías isquémicas prematuras y 23 veces más en pacientes con hipercolesterolemia severa. Se conoce que las poblaciones fundadoras de este trastorno genético se encuentran en Canadá, Líbano y Sur África (Figura 4.2). Sin embargo, los últimos estudios realizados muestran que la prevalencia reportada de FH se ha obtenido principalmente de cohortes de Europa, América del Norte, Este de Asia y Australia. El meta análisis realizado por Beheshti y colaboradores obtuvo registros solo de 17 de los 195 países (9%), dejando 178 países con una prevalencia de FH incierta [2]. En América Latina y específicamente en Guatemala, la prevalencia de FH es desconocida [36].

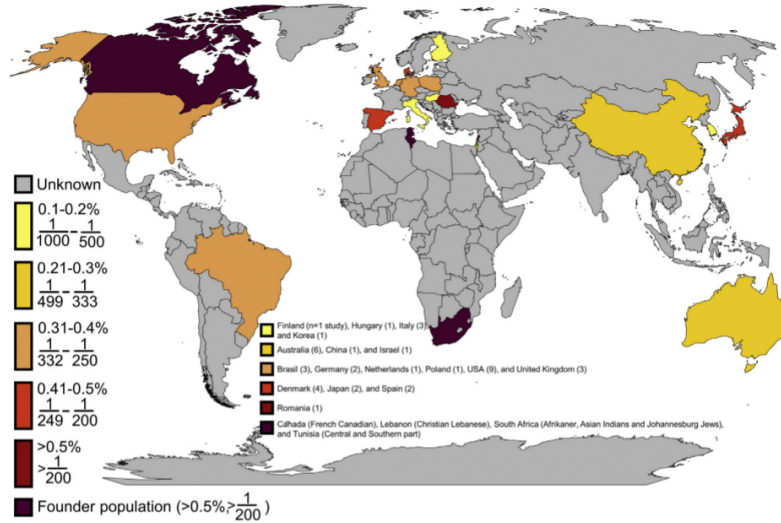


Figura 4.2: Prevalencia mundial de FH [2]

Adaptado de: Beheshti, *et al*, 2020.

## Tipos de FH

Se conocen dos tipos de FH, la homocigota (HoFH) y la heterocigota (HeFH). La HoFH es un desorden muy raro que afecta a 1 en un millón de personas en todo el mundo Y es causada por ambas copias mutadas en los alelos [32], [60]. La forma HoFH es la forma más grave, presenta manifestaciones clínicas de aterosclerosis, niveles plasmáticos de cLDL  $>500\text{mg/dL}$  sin tratamiento hipolipemiante o  $>300\text{ mg/dL}$  con tratamiento [20], angina de pecho, xantomas y/o arco corneal (Figura 4.3), reacciones inflamatorias debido a la acumulación de lípidos en los tendones y articulaciones e incluso fibrosis desde la primera década de vida [17], [32], [34]. Los pacientes con HoFH no tratados a menudo no llegan a la segunda década de vida.

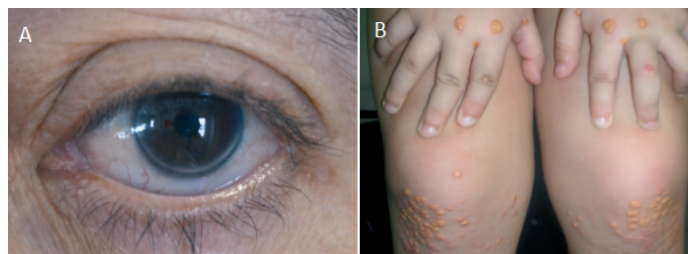


Figura 4.3: Signos de hipercolesterolemia familiar A) Arco corneal completo en un hombre  $<45$  años. B) Xantomonas eruptivos y planos en manos y rodillas de niño de 5 años con HoFH [34].

Adaptado de: Mata, 2014.

Por otro lado, la FH heterocigota (HeFH) es causada por una sola copia mutada y ocurre en 1 de cada 200-250 personas, estimándose que entre 6.8 y 8.5 millones de niños y adolescentes la padecen. Presenta niveles plasmáticos de cLDL que en general superan los  $190\text{mg/dL}$ . Los signos y síntomas clínicos son menos frecuentes y los eventos cardiovasculares se observan en edades más tardías entre los 30 y 50 años [30]. También se han descrito heterocigotos compuestos, individuos

con una mutación diferente en cada alelo del mismo gen o doble heterocigoto con mutaciones en dos diferentes genes que afectan el metabolismo del cLDL. Los pacientes heterocigotos generalmente presentan un fenotipo intermedio [32].

## 4.4. Genética de la FH

En la década de 1960, Khachadurian describió la herencia por primera vez al examinar los fenotipos de grandes familias libanesas. Alrededor del mismo tiempo, Fredrickson demostró que la FH era causada por el metabolismo anormal de lipoproteínas de baja densidad [14]. En 1973, el descubrimiento de Brown y Goldstein sobre la vía del receptor LDL (*LDLR*) representó un gran avance para el establecimiento de la base genética de la FH [18], [51].

La causa principal de FH se debe a una mutación de pérdida de función en el gen receptor de LDL (*LDLR*), lo que da como resultado una actividad nula o reducida del receptor en la superficie de los hepatocitos [32]. Este defecto resulta en un 85 a 90% de los casos de FH. Se han identificado mutaciones en otros 3 genes asociados con los fenotipos de FH, el *ApoB100* que causa del 5 al 10% de los casos, el *PCSK9* que causa el 2% de los casos y el *LDLRAP1*, que representa menos de 1% de los casos y generalmente conduce a una forma recesiva de FH [4]. Recientemente, se han identificado ciertas variantes patógenas en los genes *APOE* y *STAP1* que se relacionan con FH, sin embargo se siguen realizando estudios sobre estas debido a que poseen una frecuencia muy baja.

### 4.4.1. *LDLR*

El gen *LDLR* con un tamaño de 5.3kb se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.1-13.3), contiene 18 exones (Figura 4.4) y codifica para una proteína transmembrana de 860 aminoácidos y 6 dominios funcionales, encargada de internalizar partículas de LDL al hígado, en donde se metabolizan para eliminarlas del torrente sanguíneo [21].

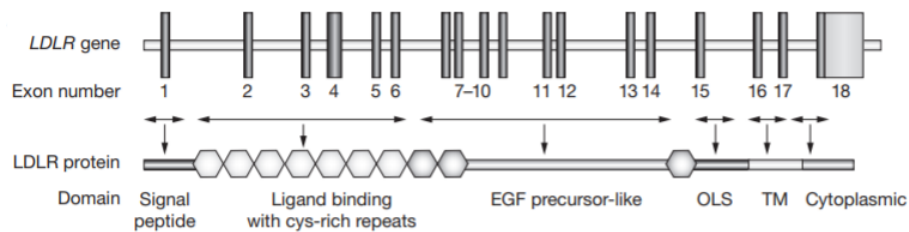


Figura 4.4: Gen y proteína LDLR. Los exones numerados se observan como barras oscuras verticales. Exones individuales o grupos de exones indicados por flechas codifican diferentes dominios de la proteína receptora LDL [53].

Adaptado de: Beheshti, *et al*, 2020.

Según la base de datos de mutación de genes humanos (HGMD), se han descrito más de 1800 mutaciones en el gen *LDLR* en todo el mundo, en donde de los 18 exones, la mayoría se presentan en el exón 4 [54]. Muchas variantes diferentes del gen *LDLR* se han descrito como patógenas, las mutaciones de variación del número de copias de ADN (VNC), sin sentido y de empalme se asocian comúnmente con niveles más altos de cLDL [12]. En 2019, Hori y colaboradores [22] evaluaron la ubicación de las variantes no sinónimas en el gen *LDLR* en una población japonesa de pacientes con HeFH, en donde se evidenció que en el exón 4 se encuentran la mayoría de variantes patógenas.



Conforme el efecto sobre el ciclo de la captación de LDL, las mutaciones del gen LDLR se clasifican en 5 tipos. La clase I se caracteriza por ausencia de receptores, en donde la proteína no es detectada (alelos nulos). La clase II codifica proteínas de transporte defectuoso entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Las mutaciones de clase III codifican proteínas que no reconocen LDL, resultando en una unión de ligando defectuosa. Las de clase IV presentan defectos en la internalización celular y las de clase V impiden que los receptores de LDL internalizados regresen a la superficie, por lo que se consideran reciclaje deficiente (Figura 4.5) [51]. Las mutaciones de clase II y III son las más reportadas, la mayoría de estas se encuentran localizadas en el dominio de homología al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o en el dominio de unión a ligando, por otro lado la mayoría de mutaciones clase IV se encuentran en el dominio citoplasmático o junto con el dominio TM [47].

#### 4.4.2. *ApoB100*

La apolipoproteína B100 (ApoB100) se encuentra en la superficie de las partículas de LDL y funciona como ligando de LDLR. Mutaciones en la región APOB que codifican el dominio estructural del ligando para LDL causan un fenotipo de FH conocido como APOB defectuoso (Figura 4.5). El cLDL no puede unirse a su ligando permaneciendo en el torrente sanguíneo [30]. Sin embargo, las variantes patogénicas de ApoB100 se asocian con niveles más bajos de cLDL que las observadas con las variantes de LDLR [4].

#### 4.4.3. *PCSK9*

El gen PCSK9 se encuentra en el cromosoma 1p32 y codifica la proteína convertasa subtilisina/kexina 9 que actúa como un inhibidor postranscripcional de LDLR al promover su degradación intracelular mientras se transporta a la membrana o extracelular, debido a una mayor afinidad (Figura 4.5) [11]. Las variantes cuasantes de FH del gen PCSK9 se conocen como ganancia de función al aumentar la degradación de los receptores e impedir la internalización de las partículas LDL. Se han reportado con mayor prevalencia en la población asiática.

Por otro lado, las variantes de pérdida de función del gen *PCSK9* causan una disminución de los niveles de cLDL plasmáticos y en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, de tal modo, se han evaluado en enfoques terapéuticos [6].

#### 4.4.4. *LDLRAP1*

El gen *LDLRAP1* codifica a la proteína adaptadora accesoria del receptor LDL 1 a través de su dominio citoplasmático, lo que permite el proceso de internalización del complejo LDL-LDLR. Mutaciones del gen *LDLRAP1* causan FH recesiva, en donde las mutaciones patogénicas en ambos alelos alteran la internalización del complejo LDL-LDLR [55].

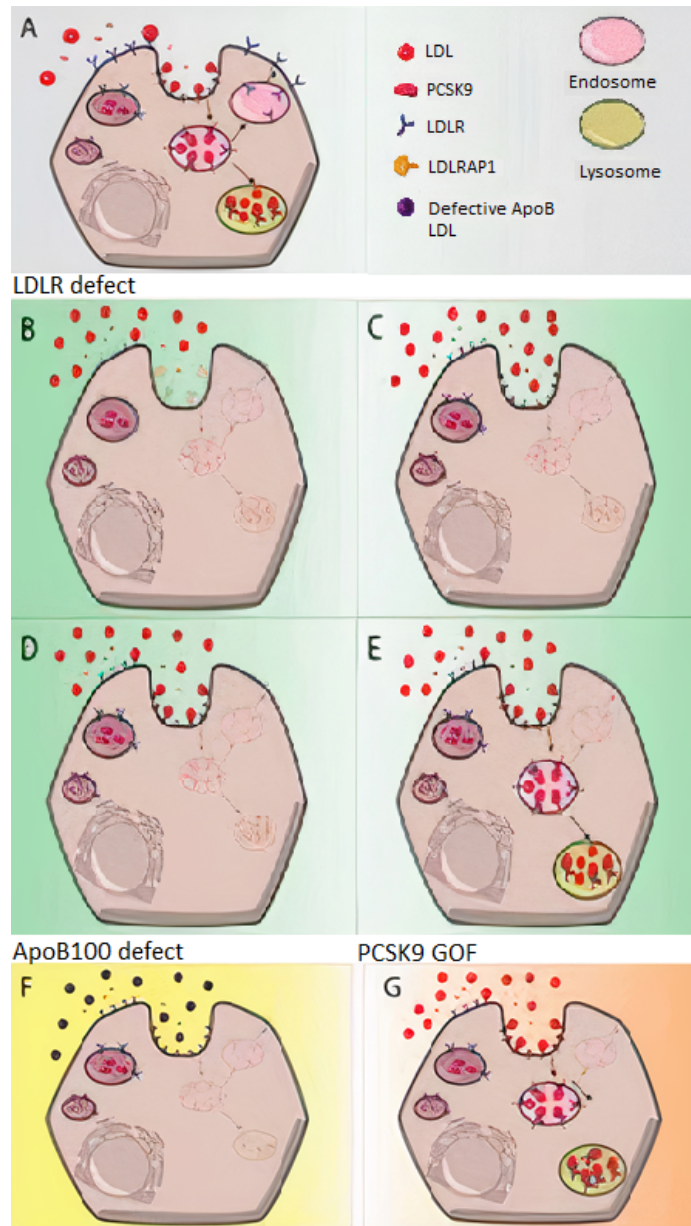


Figura 4.5: Defectos en el catabolismo de cLDL. A) Proceso de captación de LDL mediante LDLR. B) Mutación de *LDLR*, ausencia de receptores. C) Mutación de *LDLR*, unión de ligando defectuoso. D) Mutación de *LDLR*, internalización defectuosa. E) Mutación de *LDLR*, defecto de reciclaje. F) Mutación disfuncional de *ApoB100*. G) Mutación de ganancia de función *PCSK9* [4]

Adaptado de: Benito-Vicente, *et al*, 2018.

En América Latina, la caracterización genética sobre variantes de FH es poco conocida, México y Brasil son los países con mayor registro. En la actualidad, las mutaciones de FH más frecuentes encontradas en América Latina se encuentran en el gen *LDLR* y en menor cantidad, mutaciones autosómicas recesivas en *APOB* [36].

Cuadro 4.1: Variantes más comunes de LDLR causantes de FH en Latino América [36].

País	Exón	Mutación (Cambio de Nucleótido)
Brazil	1	c.4G>C
	4	c.662A>G
	4	c.530C>T
	7	c.1048C>T
	7	c.1027G>A
	7	c.977C>G
	8	c.1171G>A
	9	c.1291 G>A
	11	c.1618G>A
	12	c.1801G>C
	14	c.2043C>A
	14	c.2093G>A
	14	c.2096C>T
Costa Rica	4	c.681-699dup
	4	c.338insG
México	4	c.682G>A
	6	c.892G>C
	7	c.1055G>A
	7	c.1034 1035insA
	8	c.1090T>C
	10	c.1586G>A
	15	c.227delT
	15	c.2216C>T
	14	c.695-1G>T

## 4.5. Implicación con enfermedades cardiovasculares

Los pacientes con FH son considerados de alto riesgo cardiovascular (RCV) debido a los altos niveles de cLDL plasmático que promueven el desarrollo temprano de enfermedad coronaria y aterosclerosis.[4]. La aterosclerosis es la causa subyacente de la enfermedad cardiovascular, esta afecta la raíz aórtica, la aorta ascendente y descendente, los vasos periféricos, como las arterias femoral y renal, y se han reportado reacciones inflamatorias e incluso fibrosis desde la primera década de vida [32].

El cLDL presenta múltiples efectos nocivos, este promueve la inflamación vascular y la internalización patológica mediante macrófagos de la pared arterial sobrecargados de colesterol, los cuales se vuelven células espumosas y componen las placas aterogénicas hasta ocluir las arterias (Figura 4.6) [5].

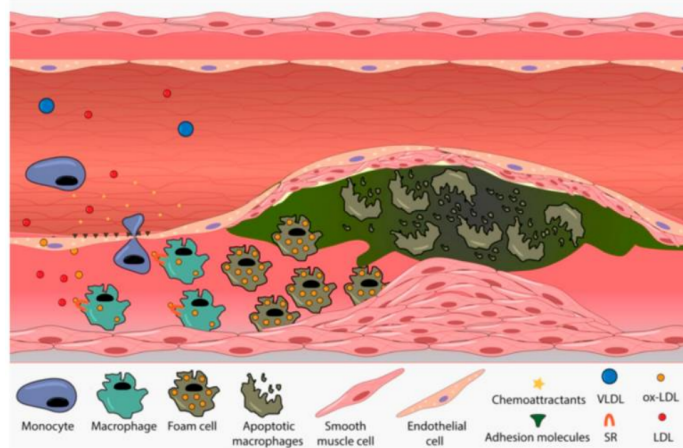


Figura 4.6: Desarrollo de placa aterosclerótica y oclusión arterial [4].

Adaptado de: Benito-Vicente, *et al*, 2018.

Así mismo, el estudio de Khera y colaboradores [27], demostró que en cualquier nivel de cLDL evaluado, el riesgo de enfermedades coronarias (EC) es mayor entre los portadores de mutaciones causante de FH (Figura 4.7).

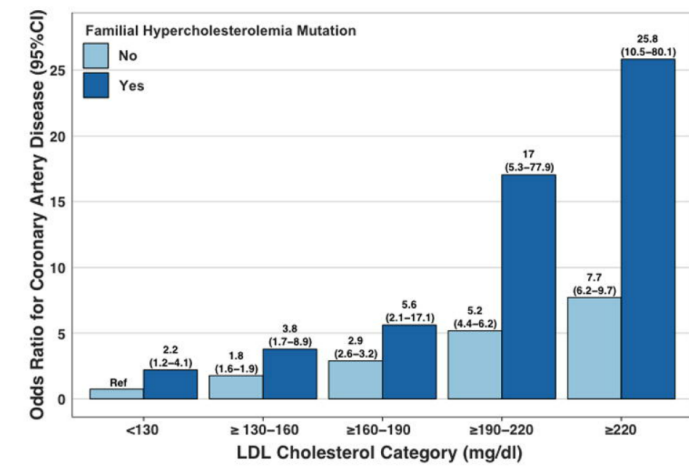


Figura 4.7: Impacto de mutaciones de FH en el desarrollo de EC [27].

Adaptado de: Khera, *et al*, 2016.

A pesar de esto, estudios han mostrado [13] que el riesgo de padecer eventos cardiovasculares y muerte temprana por enfermedad coronaria en pacientes con FH no depende únicamente de niveles altos de cLDL, sino también se ve influenciado por características como edad, tabaquismo, cHDL bajo, hipertensión y diabetes tipo 2 [49].

Así mismo, Humphries y colaboradores [23] evidenciaron la relación del número de mutaciones y RCV, en donde se evidenció que el RCV es mayor en los casos monogénicos de FH en comparación con los casos poligénicos.

## 4.6. Diagnóstico

El diagnóstico de FH se basa en criterios clínicos o pruebas genéticas, siendo este el diagnóstico definitivo. Sin embargo, hay algunos pacientes con diagnóstico clínico de FH y mutaciones no identificables en los genes asociados a la condición, lo que sugiere la participación de genes desconocidos o causas poligénicas. De igual manera existen casos de pacientes sin manifestaciones clínicas asociadas y con presencia de mutaciones identificadas. Por lo que, para un diagnóstico definitivo, se recomienda la combinación de un diagnóstico clínico y genético [46].

### 4.6.1. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de FH se basa en antecedentes personales o familiares, niveles de cLDL plasmáticos, presencia de enfermedad coronaria prematura (ECP) y manifestaciones clínicas como xantomas del tendón extensor y/o arco corneal [35]. Durante los últimos años se han desarrollado criterios para el diagnóstico clínico de FH, entre ellos, *Make Early Diagnosis to Prevent Early Death* (MEDPED) [61], *Simone Broome Register Group* (SBRG) [8] *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) y *The American Heart Association scientific* presentado en 2015 [35]. Estas herramientas son comparables y varían únicamente en el umbral de cLDL aceptable y la combinación de factores necesarios para un diagnóstico de FH.

Las manifestaciones clínicas han cambiado durante los últimos años probablemente debido a factores externos de cada paciente y a los medicamentos suministrados. Por ejemplo, se ha observado que el registro de antecedentes familiares con historia de aterosclerosis prematura solo ocurre en una minoría de pacientes definidos genéticamente con FH [57]. Así mismo, el estudio de Perez y colaboradores [41] mostró que las xantomas se presentan con una frecuencia menor a 15% y el arco corneal con una frecuencia de aproximadamente 30%. Finalmente, a pesar de considerar  $>190\text{mg/dL}$  el punto de corte de cLDL para pacientes, Abul-Husn y colaboradores [1] evaluaron la secuenciación de las variantes patogénicas de FH y determinaron que solo el 45% de pacientes portadores de variantes identificables presentaban niveles de cLDL  $>190\text{mg/dL}$ . Con base a eso, el fenotipo de FH es muy variable, y personas portadoras de las mismas mutaciones pueden exhibir diferentes perfiles lipídicos y clínicos, así como diferentes respuestas al mismo tratamiento [46].

### 4.6.2. Diagnóstico genético

Para la FH, el diagnóstico genético implica el análisis de variantes patogénicas (mutaciones puntuales y deleciones/inserciones) conocidas de los genes *LDLR*, *ApoB100*, *PCSK9* y *LDLRAP1* o la secuenciación del gen completo, ya que un porcentaje de pacientes con diagnóstico clínico de FH puede no presentar una mutación identificable [35].

Debido a que la forma más común de FH, la HeFH suele ser una enfermedad asintomática durante los primeros años de vida, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado que la FH cumple con los criterios para el cribado en cascada [34]. Este proceso consiste en evaluar a los miembros biológicos de la familia del presunto paciente, en donde se evalúan los niveles de cLDL que suelen ser el doble de los niveles de los miembros no afectados y una prueba genética determina la presencia o ausencia de variantes patogénicas en la mayoría de los casos. Ya que la FH es una enfermedad de transmisión autosómica dominante, el 50% de los familiares de primer grado portan la mutación y el 25% de los familiares de segundo grado [51].

Entre los beneficios del diagnóstico genético se puede mencionar que proporciona información de estratificación de riesgo, facilita las pruebas en cascada familiares para FH, permite precisión sobre asesoramiento genético y tiene implicaciones en opciones terapéuticas eficientes [57].

Recientemente se han reportado varias técnicas de diagnóstico molecular utilizado por FH, las principales ventajas y limitaciones de estas se muestran en el Cuadro 4.2.

### **Genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)**

Esta técnica consiste en medir las variaciones genéticas de polimorfismos de un solo nucleótido, se utiliza principalmente para diagnosticar FH causada por variaciones en los genes *ApoB100* y *PCSK9*, debido a que el número de mutaciones identificadas es limitada [38]. Además, se ha utilizado para evaluar múltiples SNP dentro de los genes que elevan los niveles de colesterol, seguido de la evaluación de la puntuación poligénica; con esto se busca una lista corta de SNP en variantes comunes que elevan el cLDL [15].

### **Biochip array**

Esta técnica fue desarrollada por *Randox Laboratories*, Reino Unido, para identificar las 40 variantes más comunes de Reino Unido e Irlanda causantes de FH en los genes *LDLR*, *ApoB100* y *PCSK9*, consta de dos biochips con 20 mutaciones cada uno. Durante este proceso cada mutación se amplifica en una PCR multiplex de alelo específico mediante un par de primers con una cola 5' de un lado y una molécula de biotina del otro lado. Si se detecta una mutación específica, el amplicón se hibridiza con una sonda complementaria de oligonucleótidos, luego mediante una reacción enzimática de biotina-estreptavidina se emite una señal quimioluminiscente, la cual es reconocida por un dispositivo de carga acoplado y un analizador [33].

Biochip array se encuentra certificada como conformidad Europea (CE) para diagnóstico *In Vitro*, en Europa [38].

### **Secuenciación de Sanger**

La Secuenciación de Sanger se basa en la polimerización de ADN y el uso de dideoxinucleótidos como terminadores de la reacción. Esta técnica ha permitido la detección de diversas mutaciones en los genes causantes de FH durante los últimos años, debido a que permite localizar variantes en grandes fragmentos de genes como exones, intrones, regiones promotoras, entre otros [38].

Mediante la Secuenciación de Sanger investigadores han analizado variantes en los 18 exones, límites exón-intrón y en la región promotora del gen *LDLR* en pacientes con FH [16]. Además se han determinado variantes en los genes *ApoB100* y *PCSK9*

### **Secuenciación de Nueva Generación (NGS)**

Actualmente, la NGS se considera la técnica principal para el diagnóstico de FH. Esto debido a la los diferentes tipos de secuenciación: paneles específicos de dislipidemias, secuenciación del exoma y secuenciación extensa del genoma completo en todos los genes involucrados con FH [38].

Los resultados de NGS también se pueden combinar con herramientas bioinformáticas para detectar VNC y predecir el efecto acumulado de alelos de riesgo para cada variante y su peso correspondiente en la aparición de FH al compararlos con estudios asociados al genoma completo [28].

## Amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiplex (MLPA)

La prueba de MLPA se basa en un PCR multiplex con "*Half-primers*" que se hibridizan entre sí en el mismo objetivo de ADN y se unen durante el paso de ligadura, seguido de un proceso de electroforesis capilar en condiciones de desnaturalización. La combinación de sondas SALSA MLPA-P062 LDLR se utiliza para detectar VNC en el gen *LDLR*, utilizando 33 sondas localizadas dentro del gen y una sonda *upstream* del gen *LDLR* [38].

Cabe mencionar que esta técnica para el diagnóstico de FH es poco común y generalmente se utiliza como prueba complementaria al genotipado de SNP o después de una prueba negativa de variantes de ADN con paneles de NGS específico debido a que existe controversias con las variaciones que puede detectar [38].

Cuadro 4.2: Ventajas y limitaciones de las técnicas diagnósticas genéticas de FH [38].

Diagnóstico genético	Ventajas	Limitaciones
Genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	Costo eficiente. Tiempo eficiente. Permite ampliar en ensayos multiplex SNP.	Analiza un solo SNP a la vez. Investiga solo mutaciones puntuales.
Biochip Array	Certificado ICD (basado en la población británica). Determina mutaciones a partir de una sola prueba.	Número fijo de mutaciones/SNP investigadas. Baja disponibilidad de datos publicados.
Secuenciación de Sanger	Costo y tiempo efectivo para pocas muestras Detecta fracciones de alelos menores del 5 % Analiza secuencias hasta 1000 bases Útil en la confirmación de NGS.	Poco rentable en alto número de muestras Baja escalabilidad
Secuenciación de Nueva Generación (NGS)	Secuenciación de múltiples genes simultáneamente. Alto rendimiento de muestras. Mayor posibilidad de encontrar variantes novedosas. Mayor sensibilidad.	Precio elevado. Poco eficiente para secuenciar pocos objetivos. Se necesita interpretación de grandes datos.
Amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiplex (MLPA)	Técnica estándar de oro para la identificación de CNV. Identifica varios objetivos en una sola reacción. Posee certificación IVD. Flujo de trabajo fácil. Costo eficiente.	Investigación solo en el gen LDLR. Incapaz de detectar anomalías a nivel de una sola célula. Incapaz de detectar mutaciones puntuales desconocidas.

## 4.7. Terapias

El objetivo principal de las intervenciones terapéuticas en FH es reducir los niveles plasmáticos de cLDL a través de la vía del receptor de LDL para aumentar la eliminación de colesterol y prevenir eventos cardiovasculares [32].

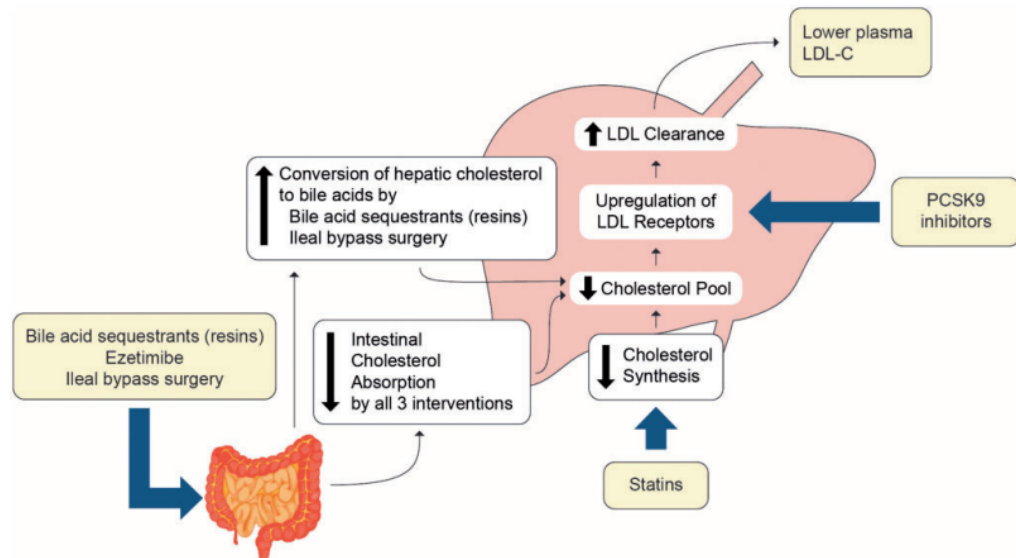


Figura 4.8: Terapias predominantes de FH [13].

Adaptado de: Ference, *et al*, 2017.

El tratamiento consiste en uso de fármacos hipolipemiantes, entre ellos:

### 4.7.1. Estatinas

Las estatinas son los medicamentos más utilizados para el manejo de la FH. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la HMG-CoA reductasa y la producción de metabolitos aguas abajo de la vía del mevalonato, lo cual es clave en la producción de colesterol intracelular. Como consecuencia, la producción de colesterol intracelular disminuye e induce la expresión de LDLR en los hepatocitos para reducir el cLDL circulante. Indirectamente, las estatinas aumentan la eliminación de cVLDL [4].

La respuesta a este fármaco varía en los fenotipos de FH y depende principalmente de la actividad residual de LDL. En algunos casos se recomienda esta terapia con fármacos combinados, ya que pacientes con mutaciones en el gen LDLR responden en menor proporción [46].

Generalmente, esta terapia debe ser suministrada toda la vida en sus dosis máximas, algunos estudios a largo plazo han evidenciado efectos adversos como dolor o debilidad muscular [56].

### 4.7.2. Ezetimiba

Ezetimiba es un inhibidor selectivo del colesterol proveniente de la absorción intestinal y las vías biliares al inhibir el transportador Nieman-Pick C1 like 1 (NPC1L1), resultando en una menor



entrega de colesterol al hígado y a un aumento de la expresión de LDLR [46].

#### **4.7.3. Inhibidores de PCSK9**

Los inhibidores de PCSK9 consisten en anticuerpos monoclonales (evolcumab y alirocumab) que al unirse con PCSK9 circulante impide la interacción de esta proteína con LDLR; o a una molécula de siARN en donde inhibe la síntesis de PCSK9 [46]. De esta manera LDLR no se degrada y se encuentra disponible en la superficie de hepatocitos para captar el cLDL circulante. Se recomienda el uso de inhibidores de PCSK9 en casos donde ni la estatina ni la ezetimida consiguen reducir el colesterol por debajo de los niveles recomendados [48].

#### **4.7.4. Intervenciones quirúrgicas**

La derivación portocava y el trasplante de hígado en pacientes con FH ha disminuido los niveles de cLDL en aproximadamente un 25 % y 80 % respectivamente [46] Debido a que las complicaciones que pueden generarse de las cirugías, estas se restringen a pacientes con FH grave y resistentes a las otras terapias [48].

Cabe destacar que junto con cualquier terapia farmacológica se debe recomendar una dieta baja en grasas saturadas, grasas trans y colesterol. Así como también actividad física para controlar el peso corporal [4].

El alcance de este trabajo de graduación consiste en la estandarización y validación de la amplificación de los 18 exones del gen LDLR para la implementación de una prueba diagnóstica de detección de riesgo de hipercolesterolemia familiar. De acuerdo al limitado diagnóstico, tratamiento y registro a nivel mundial de esta enfermedad, se opta por implementar la primera prueba genética diagnóstica en Guatemala en un laboratorio clínico, lo que permitirá un diagnóstico certero, guiar posibles tratamientos y/o medidas preventivas para reducir el riesgo cardiovascular y obtener un registro de la prevalencia de FH a nivel nacional.

Como consideraciones para este trabajo de graduación se tiene que al ser una enfermedad genética de herencia autosómica dominante, la prueba será capaz de detectar variantes en los 18 exones del gen LDLR mediante técnicas moleculares de amplificación por PCR de punto final y secuenciación de ADN.

Por limitaciones financieras y falta de pacientes confirmados genéticamente con hipercolesterolemia familiar en Guatemala, se utiliza una limitada cantidad de muestras aleatorias. En futuras fases del proyecto y con la prueba implementada en el laboratorio, se puede analizar la prevalencia de variantes patógenas del gen LDLR en la población guatemalteca, así como determinar la prevalencia de hipercolesterolemia familiar.

La metodología empleada consistió en 7 pasos principales presentados a continuación.



Figura 6.1: Diagrama de flujo de la metodología.

## 6.1. Consideraciones éticas y obtención de muestras

Se obtuvieron dos muestras retrospectivas de pacientes sanos, no diagnosticados con hipercolesterolemia familiar, asignados por el Centro de Diagnóstico Multimédica, TecniScan, ubicado en Blvd. Vista Hermosa 25-19, Zona 15, Edificio Multimédica, Guatemala. Las muestras fueron utilizadas como remanentes de casos ambulatorios trabajados en el Laboratorio. No se contó con información epidemiológica de los pacientes o porcentaje de hombres y mujeres, y estos fueron población no vulnerable.

El investigador se mantuvo totalmente desligado a información personal y contacto de los sujetos, únicamente se trabajó cada muestra con un código aleatorio. Es por ello que no se utilizó un consentimiento informado.

Las muestras consistieron en 3.0mL de sangre venosa, colectadas en tubos con ácido etilendia-

minotetraacético (EDTA).

Este trabajo de investigación fue sometido al comité de ética en investigación de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala y aprobado con el código BM-002-2022-18030.

## 6.2. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre venosa utilizando el Kit comercial *Gentra*<sup>®</sup> *Puregene*<sup>®</sup> *Handbook QIagen* [62] de acuerdo a las especificaciones del manual (*véase* Anexo 12.1). Brevemente, 300 $\mu$ L de muestra se mezclaron con 900 $\mu$ L de solución RBC y se centrifugó durante 1 minuto a 12,500 rpm. Seguido, para resuspender las células se añadieron 300 $\mu$ L de solución de lisis celular y 100 $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas. El sobrenadante se mezcló con 300 $\mu$ L de isopropanol y luego de un proceso de centrifugación se añadieron 300 $\mu$ L de etanol al 70%. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 150 $\mu$ L de Solución de Hidratación de ADN.

Todas las muestras de ADN extraídas fueron almacenadas a -4°C.

## 6.3. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó mediante espectrofotometría utilizando el fluorómetro *Quantus*, *Promega* preprogramado para los sistemas de tintes *Promega QuantiFluor*, utilizando el modo de ácido nucleicos ADN (DNA ONE) de acuerdo a las especificaciones del manual (*véase* Anexo 12.2).

El equipo determina la concentración de ADN en ng/ $\mu$ L. Para todas las mediciones se utilizó un estándar y como blanco se utilizó el colorante *QuantiFluor ONE dsDNA Dye*.

## 6.4. Estandarización de PCR de punto final

Se estandarizó la amplificación de los 18 exones del gen *LDLR* utilizando muestras de extracción de individuos no diagnosticados con hipercolesterolemia familiar. Se decidió realizar la amplificación solo del gen *LDLR* por.00que es el gen más prevalente causal de FH. Los cebadores utilizados fueron propuestos por por Yang y colaboradores (2007) [62] (*véase* Anexo 12.1). Con las secuencias de cebadores se realizaron PCR In-Silico utilizando el software UCSC In-Silico PCR [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=1466586739\\_jhJvCn7Vi9PMZex6RpeLVg1LIv9P](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=1466586739_jhJvCn7Vi9PMZex6RpeLVg1LIv9P)

Todos los cebadores fueron obtenidos de la casa comercial *Integrated DNA Technologies (IDT)*. Cada primer se reconstituyó con agua grado biología molecular según su concentración, se siguió la ecuación 6.1.

$$Agua = 10 * xnmoldecebador \quad (6.1)$$

Donde  $x$  es la concentración de cada cebador.

Seguido se realizaron alícuotas de cada cebador a 5 $\mu$ M, colocando en tubos de 1.5mL 95 $\mu$ L de agua grado biología molecular y 5 $\mu$ L de cebador.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 $\mu$ L, utilizando una mezcla de reacción de 1U/ $\mu$ L de *Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase* (Promega), 5X *Green reaction Buffer* 1X (Promega), 0.2mM de dNTPs, 200 nmol de cada cebador y 165 ng/ $\mu$ L de plantilla de ADN (véase Anexo 12.2) [26].

Para la corrida de reacciones se utilizó un Termociclador Applied Biosystems<sup>™</sup> SimpliAmp<sup>™</sup> ThermoFisher con la función VeriFlex<sup>™</sup>. El programa general consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por un minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación según cada exón por 30 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos. Finalmente, se realizó un paso de elongación a 72°C por 7 minutos y conservación (hold) a 4°C. Los productos de amplificación fueron almacenados a 4°C.

Con el fin de determinar la temperatura de hibridación ideal para los cebadores de cada exón se empleó la ecuación 6.2 [24] y se tomó el promedio de cebadores forward y reverse.

$$Tm = 64,9 + 41 * \frac{yG + zC - 16,4}{wA + xT + yG + zC} \quad (6.2)$$

Donde  $y$  es el número de bases de Guanina (G),  $z$  el número de bases de Citosina (C),  $w$  el número de bases de Adenina (A) y  $x$  el número de bases de Timina (T).

Posteriormente se realizaron modificaciones de la concentración de reactivos en la mezcla de reacción según cada exón. De 200nmol a 300nmol de cada cebador para los exones 11, 12 y 16. Se estandarizó una concentración de plantilla de ADN de 150ng/ $\mu$ L para los exones 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13-14, 15, 16, 17 y 18; y una concentración de 75ng/ $\mu$ L para los exones 4, 5 y 7. También se modificó el número de ciclos en la PCR de 35 a 30 para los exones 4, 6 y 7.

Para el exón 4 se implementó otra mezcla de reacción con un volumen total de 25 $\mu$ L, utilizando una 1U/ $\mu$ L de *Platinum<sup>™</sup> Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 10X *Reaction Buffer* incoloro 1X (Invitrogen), 50mM de cloruro de magnesio, 0.2mM de dNTPs, 1.0 $\mu$ L de KB Extender, 200 nmol de cada cebador y 75 ng/ $\mu$ L de plantilla de ADN (véase Anexo 12.3)[52][42].

En cada PCR se utilizó como control negativo interno una mezcla de reacción sin plantilla de ADN.

## 6.5. Visualización de productos de amplificación

La visualización de los productos de amplificación se realizó en geles de agarosa (Promega) al 2% en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-Base, acetato de sodio y EDTA), colocando de 3 a 5 $\mu$ L de escalera de peso molecular (50 pb) y de producto de PCR. En los casos que se utilizó mezcla de reacción de PCR incolora, se mezcló de 3 a 5  $\mu$ L de producto con 1  $\mu$ L de solución de carga 6X TriTrack Thermo Fisher. Para la tinción de ácidos nucleicos se utilizó 1 $\mu$ L de GelRed<sup>®</sup> 10,000X BIOTIUM añadido a la solución de agarosa previo a su polimerización.

La electroforesis se realizó dentro de cámaras *Thermo Fisher<sup>™</sup> Minigel Owl<sup>™</sup> EasyCast<sup>™</sup>* (Fisher Scientific) a un voltaje constante de 70V, una corriente de 500mA y un tiempo de corrida de 120 minutos. Los geles posteriormente fueron visualizados en el transiluminador de luz azul Safe Imager<sup>™</sup> 2.0 (ThermoFisher).

## 6.6. Secuenciación de Sanger

Para validar la amplificación del gen *LDLR*, los productos de amplificación de cada exón trabajado se secuenciaron en Psomagen, Inc. Se realizó de forma directa por el método de secuenciación

de Sanger, basado en la polimerización de ADN y el uso de dideoxinucleótidos.

Para cada exón se secuenciaron dos reacciones, una para la hebra sentido y otra para la anti-sentido. En tubos de 1.5mL se colocaron aproximadamente 40 $\mu$ L de producto de PCR. Así mismo, en tubos de 1.5mL se colocaron 15 $\mu$ L de cada cebador (*forward y reverse*) ya que se trabajó como cebadores enclosed, es decir que son los mismos utilizados para las PCR.

El proceso de purificación de producto de PCR se realizó en Psomagen, Inc. al igual que la secuenciación.

## 6.7. Análisis de resultados

### 6.7.1. Análisis de electroforesis en gel de agarosa

Las bandas observadas en cada gel fueron analizadas utilizando el programa GelAnalyzer, versión 19.1. El programa determina el peso molecular de las bandas tomando en cuenta el peso del marcador molecular y curvas RF.

### 6.7.2. Análisis de secuencias

Para confirmar la identidad de las amplificaciones de cada exón del gen LDLR y la especificidad de la técnica se realizó un análisis bioinformático. Los cromatogramas se visualizaron en BioEdit versión 7.2 y se determinó la calidad y resolución de estos para asegurar que si podrían ser analizados, además se realizó una limpieza de secuencias para recortar bases del inicio y final de las secuencias (Trimming). Luego, se comprobó que las secuencias sentido y antisentido de cada exón eran congruentes empleando un alineamiento ClustalMuscle (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation). Posteriormente, las secuencias fueron alineadas con la secuencia genómica de referencia NG\_009060.1gb [25] obtenida de la base de datos NCBI.

Así mismo, se evaluó la detección de posibles variantes utilizando el programa Mutation Surveyor, en dónde las secuencias se compararon con la secuencia genómica previamente descrita y se realizó una búsqueda de las variantes identificadas por el programa en bases de datos (NCBI, LOVD) para clasificarlas según su tipo y significancia clínica.

## 7.1. Estandarización de la amplificación del gen LDLR

Con el objetivo de estandarizar la amplificación del gen LDLR mediante PCR de punto final para desarrollar un protocolo de diagnóstico genético, se realizó una extracción de ADN a partir de muestras de sangre venosa y se evaluaron los componentes de la mezcla y las condiciones de amplificación para cada exón.

### 7.1.1. Extracción y purificación de ADN

Se obtuvieron 4 concentraciones de ADN pertenecientes a 2 muestras de sangre venosa de pacientes no diagnosticados con hipercolesterolemia familiar. Todas las muestras se extrajeron utilizando el kit comercial *Gentra® Puregene® Handbook QIagen* a partir de 300  $\mu\text{L}$  de sangre venosa completa. Fue posible obtener concentraciones adecuadas para la amplificación de cada exón. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 7.1

Cuadro 7.1: Concentración de ADN obtenido a partir de la extracción de ácidos nucleicos mediante el kit comercial *Gentra® Puregene® Handbook QIagen*

Muestra	Réplica	Concentración (ng/ $\mu\text{L}$ )
	1	83
1	2	156
	3	80
2	1	104
Media		106 $\pm$ 35

Todas las muestras presentaron concentraciones superiores a 75 ng/ng/ $\mu\text{L}$ . Se obtuvo una media de 106 ng/ $\mu\text{L}$  con una desviación y error estándar de 35 y 18 respectivamente.

### 7.1.2. Amplificación de los 18 exones del gen LDLR

Para la estandarización del gen LDLR se partió utilizando la enzima *Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase* (Promega) ya que se ha descrito como una enzima estándar para amplificación de PCR de punto final [37] y se ha utilizado en estudios previos de hipercolesterolemia familiar [26]. Tomando en cuenta las especificaciones recomendadas por el fabricante y las condiciones de amplificación descritas por los autores que propusieron las secuencias de cebadores, se evaluaron los componentes de la mezcla (Concentración de cebadores, plantilla de ADN y enzima utilizada) y las condiciones de amplificación (Temperatura de hibridación y Número de ciclos) para cada uno de los exones.

Se logró amplificar los 18 exones del gen LDL utilizando 17 reacciones distintas (ver cuadro 7.2). Cada exón se amplificó por separado a excepción de los exones 13-14 que se trabajaron en combinación, tomando un solo amplicon, esto fue posible porque las regiones se encuentran muy cercanas y el tamaño del intrón lo permite.

Cuadro 7.2: Condiciones estandarizadas de amplificación de los 18 exones del gen LDLR

Exón	T.a. (°C)	Concentración Cebadores (nanomoles)	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	Enzima Utilizada	No. Ciclos
1	55	200	150	Go Taq	35
2	56	200	150	Go Taq	35
3	58	200	150	Go Taq	35
4	61	200	75	Platinum Taq	30
5	57	200	150	Go Taq	35
6	58	200	75	Go Taq	30
7	58	200	75	Go Taq	30
8	55	200	150	Go Taq	35
9	56	200	150	Go Taq	35
10	56	200	150	Go Taq	35
11	55	300	150	Go Taq	35
12	55	300	150	Go Taq	35
13-14	55	200	150	Go Taq	35
15	57	200	150	Go Taq	35
16	55	300	150	Go Taq	35
17	56	200	150	Go Taq	35
18	56	200	150	Go Taq	35

El Cuadro 7.2 presenta las condiciones estandarizadas de cada uno de los exones del gen LDLR luego de confirmar su peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa. Se estandarizaron temperaturas de hibridación entre 55-61°C, concentración de cebadores de 2000 y 300 nM, concentración de plantilla de ADN de 75 y 150 ng/ $\mu$ L, número de ciclos entre 30 y 35 y dos distintas enzimas: *Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase*(Promega) y *Platinum<sup>™</sup> Taq DNA Polymerase*(Invitrogen).

## 7.2. Visualización del los productos de PCR

Con el objetivo de identificar los 18 exones del gen LDLR se visualizaron los productos de PCR por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed.

Cada reacción final se amplificó con un control negativo interno y en duplicado para obtener una cantidad adecuada de producto de PCR para secuenciar mediante secuenciación de Sanger.



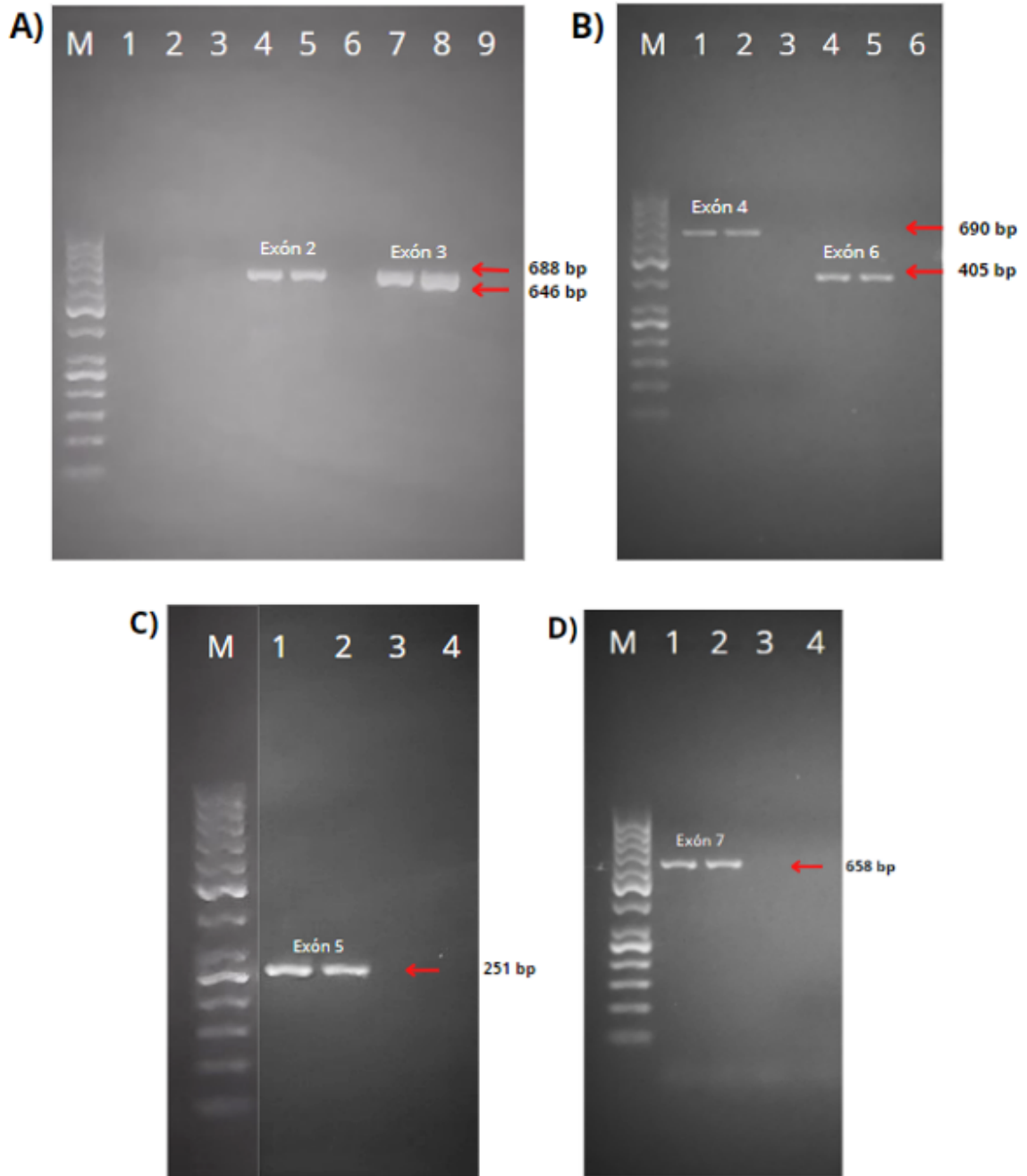


Figura 7.1: Amplificación de los exones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen LDLR mediante PCR de punto final. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. A) Exón 2 (688 pb), Exón 3 (646 pb) y controles negativos (Carril 6 y 9). B) Exón 4 (690pb), Exon 6(405pb) y controles negativos (Carril 3 y 6). C) Exón 5 (251pb) y control negativo (Carril 3). D) Exón 7 (658pb) y control negativo (Carril 3). M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

La Figura 7.1 muestra dos bandas a 688bp pertenecientes al exón 2, dos bandas a 646bp pertenecientes al exón 3, dos bandas a 690bp pertenecientes al exón 4, dos bandas a 251bp pertenecientes al exón 5, dos bandas a 405pb pertenecientes al exón 6 y dos bandas a 658bp pertenecientes al exón 7. Los controles negativos internos no presentan ninguna banda de amplificación.

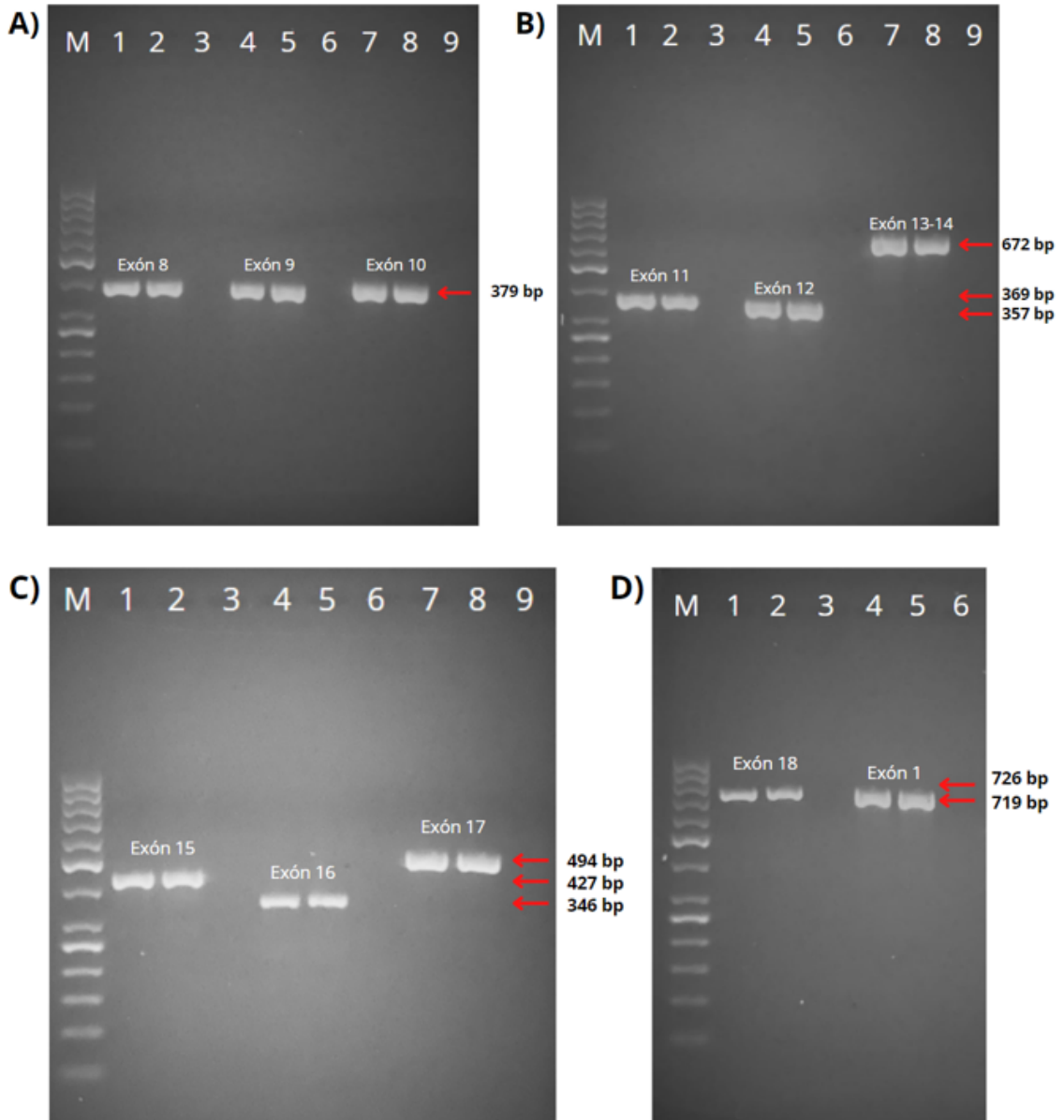


Figura 7.2: Amplificación de los exones 8, 9, 10, 11, 12, 13-14, 15, 15, 17, 18 y 1 del gen LDLR mediante PCR de punto final. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. A) Exón 8 (379pb), Exón 9 (379pb), Exón 10 (379pb) y controles negativos (Carril 3, 6 y 9 ). B) Exón 11 (369pb), Exón 12(357pb), Exón 13-14 (672pb) y controles negativos (Carril 3, 6 y 9). C) Exón 15 (427pb), Exón 16 (346pb), Exón 17 (494pb) y controles negativos (Carril 3,6 y 9). D) Exón 18 (726pb), Exon 1(719pb) y controles negativos (Carril 3 y 6 ). M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

La Figura 7.2 muestra dos bandas a 379bp pertenecientes a los exones 8, 9 y 10, dos bandas a 369bp pertenecientes al exón 11, dos bandas a 357bp pertenecientes al exón 12, dos bandas a 672bp pertenecientes a los exones 13-14, dos bandas a 427bp pertenecientes al exón 15, dos bandas a 346bp pertenecientes al exón 16, dos bandas a 494bp pertenecientes al exón 17, dos bandas a 726bp pertenecientes al exón 18 y dos bandas a 719bp al exón 1. Los controles negativos internos no presentan ninguna banda de amplificación.

### 7.3. Análisis de secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger se realizó con el objetivo de validar la amplificación del gen LDLR al confirmar la identidad de cada exón y a su vez la especificidad de la técnica. Para cada exón se secuenciaron dos reacciones, una para la hebra sentido y otra para la antisentido.

Se comprobó que las secuencias sentido y antisentido de cada exón eran congruentes mediante el alineamiento ClustalMuscle (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation). Así mismo, se logró identificar que los fragmentos amplificados pertenecen al gen LDLR en el cromosoma 19 mediante un alineamiento local (BLAST) 7.3.

Cuadro 7.3: Resultados de alineamiento local

Exón	Accession	Porcentaje de identidad	Max Score	Query Cover	Valor E
Exón 1	NG_009060.1	100.00 %	1201	100 %	0.0
Exón 2	NG_009060.1	100.00 %	1075	99 %	0.0
Exón 3	NG_009060.1	100.00 %	1079	99 %	0.0
Exón 4	NG_009060.1	100.00 %	872	99 %	0.0
Exón 5	NG_009060.1	100.00 %	339	100 %	1e-88
Exón 6	NG_009060.1	100.00 %	617	100 %	3e-172
Exón 7	AP023479.1	100.00 %	920	100 %	0.0
Exón 8	NG_009060.1	99.68 %	579	100 %	1e-160
Exón 9	NG_009060.1	99.68 %	564	100 %	3e-156
Exón 10	AP023479.1	99.70 %	614	100 %	3e-171
Exón 11	NG_009060.1	100.00 %	562	100 %	1e-155
Exón 12	NG_009060.1	99.65 %	529	100 %	1e-145
Exón 13-14	NG_009060.1	99.67 %	1103	100 %	0.0
Exón 15	AP023479.1	100.00 %	673	99 %	0.0
Exón 16	NG_009060.1	100.00 %	531	99 %	3e-146
Exón 17	NG_009060.1	99.77 %	811	100 %	0.0
Exón 18	AP023479.1	99.85 %	1199	100 %	0.0

El Cuadro 7.3 muestra los resultados del alineamiento local mediante BLAST ncbi. Se identificaron dos secuencias genómicas, NG\_009060.1 (Homo sapiens low density lipoprotein receptor (LDLR), RefSeqGene (LRG\_274) on chromosome 19) y AP023479.1 (Homo sapiens DNA, chromosome 19, nearly complete genome). Todos los alineamientos mostraron porcentajes de identidad mayores a 99% y porcentajes de cobertura entre 99% y 100%, lo que indica que la mayor parte de los contig se encuentran alineados. Así mismo, se identificaron valores E cercanos a 0 o inferiores, lo que indica alineamientos al azar de alta calidad.

A partir de esto, se generó un alineamiento ClustalMuscle con cada una de las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia de cada exón, esto con el fin de evaluar si la amplificación cubría todas las regiones exónicas (véase anexos 12.26 - 12.41). Se evidenció que todas las secuencias cubrían el 100% de las regiones de cada exón y entre un 10-20% de región intrónica (Figura 7.3).

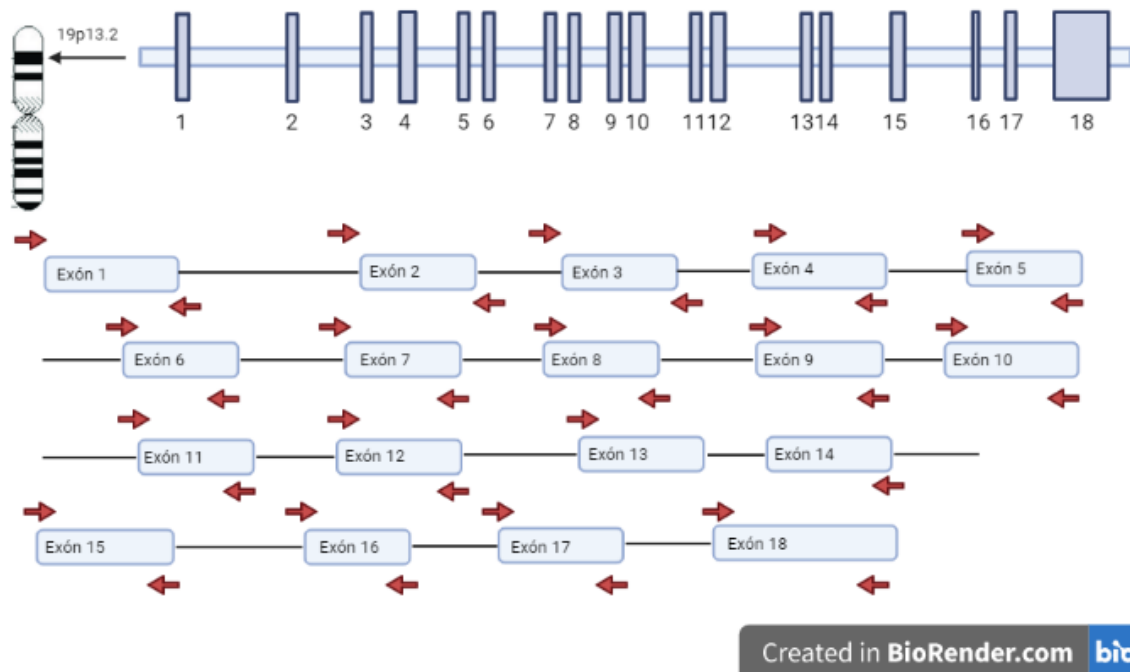


Figura 7.3: Ubicación esquemática de los cebadores utilizados en la amplificación del gen LDLR

Para evaluar posibles variantes en el gen LDLR se utilizó el programa Mutation Surveyor. Con las variantes detectadas se realizó una búsqueda de estas en bases de datos (NCBI, LOVD). Los resultados se muestran en el Cuadro 7.4.

Cuadro 7.4: Mutaciones detectadas en el gen LDLR

Región	Cambio de Nucleótido	Proteína	Tipo de mutación	Clasificación según LOVD	Cantidad de portadores
Variantes exónicas					
Exón 10	c.1413A>AG	p.(Arg471=)	Sinónima	Benigna	2
Exón 12	c.1773C>CT	p.(Asn591)	Sinónima	Benigna	2
Exón 13-14	c.1959T>TC	p.(Val653=)	Sinónima	Benigna	2
Exón 15	c.2232A>G	p.(Arg744=)	Sinónima	Benigna	2
Exón 18	c.*52G>GA	-		Benigna	2
Exón 18	c.*315G>C	-		Probablemente benigna	2
Variantes intrónicas					
Intrón 6-7	c.941-148A>AG			Benigna	2
Intrón 7-8	c.1060+7T>C			Benigna	2
Intrón 7-8	c.1060+10G>GC			Benigna	2
Intrón 9-10	c.1359-30C>CT			Benigna	2
Intrón 11-12	c.1706-55A>AC			Probablemente benigna	2
Intrón 12-13	c.1846-96_1846-93del			Probablemente benigna	2
Intrón 16-17	c.2389+46C>CT			Probablemente benigna	2
Intrón 16-17	c.2390-136G>GA			Probablemente benigna	2
Intrón 17-18	c.2548-80G>GA			Benigna	2
Intrón 17-18	c.2548-42A>AG			Benigna	2
Intrón 17-18	c.2548-19G>GA			Benigna	1

En total, se detectaron 17 variantes, 6 de las cuáles corresponden a variantes exónicas y 11 a variantes intrónicas previamente reportadas. Todas las variantes exónicas detectadas son de tipo sinónimas. Dieciséis variantes detectadas fueron de cambio de un solo nucleótido, de estas trece heterocigotas y 3 homocigotas, además se observó una delección en la región intrónica 12-13. Según la base de datos LOVD (Leiden Open Variation Database) del total de variantes identificadas, 12 son variantes benignas y 5 probablemente benignas.

---

## Discusión

---

La FH es el trastorno de herencia autosómica dominante más común perteneciente a las dislipidemias primarias. Sin embargo, esta enfermedad permanece poco diagnosticada y tratada. A nivel mundial solo el 9 % de las personas que la padecen se encuentran diagnosticadas por pruebas genéticas [2]. En la mayoría de América Latina, la prevalencia de FH es desconocida; específicamente en Guatemala no existen reportes de pacientes con FH y tampoco un diagnóstico genético disponible. El problema más común de la FH es el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que puede conllevar a la muerte. Lo que hace al diagnóstico sumamente importante, tanto para el afectado como para los familiares asintomáticos que pueden ser portadores de la enfermedad [30].

En este estudio fue posible estandarizar la amplificación de los 18 exones del gen LDLR mediante PCR de punto final para implementar un diagnóstico genético. El gen LDLR codifica para la proteína transmembrana de 860 aminoácidos y 6 dominios funcionales encargada de internalizar las partículas de LDL al hígado, en donde se metabolizan [21]. Actualmente, se han detectado más de 1800 variantes tanto patogénicas como benignas distribuidos en los 18 exones del gen [54]. Por lo que se decidió amplificar las 18 regiones exónicas.

Previo a la estandarización, se realizó una extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre venosa completa, el Cuadro 7.1 muestra las concentraciones obtenidas, de las cuales se obtuvo una media de 106 ng/ $\mu$ L con una desviación estándar de 35, este resultado evidencia que las concentraciones se encuentran relativamente dispersas entre sí. Generalmente, al contar con una muestra pequeña se tiende a obtener desviaciones estándar mayores, algo que se observó en este estudio al contar únicamente con 2 muestras. Por esto, en próximos estudios se recomienda aumentar el número de muestras, lo cual permitirá obtener datos estadísticamente significativos. Cabe mencionar que la concentración de ADN se ve afectada por la cantidad de linfocitos en sangre, los cuales varían de persona a persona.

Con el fin de evaluar las condiciones de amplificación, los fragmentos fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Para todos los exones estandarizados se esperaba observar dos bandas claras con el mismo peso característico de cada exón. Al observar las figuras 7.1 y 7.2 se evidencia que estos resultados se cumplieron. Así mismo se evidencia que el proceso y la técnica utilizada fue eficiente, ya que ninguno de los controles negativos amplificó, lo que quiere decir que no hay presencia de contaminantes.

Durante la estandarización, se demostró el efecto de los componentes en la mezcla de reacción y las condiciones del programa en la amplificación por PCR punto final.

## 8.1. Efectos de las condiciones del programa de amplificación

### *Temperatura de hibridación*

Las temperaturas de hibridación iniciales fueron ideales para los exones 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13-14, 15, 16, 17 y 18. Por lo que el efecto de cambios de temperatura se evaluó únicamente en los exones que no presentaron una buena amplificación inicial.

Se observó que para los exones con bandas no específicas, el aumento de temperatura de hibridación disminuye o elimina estas bandas. Generalmente, las bandas no específicas o bandas artefacto se generan por uniones no específicas de cebadores fuera del lugar objetivo en el genoma o debido a ADN genómico contaminante [58]. Para este caso, se hipotetizó que las bandas no específicas provenían de uniones no específicas de los cebadores, ya que los controles negativos no presentaban ninguna banda de contaminación.

En la figura 12.3 se observa que para el exón 4 el aumento de temperatura de hibridación de 56°C a 61°C eliminó la banda de menor tamaño (300 bp) y disminuyó la segunda banda (578bp). De igual manera se observa que para los exones 6 y 7 el aumento de temperatura de 55°C a 58°C reduce las bandas no específicas (282bp y 332bp respectivamente). Al aumentar la temperatura de hibridación se reduce la unión no específica de cebadores al genoma ya que estos son menos específicos para el sitio de unión secundario, por lo que se limita la amplificación únicamente a la región específica deseada con temperaturas más altas [31]. Cabe destacar que las temperaturas de desnaturalización y extensión se mantuvieron constantes, modificando únicamente la temperatura de hibridación.

### *Número de ciclos*

Respecto al número de ciclos, este también se modificó para los exones que presentaron bandas no específicas. Estudios han mostrado que, aproximadamente luego de 30 ciclos de PCR, el rendimiento comienza a reducirse y aumenta la probabilidad de obtener bandas no específicas y/o smear, esto ocurre porque luego de 30 ciclos, la mayoría de cebadores se han convertido en producto y en este punto, la mayoría de condiciones parece favorecer el anillamiento de los extremos 3'OH del producto con ADN genómico o con el mismo, generando así bandas no específicas que terminan aleatoriamente durante los ciclos adicionales [3]. Se observó que al disminuir de 35 a 30 ciclos de corrida, las bandas no específicas también disminuyen y además se observan bandas de mejor resolución (Figura 12.4). Por lo que se infiere que disminuir el número de ciclos no solo reduce las bandas no específicas sino que también mejora la resolución, ya que al obtener una cantidad menor de amplicón, se obtienen bandas más pequeñas y claras.

## 8.2. Efectos de los componentes en la mezcla de reacción

### *Plantilla de ADN*

Una de las causas de bandas no específicas durante la amplificación son concentraciones excesivas de ADN, el cual a su vez puede acarrear contaminantes desde la extracción [31]. Por lo que en este caso, para los exones 4, 6 y 7 que presentaron bandas no específicas, se evaluó la concentración de ADN a 150 ng/ $\mu$ L y a 75ng/ $\mu$ L. Se observó una ligera disminución de las bandas, sin embargo esta modificación se realizó en conjunto con la disminución de número de ciclos, por lo que se infiere que la reducción de bandas no específicas se debe a la combinación de ambos factores (Figura 12.5).

Además, debido a la estandarización de múltiples exones utilizando la misma muestra de ADN se utilizaron alícuotas de este para evitar degradación y/o contaminación por los procesos de congelamiento y descongelamiento [50].

### ***Cebadores y dNTPs***

En cuanto a la concentración de cebadores, en todas las reacciones se inició con una concentración de 200nM y está resultó efectiva, lográndose la amplificación de 15 exones. Para los 3 exones restantes, se aumentó la concentración de los cebadores de 200nM a 300nM. La actividad de las enzimas se ve afectada por la cantidad y afinidad del sustrato [40]. En este caso al aumentar la cantidad de cebadores se promueve la actividad de la polimerasa y se incrementa así la amplificación de los exones. Por lo que, para los exones 11, 12 y 16 la concentración de cebadores se consideró como un elemento determinante para su amplificación (Figura 12.6). Así mismo, es importante mencionar que al aumentar la concentración de cebadores no se observaron dimers de cebadores generados por la autohibridación en presencia de concentraciones altas de cebadores en la reacción [31].

Por otro lado, los desoxinucleótidos 5'-trifosfatos (dNTPs) pueden causar problemas como inhibición de la amplificación si no se encuentran en las concentraciones equivalentes apropiadas y pueden degradarse con facilidad luego de 4 o 5 ciclos de congelamientos y descongelamiento [31]. Por esta razón se utilizó la concentración recomendada por el fabricante (0.2mM) (Cuadro 12.2) y se trabajó con alícuotas de volumen pequeño para disminuir fuentes de error.

### ***Enzima Taq Polimerasa***

Como se mencionó, se partió utilizando para todas las reacciones la enzima *Go Taq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* (Promega), esta se estandarizó para 17 exones del gen LDLR (Cuadro 7.2) Sin embargo, luego de modificar la temperatura, concentración de plantilla de ADN y número de ciclos, el exón 4 aún presentó una banda no específica, por lo que se analizó la enzima *Hot start Platinum*<sup>™</sup> *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) [52]. Se observó que esta enzima inhibió la amplificación de la banda no específica (Figura 12.7) al inactivar la actividad de la polimerasa durante la mezcla de reacción mediante la unión con anticuerpos monoclonales de ratón hasta que se produce un paso de activación por calor que los desnaturaliza y elimina, liberando así a la polimerasa [58].



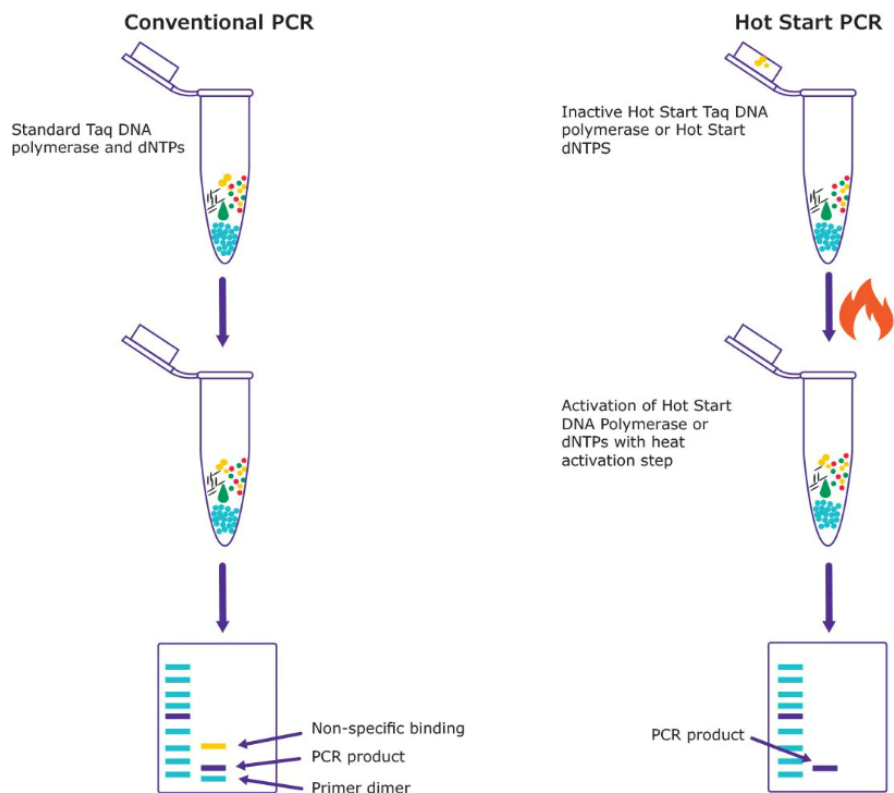


Figura 8.1: Comparación de PCR convencional y Hot Start.

Adaptado de: Merck, 2022.

### 8.3. Efectos de las condiciones de electroforesis

Durante la electroforesis en gel, las moléculas de ADN migran desde un cátodo hacia un ánodo debido a la carga negativa conferida por los grupos fosfatos y cuyo número es igual al doble del número de pares de bases (bp). Dado que la forma de las moléculas y la relación carga/masa siempre es la misma, el tamaño del ADN es lo que determina la velocidad a la que pasa a través del gel y la separación eficaz de los fragmentos [9].

En este estudio fue posible obtener una adecuada separación de los productos de PCR utilizando los siguientes componentes y condiciones: geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con 1 $\mu$ L GelRed utilizando 4 $\mu$ L de producto de PCR a un voltaje constante de 70V durante 120 minutos. Se evidenció también durante la preparación del gel que para un correcto homogenizado de la agarosa se requiere un tiempo de calentamiento adecuado entre 1-2 minutos con agitación. Del mismo modo, es importante verter de inmediato la mezcla a la cámara de electroforesis para evitar que comience la polimerización antes de tiempo.

#### *Concentración de agarosa*

La concentración de agarosa es un factor importante en la separación de bandas, esta determina el tamaño del poro y por consiguiente el rango de tamaño de las moléculas de ADN que se pueden resolver [29]. En general, cuanto mayor sea la concentración de agarosa, menor será el tamaño de los poros. Por lo que para separar fragmentos grandes de ADN (>2kb) se utilizan concentraciones bajas

de agarosa entre 0.3 % y 1 %, mientras que para fragmentos pequeños de ADN (0.2-2kb) se utilizan concentraciones superiores entre 1 % y 2 % [9] En este estudio todos los fragmentos deseados fueron pequeños (0.2 - 1 kb), por ende se utilizó una concentración alta de 2 %.

### ***Voltaje y tiempo***

Además de una adecuada concentración de agarosa, el voltaje y tiempo son factores importantes para la separación. Se observó que la combinación de ambos dio lugar a una mayor resolución de bandas, y por lo tanto, una observación más precisa y sensible de los resultados. Al utilizar voltajes superiores (90V) la resolución de bandas disminuyó y estas se encontraban distorsionadas, lo que dificultó la determinación de peso molecular en los geles. Por el contrario, al utilizar voltajes menores (70V) la resolución de las bandas se incrementó, permitiendo así una determinación de peso más certera (Figura 12.8). Dado que la separación de bandas es más lenta a voltajes menores, al disminuir el voltaje se aumentó el tiempo de corrida a 120 minutos. Estas observaciones concuerda con la teoría, el voltaje aplicado se encarga de generar un campo eléctrico con una fuerza definida por la longitud del gel y el potencial diferencial en los extremos (V/cm), por lo que los fragmentos de ADN migran al estar expuestos a este campo a una velocidad proporcional al voltaje aplicado, entre mayor sea este, los fragmentos migrarán más rápido. [9].

### ***Buffers***

El buffer de corrida proporciona el medio adecuado para la transmisión de corriente eléctrica y mantiene el pH sin cambios durante la electroforesis. Los buffers más utilizados para ácidos nucleicos son TBE (Tris/borato) y TAE(Tris/acetato), ambos proporcionan condiciones adecuadas y deben elegirse según las condiciones de corrida. Para electroforesis extendidas o de alto voltaje se recomienda utilizar buffer TBE ya que tiene una capacidad amortiguadora significativamente mayor. Por otro lado, para voltajes menores y tiempos cortos se recomienda utilizar buffer TAE [9]. Para este caso, al utilizar voltajes menores a 100 y por tener un costo más reducido se optó por utilizar buffer TAE.

### ***Volumen de muestra***

Finalmente, se determinó que un mayor volumen de producto cargado aumenta la intensidad y grosor de las bandas, pero al mismo tiempo reduce la resolución (Figura 12.8B). Estudios evidencian que cantidades elevadas de muestra conllevan a arrastres o frotis extensos y esto se hace más notorio a medida que aumenta el tamaño del producto [9]

## **8.4. Análisis de secuencias**

Con el fin de confirmar la identidad de las amplificaciones de cada exón del gen LDLR y a su vez la especificidad de la técnica se realizó secuenciación de Sanger de todos los productos de PCR punto final. El uso de secuenciación de Sanger para el diagnóstico permite detectar fracciones de alelos menores al 5 % y analiza secuencias de hasta 1000 bases, además en comparación con otras técnicas resulta ser costo y tiempo efectivo para el análisis de pocas muestras [38] Estudios han mostrado la eficiencia de utilizar secuenciación de Sanger para investigar fragmentos de genes grandes como exones e intrones en pacientes con FH [7], [16], las variantes incluyen sustituciones pequeñas, inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, mutaciones de emplame y grandes reordenamientos. Por lo que, en base a esto, se determinó utilizar secuenciación de Sanger como técnica diagnóstica para FH.

Utilizando la herramienta en línea ClustalMuscle se realizó un alineamiento de las secuencias sentido y antisentido y se determinó que para todos los exones, éstas son congruentes entre sí, mostrando espacios en blanco (gaps) únicamente en el inicio y final de las secuencias (Figuras 12.9 - 12.25).

A partir de esto, se realizó un alineamiento con la secuencia genómica de referencia NG\_009060.gb [25] obtenida de la base de datos NCBI. Fue posible identificar que los fragmentos amplificados pertenecen al gen LDLR en el cromosoma 19. Además, se evidenció que todas las secuencias cubrían el 100 % de las regiones de cada exón y entre un 10-20 % de región intrónica (Figura 7.3). Esto indica que los cebadores utilizados fueron específicos.

Con el alineamiento de secuencias y utilizando el programa Mutation Surveyor se analizaron posibles variantes en los 18 exones. En total, se detectaron 17 variantes no patogénicas, 6 de las cuáles corresponden a variantes exónicas y 11 a variantes intrónicas previamente reportadas. Todas las variantes exónicas detectadas son de tipo sinónimas, es decir que no producen un cambio de aminoácido en la proteína resultante [63]. Estos resultados confirman la detección de variantes mediante la prueba implementada en las regiones determinadas del gen LDLR. Según la base de datos Global Variome shared LOVD, del total de mutaciones detectadas, 12 fueron mutaciones benignas y 5 probablemente benignas. No se esperaba detectar mutaciones patogénicas ya que las muestras utilizadas no pertenecían a pacientes diagnosticados o con manifestaciones clínicas de hipercolesterolemia familiar.

A pesar de no determinar variantes patogénicas, algunas de las variantes detectadas en este estudio se han identificado en previas investigaciones. Las variantes c.1060+7T>C y c.1060+10G>GC pertenecientes al intrón 7 y la variante c.1359-30C>CT perteneciente al intrón 9 fueron detectadas en familias colombianas con hipercolesterolemia familiar [30], así mismo, estas se detectaron en el estudio realizado por Vlad y colaboradores, (2021) en Rumania, pertenecientes a población caucásica [59]. La variante 1413A>AG (rs5930) fue reportada por diversos estudios [21], [30], [59]. Esta variante pertenece al exón 10 y representa un tipo de mutación sinónima que codifica para el aminoácido Arginina. La variante c.1773C>CT perteneciente al exón 12 se ha descrito previamente en poblaciones de América, Asia y Europa [21], [22], [30], [59]. Es una variante sinónima que codifica el aminoácido asparagina. Finalmente, las variantes exónicas c.1959T>TC y c.2232A>G fueron previamente reportadas en poblaciones latinoamericanas y caucásicas [21], [59]. Ambas son de tipo sinónimas y codifican a los aminoácidos Valina y Arginina respectivamente.

En el Cuadro 7.4 se observa que la mayoría de variantes, a excepción de una, se detectaron en dos portadores no relacionados y no diagnosticados con hipercolesterolemia familiar. Un patrón similar se observó en el estudio realizado por Hérnadez y colaboradores (2020) [21] en población mexicana, en donde se evidenció una misma combinación de haplotipos conformada por 8 variantes exónicas en cuatro individuos aparentemente no relacionados con hipercolesterolemia familiar. De estas variantes, 4 fueron detectadas en este estudio en todos los individuos estudiados, por lo que se puede hipotetizar una posible combinación de haplotipos conformada por estas cuatro variantes (c.1413A>AG, c.1773C>CT, c.1959T>TC, c.2232A>G) en la población Guatemalteca. Esto además, podría sugerir un único origen ancestral de las variantes en el gen LDLR y un efecto de consanguinidad, la cual puede ser promovida por factores geográficos y sociodemográficos como se ha observado en otras poblaciones. En afrikaners se determinó un efecto fundador y de consanguinidad para las variantes p.Asp206Glu, p.Val408Met y p.Asp154Asn; así mismo se ha reportado una delección del gen LDLR de 10kb en la población franco-canadiense de Quebec [39]. Sin embargo, esto no es posible confirmarlo por el limitado número de muestras analizadas.

Actualmente, en Guatemala no existe ningún diagnóstico genético disponible o registros de pacientes con esta enfermedad, lo que dificulta el análisis de mutaciones. Según estudios realizados en países vecinos, la mayoría de mutaciones patogénicas se encuentran en los exones 4, 7, 8 y 14 del gen LDLR (Cuadro 4.1), siendo la mayoría mutaciones heterocigotas, por lo que es posible que en la población Guatemalteca se presenten las mismas mutaciones. No obstante, se ha mencionado que el aporte genético de las diferentes poblaciones indígenas en Latinoamérica tiene un efecto notable en la epidemiología de diversas enfermedades y se ha observado que no existe un patrón o mutaciones causales de FH comunes entre los países de América Latina [36]. Lo cual en parte puede ser consecuencia del número limitado de estudios realizados en América Latina, por lo que se necesita más investigación genética de variantes en esta región.

Es importante mencionar que a pesar de que las mutaciones o variantes en el gen LDLR poseen la mayor prevalencia en pacientes con FH, se han descrito diversas mutaciones causales en los genes APOB y PCSK9, incluso, se han reportado mutaciones intrónicas o en otros genes no pertenecientes a los tres más comunes, lo que se ha atribuido a la posible participación de otros genes causales o una herencia poligénica [4]. Como pasos a futuros, se recomienda implementar la amplificación del gen APOB y PCSK9 en el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.

Cabe mencionar que la hipercolesterolemia en adultos se encuentra altamente influenciada por las interacciones entre el ambiente, mecanismos epigenéticos y factores de estilo de vida, como el consumo excesivo de grasas saturadas y la poca actividad física. Debido a esto, para un diagnóstico certero se deben tomar en cuenta todos estos factores de manera personalizada. Por esto, se recomienda continuar utilizando criterios clínicos de FH en conjunto con pruebas genéticas como la implementada en este estudio.

- Las condiciones óptimas de amplificación del gen LDLR mediante PCR de punto final fueron las siguientes: temperaturas de hibridación entre 55-61°C, concentración de cebadores de 200 y 300 nM, concentración de plantilla de ADN de 75 y 150 ng/μL, número de ciclos entre 30 y 35 y dos distintas enzimas: Go Taq DNA Polymerase(Promega) y Platinum™ Taq DNA Polymerase(Invitrogen).
- Mediante electroforesis en gel de agarosa se identificaron bandas características de los 18 exones del gen LDLR con tamaños de 719bp, 688bp, 646bp, 690bp, 251bp, 405bp, 658bp, 379bp, 379bp, 379bp, 369bp, 357bp, 672bp, 427bp, 346bp, 494bp y 726bp respectivamente
- Todos los exones amplificados se confirmaron que pertenecen al gen LDLR en el cromosoma 19 con porcentajes de identidad y cobertura superiores a 98% . .
- A partir del análisis de secuencias, se detectaron 17 variantes en el gen LDLR, 6 de las cuáles corresponden a variantes exónicas sinónimas y 11 a variantes intrónicas previamente reportadas.

Con base en los resultados obtenidos en esta tesis y para futuros trabajos se recomienda:

- Aumentar el número de muestra para obtener datos estadísticamente significativos y evaluar cuán consistentes son estas variantes.
- Evaluar la relación de datos epidemiológicos con variantes causales de hipercolesterolemia familiar.
- Determinar variantes en pacientes diagnosticados y su descendencia con o sin manifestaciones clínicas de la enfermedad, para poner atención a los factores que a futuro pueden influenciar en el desarrollo de la enfermedad.
- Implementar la amplificación del gen PSCK9 y ApoB en el diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar.
- Analizar la prevalencia de variantes patogénicas del gen LDLR, PSCK9 y ApoB en las diferentes etnias de la población Guatemalteca.

- 
- 
- [1] Abul-Husn, N. S, *et al*, “Genetic identification of familial hypercholesterolemia within a single U.S. health care system”, *Science*, vol. 354, n.º 6319, 2006.
  - [2] Beheshti, S. O, *et al*, “Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia.”, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 75, n.º 20, págs. 2553-2566, 2020.
  - [3] Bell, D. A y DeMarini, D. M, “Excessive cycling converts PCR products to randomlength higher molecular weight fragments”, *Oxford University Press*, vol. 19, n.º 18, págs. 5079-5060, 1991.
  - [4] Benito-Vicente, A, *et al*, “Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease”, *International journal of molecular sciences*, vol. 19, n.º 11, pág. 3426, 2018.
  - [5] Berberich, A. J y Hegele, R. A, “The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia”, *Nature Reviews*, 2018.
  - [6] Bergeron, N, *et al*, “Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition: a new therapeutic mechanism for reducing cardiovascular disease risk”, *Circulation*, vol. 132, n.º 17, págs. 1648-66, 2015.
  - [7] Bertolini, S, *et al*, “The study of familial hypercholesterolemia in Italy:A narrative review”, *Atheroscler Suppl*, vol. 29, págs. 1-10, 2017.
  - [8] Broome, S, “Riesgo de enfermedad coronaria fatal en la hipercolesterolemia familiar. Comité Directivo Científico en nombre del Grupo de Registro Simon Broome.”, *BMJ*, vol. 303, n.º 6807, págs. 893-896, 1991.
  - [9] Coligan, J. E, *et al*, “Agarose Gel Electrophoresis.”, *Current Protocols in Immunology*, 2001.
  - [10] Di Taranto, M. D, *et al*, “Genetic spectrum of familial hypercholesterolemia and correlations with clinical expression: Implications for diagnosis improvement”, *Clinical Genetics*, pág. 13, 2021.
  - [11] Dron, J. S y Hegele, R. A, “Complexity of mechanisms among human proprotein convertase subtilisin–kexin type 9 variants”, *Current Opinion*, vol. 28, n.º 2, págs. 161-169, 2017.
  - [12] Etxebarria, A, *et al*, “Caracterización funcional y clasificación de las variantes frecuentes del receptor de lipoproteínas de baja densidad”, *Tararear. Mutat.*, vol. 36, págs. 129-141, 2015.
  - [13] Ference, B. A, *et al*, “Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel”, *European Heart Journal*, vol. 38, n.º 32, pág. 2472, 2017.

- [14] Fredrickson, D. S y Lees, R. S, “A system for phenotyping hyperlipoproteinemia”, *Circulation*, vol. 31, págs. 321-327, 1965.
- [15] Futema, M, *et al*, “Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries”, *Clin Chem*, vol. 61, págs. 231-238, 2015.
- [16] Gabčová, D, *et al*, “The molecular genetic background of familial hypercholesterolemia: data from the Slovak nation-wide survey”, *Physiol Res*, vol. 66, págs. 75-84, 2017.
- [17] Gautschi, M; Pavlovic, M y Nuoffer, J. M, “Fatal myocardial infarction at 4.5 years in a case of homozygous familial hypercholesterolaemia”, *JIMD*, vol. 2, págs. 45-50, 2012.
- [18] Goldstein, J. L y Brown, M. S, “Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity associated with overproduction of cholesterol”, *Proc Natl Acad Sci*, vol. 70, págs. 2084-2088, 1973.
- [19] Goldstein, J. L; Hobbs H. H y Brown, M. S, *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, NY: McGraw-Hill, 2001.
- [20] Gómez, L, *Secuenciación del gen LDLR y manejo nutricional en familias Colombianas con Hipercolesterolemia Familiar*, Pontifica Universidad Javeriana, 2018.
- [21] Hernández, T. D, *et al*, “Very High Frequency of LDLR Gene Mutation p.asp360His Causing Familial Hypercholesterolemia in a Mexican Community in the state of Puebla”, *Archives of Medical Research*, 2020.
- [22] Hori, M, *et al*, “Impact of LDLR and PCSK9 pathogenic variants in Japanese heterozygous familial hypercholesterolemia patients”, *Atherosclerosis*, págs. 101-108, 2019.
- [23] Humphries, S. E, *et al*, “Causas genéticas de hipercolesterolemia familiar en pacientes del Reino Unido: relación con los niveles de lípidos en plasma y el riesgo de enfermedad coronaria”, *J Med Genet*, vol. 43, págs. 943-949, 2006.
- [24] Iqbal, M. N, *et al*, “BMT: Bioinformatics mini toolbox for comprehensive DNA and protein analysis”, *Genomics*, vol. 112, n.º 6, págs. 4561-4566, 2020.
- [25] Ison, H. E, *et al*, “Familial Hypercholesterolemia”, *GeneReviews*, 2022.
- [26] Khan, S. P; Ghani, R y Yaqub, Z, “Single step PCR for the identification of Low Density Lipoprotein Receptor (LDL-R) gene mutations”, *Pak J Med Sci*, vol. 30, n.º 4, 2014.
- [27] Khera, A. V, *et al*, “Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia.”, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 67, págs. 2578-2589, 2016.
- [28] Khera, A. V, *et al*, “Whole-Genome Sequencing to Characterize Monogenic and Polygenic Contributions in Patients Hospitalized With Early-Onset Myocardial Infarction”, *Circulation*, vol. 139, págs. 1593-1602, 2019.
- [29] Lee, P. Y, *et al*, “Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments”, *J Vis Exp*, vol. 20, n.º 62, 2012.
- [30] López, G, *et al*, “Mutational analysis of the LDLR gene in a cohort of Colombian families with familial hypercholesterolemia”, *Atherosclerosis*, vol. 277, págs. 434-439, 2018.
- [31] Lorenz, T. C, “Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies”, *Journal of Visualized Experiments*, vol. 63, 2012.
- [32] Maliachova, O y Stabouli, S, “Familial Hypercholesterolemia in Children and Adolescents: Diagnosis and Treatment”, *Current Pharmaceutical*, vol. 24, n.º 31, págs. 3472-3677, 2018.
- [33] Martin, R, *et al*, “Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia using a rapid biochip array assay for 40 common LDLR, APOB and PCSK9 mutations.”, *Atherosclerosis*, vol. 254, págs. 8-13, 2016.
- [34] Mata, P, *Diagnóstico y Tratamiento de la Hipercolesterolemia Familiar en España*, Fundación Hipercolesterolemia Familiar, 2014.



- [35] McGowan, M. P, *et al*, “Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar heterocigota”, *Journal of the American Heart Association*, vol. 8, n.º 24, 2019.
- [36] Mehta, R, *et al*, “The panorama of familial hypercholesterolemia in Latin America: a systematic review”, *Journal of Lipid Research*, vol. 57, n.º 12, págs. 2115-2129, 2016.
- [37] Miura, M, *et al*, “COMPARISON OF SIX COMMERCIALY-AVAILABLE DNA POLYMERASES FOR DIRECT PCR”, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, vol. 55, n.º 6, págs. 401-406, 2013.
- [38] Moldovan, V; Banescu, C y Dobreanu, M, “Molecular diagnosis methods in familial hypercholesterolemia”, *The Anatolian Journal of Cardiology*, vol. 23, n.º 3, págs. 120-127, 2020.
- [39] Moorjani, S, *et al*, “Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province”, *Arteriosclerosis*, vol. 9, n.º 2, págs. 211-216, 1989.
- [40] Nelson, D y Cox, M, *Principios de Bioquímica*. W.H. Freeman y Company, 2009, ISBN: 978-84-282-1486-5.
- [41] Perez, L, *et al*, “Attainment of LDL-Cholesterol Treatment Goals in Patients With Familial Hypercholesterolemia: 5-Year SAFEHEART Registry Follow-Up”, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 67, n.º 11, págs. 1278-1285, 2006.
- [42] Pisciotta, L, *et al*, “A “de novo” mutation of the LDL-receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1587, n.º 1, págs. 7-11, 2002.
- [43] Promega, *Go Taq® DNA Polymerase*, Promega, 2018.
- [44] Promega, *Quantus™ Fluorometer Operating Manual*, Promega, 2021.
- [45] QIAGEN, *Puregene® DNA Handbook*, QIAGEN, 2022.
- [46] Raal, F. J; Hovingh, G. K y Catapano, A. L, “Familial hypercholesterolemia treatments: Guidelines and new therapies.”, *Atherosclerosis*, vol. 277, págs. 483-492, 2018.
- [47] Rodríguez, I, *Caracterización de variantes genéticas de LDLR y PCSK9 para el diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar (FH)*, Universidad Politécnica de Madrid, 2019.
- [48] Safarova, M. D y Kullo, I. J, “My Approach to the Patient With Familial Hypercholesterolemia”, *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 91, n.º 6, págs. 770-786, 2015.
- [49] Santos, R. D, “Screening and management of familial hypercholesterolemia”, *Current Opinion in Cardiology*, vol. 34, n.º 5, pág. 530, 2019.
- [50] Shao, W; Khin, S y Kopp, W. C, “Characterization of Effect of Repeated Freeze and Thaw Cycles on Stability of Genomic DNA Using Pulsed Field Gel Electrophoresis”, *Biopreservation and Biobanking*, vol. 107, n.º 1, págs. 4-11, 2012.
- [51] Singh, S y Bittner, V, “Familial Hypercholesterolemia—Epidemiology, Diagnosis, and Screening”, *Curr Atheroscler Rep*, vol. 17, n.º 3, 2015.
- [52] Snozek, C. L, *et al*, “LDLR promoter variant and exon 14 mutation on the same chromosome are associated with an unusually severe FH phenotype and treatment resistance”, *Eur J Hum Genet*, vol. 17, n.º 1, 2009.
- [53] Soutar, A. K y Naoumova, R. P, “Mechanisms of Disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia”, *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, vol. 4, n.º 4, 2007.
- [54] Stenson, P. D, *et al*, “The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies”, *Hum. Genet*, vol. 136, n.º 6, 2017.
- [55] Stoll, M y Dell’Oca, N, “Genética de la hipercolesterolemia familiar”, *Revista Uruguaya de Cardiología*, vol. 34, n.º 3, 2019.
- [56] Stroes, E, *et al*, “Statin-associated muscle symptoms: Impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management”, *Eur Heart Journal*, vol. 36, págs. 1012-1022, 2015.

- [57] Sturm, A. C, *et al*, “Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia”, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 72, n.º 6, 2018.
- [58] ThermoFisher, *Platinum™ Taq DNA Polymerase*, ThermoFisher, 2022.
- [59] Vlad, C, *et al*, “Molecular Genetic Approach and Evaluation of Cardiovascular Events in Patients with Clinical Familial Hypercholesterolemia Phenotype from Romania”, *Journal of Clinical Medicine*, vol. 10, 2021.
- [60] Wiegman, A, *et al*, “Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment”, *Eur Heart Journal*, vol. 36, n.º 36, págs. 2425-2437, 2015.
- [61] Williams, R. R, *et al*, “Diagnosing Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Using New Practical Criteria Validated by Molecular Genetics”, *The American Journal of Cardiology*, vol. 72, n.º 2, págs. 171-176, 1993.
- [62] Yang, K, *et al*, “LDLR and ApoB are Major Genetic Causes of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia in a Taiwanese Population”, *J Formos Med Assoc*, vol. 106, n.º 10, 2007.
- [63] Zeng, Z y Bromberg, Y, “Effects of Synonymous Variants: A Systematic Review and Perspectives”, *Frontiers in Genetics*, vol. 10, n.º 914, 2019.



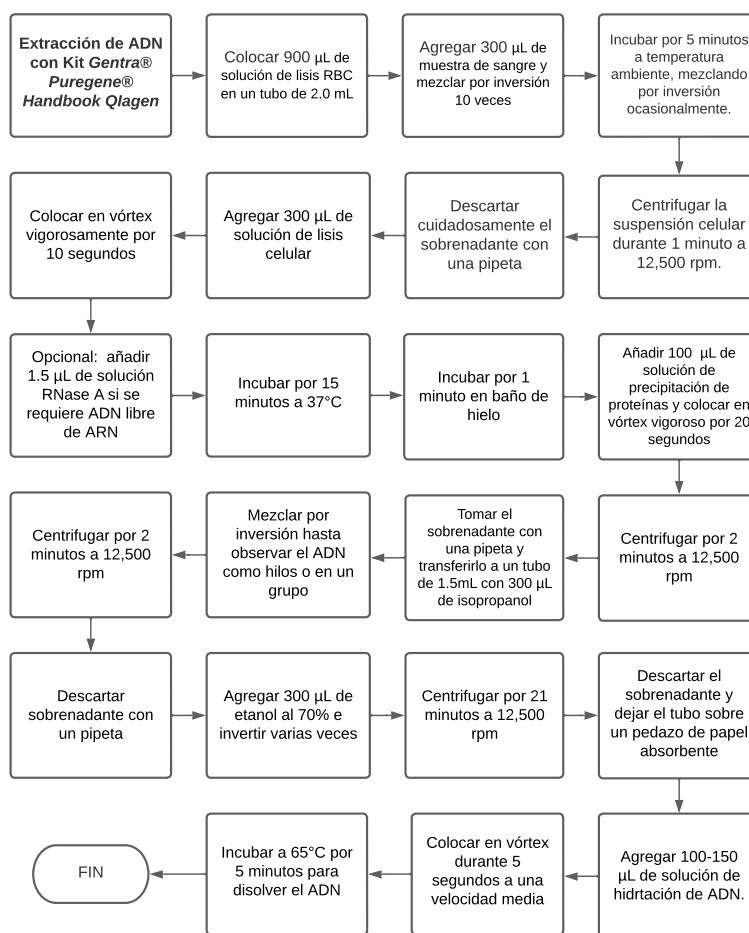


Figura 12.1: Procedimiento de extracción de ADN con Kit comercial *Gentra® Puregene® Handbook QIAGEN* para la extracción de ADN. Extracción a partir de un volumen de muestra de 300µL de sangre venosa [45].

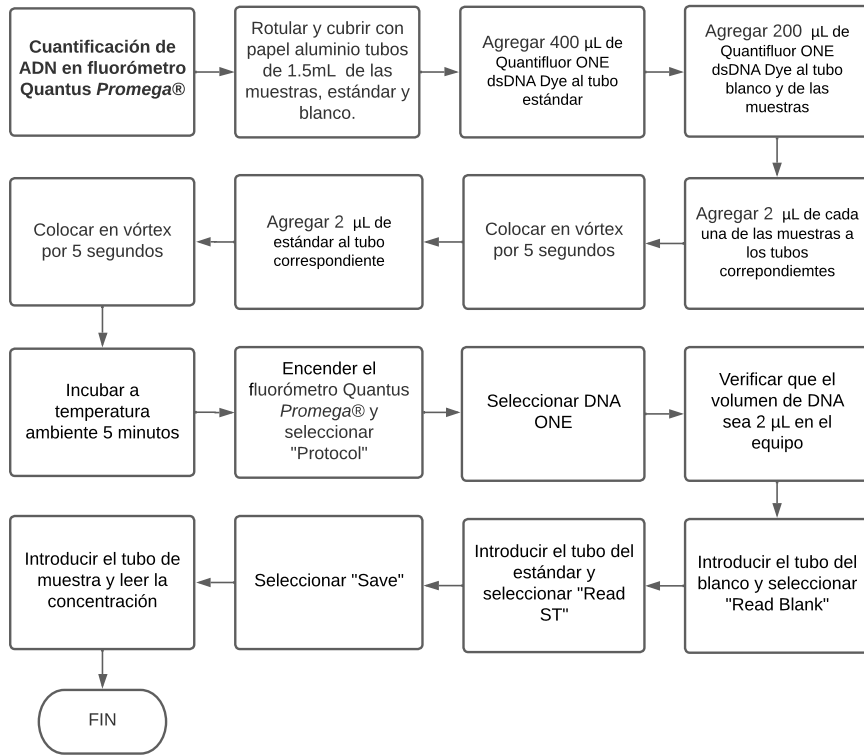


Figura 12.2: Procedimiento de cuantificación de ADN utilizando el fluorómetro Quantus *Promega*® [44]

Cuadro 12.1: Secuencia de cebadores a utilizar y tamaño del amplicon esperado [62]

Exón	Nombre	Secuencia	Amplicon (bp)
1	LDLR-1F	5'cacaattcctagaaaggaaaagg3'	719
	LDLR-1R	5'aagtctcccagggatggagt3'	
2	LDLR-2F	5'ttttccataccccagagagt3'	651
	LDLR-2R	5'tcattctctccccacctccta3'	
3	LDLR-3F	5'aagacaggattggcaaggccagt3'	646
	LDLR-3R	5'cggaagaggcttggtatgag3'	
4	LDLR-4F	5'gagagggcagtggttcagag3'	619
	LDLR-4R	5'aaatcactgcatgtcccaca3'	
5	LDLR-5F	5'gcaaaaaggccctgcttcttt3'	251
	LDLR-5R	5'gcaagcagcaaggcacaga3'	
6	LDLR-6F	5'ctgggctcaagcagatctg3'	405
	LDLR-6R	5'gttccaaaaccctacagca3'	
7	LDLR-7F	5'ttagcctgtcatggctggtg3'	558
	LDLR-7R	5'tcaagcacttaacagat3'	
8	LDLR-8F	5'cacctggctgttccttgat3'	379
	LDLR-8R	5'tcaggggatatgagtctgtgc3'	
9	LDLR-9F	5'gaggcactcttggtccatc3'	379
	LDLR-9R	5'tctctgctgatgacggtg3'	
10	LDLR-10F	5'ggtctgacctgtcccagaga3'	395
	LDLR-10R	5'cttctgctccctccattc3'	
11	LDLR-11F	5'aagccacatttgagtttg3'	369
	LDLR-11R	5'aaaccttcaggagcagctt3'	
12	LDLR-12F	5'ccagtgcttttctgctagg3'	357
	LDLR-12R	5'caaccagtttctgcttca3'	
13-14	LDLR-134F	5'cctgggcaacaaaagtga3'	672
	LDLR-134R	5'cgaccttgaggtaccattt3'	
15	LDLR-15F	5'tggtattttgcatgttgacc3'	427
	LDLR-15R	5'ggactccatctctgaccaa3'	
16	LDLR-16F	5'ctcacaataagcccgtgtg3'	346
	LDLR-16R	5'ttcctgtccaggagaaaa3'	
17	LDLR-17F	5'agagactgactgggttcatca3'	494
	LDLR-17R	5'gcctggtcccttgaggat3'	
18	LDLR-18F	5'actttggctttgcccagaga3'	726
	LDLR-18R	5'caaaggctaacctggctg3'	

Cuadro 12.2: Preparación de mezcla de reacción *Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase* [43].

Reactivo	Volumen Final 1x ( $\mu$ L)	Concentración Final
5X Green reaction Buffer	5.0	1X
dNTPs (2.5mM)	2.0	0.2mM
Cebador F (5 $\mu$ M)	1.0/1.5	200/300 nmol
Cebador R (5 $\mu$ M)	1.0/1.5	200/300 nmol
Plantilla ADN (75ng/ $\mu$ L)	1.0/2.0	75/150ng/ $\mu$ L
Go Taq <sup>®</sup> DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L)	0.2	1U
Agua grado biología molecular	Completar a 25 $\mu$ L	

Cuadro 12.3: Preparación de mezcla de reacción *Platinum™ Taq DNA Polymerase* [58].

Reactivo	Volumen Final 1x ( $\mu\text{L}$ )	Concentración Final
10X Reaction Buffer	2.5	1X
Cloruro de Magnesio (50mM)	0.75	50mM
dNTPs (2.5mM)	2.0	0.2mM
KB Extender	1.0	-
Cebador F ( $5\mu\text{M}$ )	1.0	200 nmol
Cebador R ( $5\mu\text{M}$ )	1.0	200
Plantilla ADN ( $75\text{ng}/\mu\text{L}$ )	1.0	$75\text{ng}/\mu\text{L}$
Platinum® Taq DNA Polymerase ( $5\text{U}/\mu\text{L}$ )	0.2	1U
Agua grado biología molecular	15.55	-

## 12.1. Efecto de las condiciones del programa de amplificación

### 1. Temperatura de hibridación

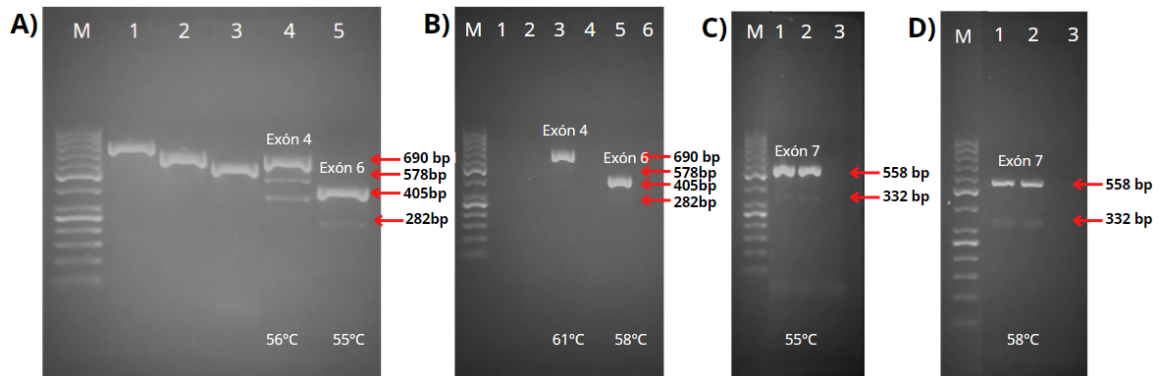


Figura 12.3: Efecto de la temperatura de hibridación en la amplificación mediante PCR de punto final. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. A) Amplificación de los exones 4 y 6 (Carril 4 y 5) con temperatura de hibridación de  $56^{\circ}\text{C}$  y  $55^{\circ}\text{C}$  respectivamente. B) Amplificación de los exones 4 y 6 (Carril 3 y 5) con temperatura de hibridación de  $61^{\circ}\text{C}$  y  $58^{\circ}\text{C}$  respectivamente. C) Amplificación del exón 7 con temperatura de hibridación de  $55^{\circ}\text{C}$  (Carril 1 y 2). D) Amplificación del exón 7 con temperatura de hibridación de  $58^{\circ}\text{C}$  (Carril 1 y 2) M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

### 2. Número de ciclos

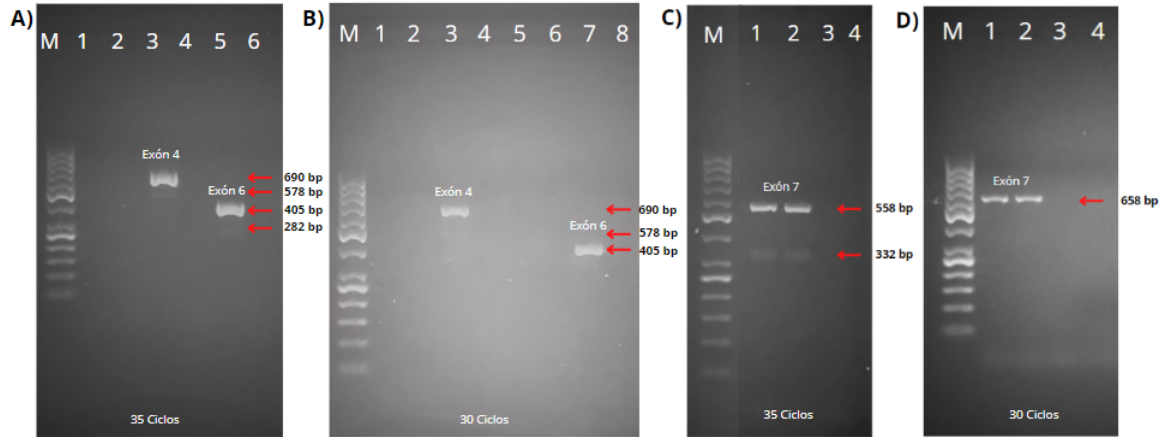


Figura 12.4: Efecto del número de ciclos en la amplificación mediante PCR de punto final Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. A) Amplificación del exón 4 (Carril 3) y exón 6 (Carril 5) utilizando 35 ciclos B) Amplificación del exón 4 (Carril 3) y exón 6 (Carril 7) utilizando 30 ciclos C) Amplificación del exón 7 (Carril 1 y 2) utilizando 35 ciclos D) Amplificación del exón 7 (Carril 1 y 2) utilizando 30 ciclos M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

## 12.2. Efecto de los componentes en la mezcla de reacción

### 1. Plantilla de ADN

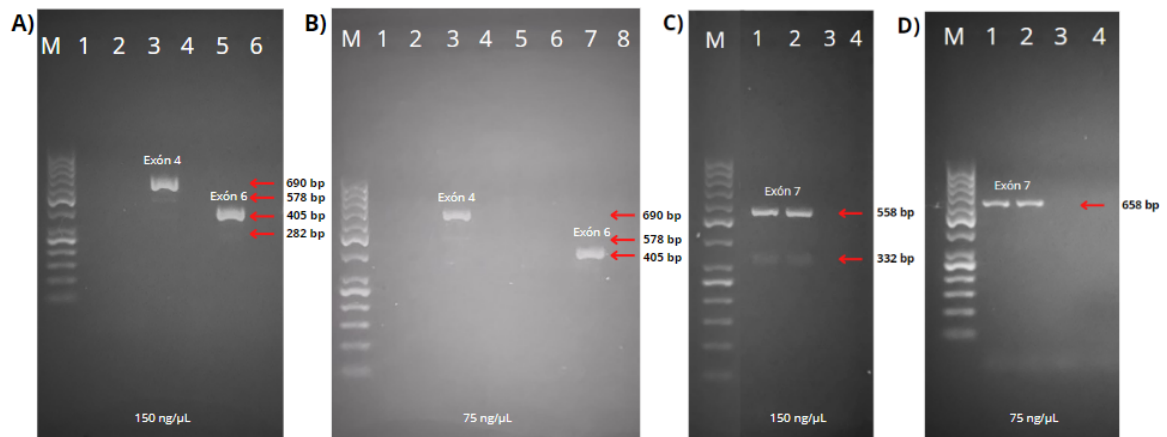


Figura 12.5: Efecto de la concentración de plantilla de ADN en la amplificación mediante PCR de punto final. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. A) Amplificación del exón 4 (Carril 3) y exón 6 (Carril 5) utilizando 150 ng/ $\mu$ L B) Amplificación del exón 4 (Carril 3) y exón 6 (Carril 7) utilizando 75 ng/ $\mu$ L C) Amplificación del exón 7 (Carril 1 y 2) utilizando 150 ng/ $\mu$ L D) Amplificación del exón 7 (Carril 1 y 2) utilizando 75 ng/ $\mu$ L M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

### 2. Cebadores y dNTPs



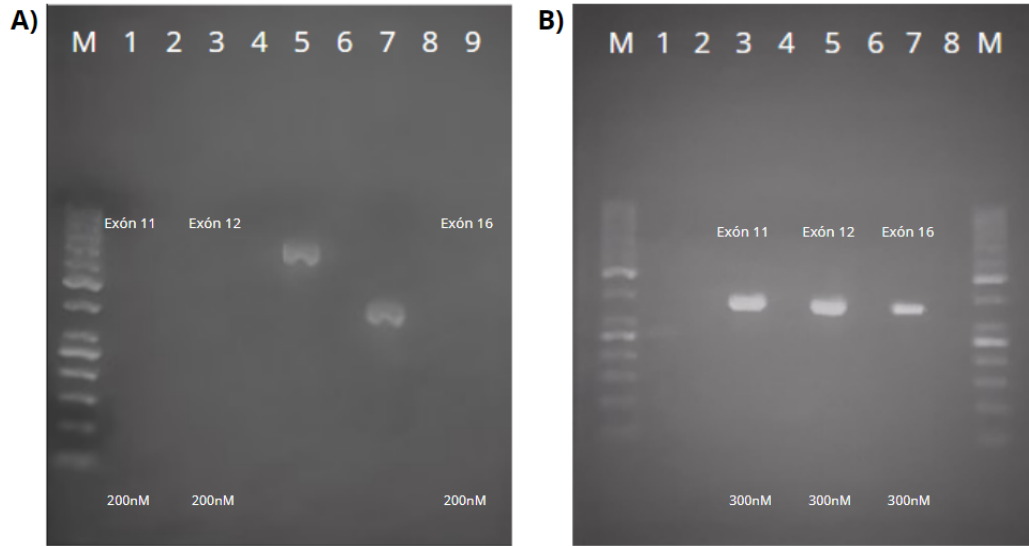


Figura 12.6: Efecto de la concentración de cebadores en la amplificación mediante PCR de punto final. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. A) Amplificación del exón 11 (Carril 1), exón 12 (Carril 3) y exón 16 (carril 9) utilizando 200 nanomoles de cebadores. B) Amplificación del exón 11 (Carril 3), exón 12 (Carril 5) y exón 16 (Carril 7) utilizando 300 nanomoles de cebadores. M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

### 3. Taq Polimerasa

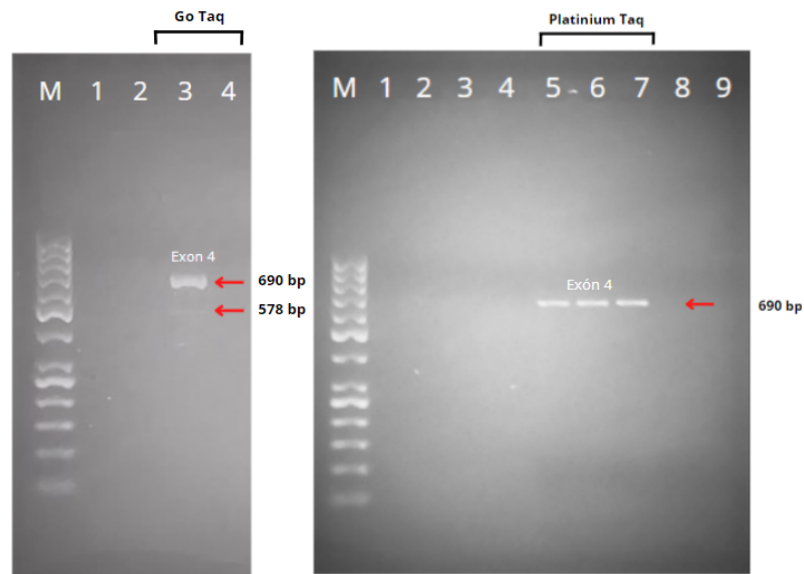


Figura 12.7: Comparación de la enzima *Go Taq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* y *Platinum*<sup>™</sup> *Taq DNA Polymerase* en la amplificación mediante PCR de punto final. Gel de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. Amplificación del exón 4 del gen LDLR utilizando *Go Taq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* (Promega) (Carriles 1-3). Amplificación del exón 4 del gen LDLR utilizando *Platinum*<sup>™</sup> *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) (Carriles 5-7). Control negativo (Carriles 4 y 8). M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

### 12.3. Efecto de las condiciones de electroforesis

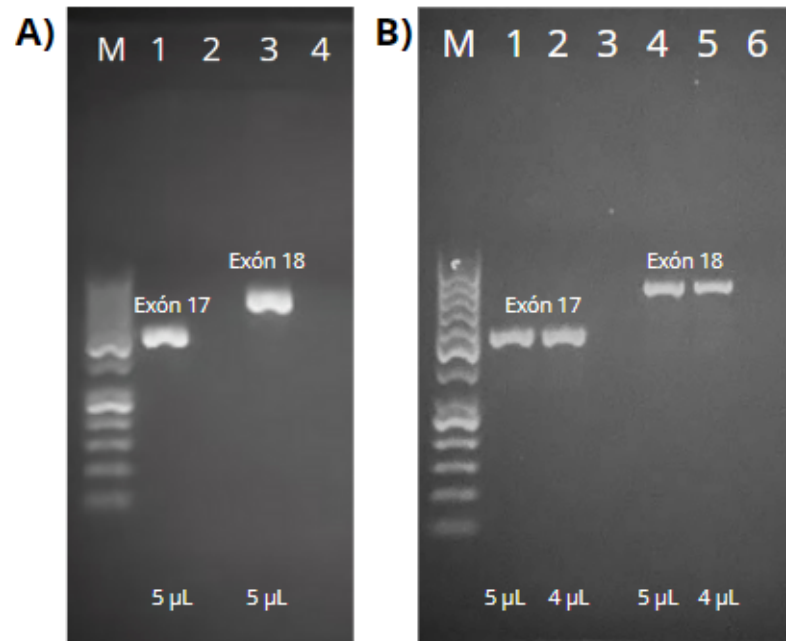


Figura 12.8: Efecto de condiciones de electroforesis. Geles de agarosa al 2% en TAE 1X teñidos con GelRed. Amplificación de los exones 17 y 18 utilizando A) Voltaje de 90V durante 90 minutos con 5µL de muestra. B) Voltaje de 70V durante 120 minutos con 5µL y 4µL de muestra. M: escalera de peso molecular 50pb (ThermoScientific).

### 12.4. Secuencias del gen LDLR estudiadas

#### 12.4.1. Muestra 1

##### Exón 1

##### ■ 1F:

```
TTTTTAGTGTTCCTTTTGAGGCAGAGAGGACAATGGCATTAGGCTATTGGAGG
ATCTTGAAAGGCTGTTGTTATCCTTCTGTGGACAACAACAGCAAATGTTAACAG
TTAAACATCGAGAAATTCAGGAGGATCTTTCAGAAGATGCGTTTCCAATTTTGA
GGGGGCGTCAGCTCTTCACCGGAGACCCAAATACAACAAATCAAGTCGCCTGCC
TGGCGACACTTTCGAAGGACTGGAGTGGGAATCAGAGCTTCACGGGTAAAAAGC
CGATGTCACATCGGCCGTTTCGAAACTCCTCCTCTTGCAGTGAGGTGAAGACATTT
GAAAATCACCCCACTGCAAACCTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTCACATTGAAATGCT
GTAAATGACGTGGGCCCGAGTGCAATCGCGGAAGCCAGGGTTTCCAGCTAGG
ACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCGGGACACTGCCTGGCAGAGGCTGCGAGCATG
GGGCCCTGGGGCTGGAAATTGCGCTGGACCGTCGCCTTGCTCCTCGCCGCGGCGG
GGACTGCAGGTAAGGCTTGCTCCAGGCGCCAGAATAGGTTGAGAGGGAGCCCCCG
GGGGGCCCTTGGGAATTTATTTTTTTGGGTACAAATAATCACTCC
```

##### ■ 1R:

```
GGCCCCCGGGGGCTCCCTCTCAACCTATTCTGGCGCCTGGAGCAAGCCTTACCT
```

GCAGTCCCCGCCGCGGGCAGGAGCAAGGCGACGGTCCAGCGCAATTTCCAGCCCC  
AGGGCCCCATGCTCGCAGCCTCTGCCAGGCAGTGTCCCGACCCGGATCACGACCT  
GCTGTGTCCTAGCTGGA AACCCCTGGCTTCCCGCGATTGCACTCGGGGCCACGTC  
ATTTACAGCATTTC AATGTGAGGTTTCTAGCAGGGGAGGAGTTTGCAGTGGGGT  
GATTTTCAAATGTCTTCACCTCACTGCAAGAGGAGGAGTTTGAACGGCCGATGT  
GACATCGGCTTTTTAACCCGTGAAGCTCTGATTCCCACTCCAGTCCTTCGAAAGT  
GTCGCCAGGGCAGGCGACTTGATTTGTTGTATTTGGGTCTCCGGTGAAGAGCTGA  
CGCCCCCTCAAAATTGAAACGCATCTTCTGAAAGATCCTCCTGAAATTTCTCGA  
TGTTTAACTGTAAACATTTTGCTGTTGTTGTCCACAGAAGGATAACAACAGCCTT  
TCAAGATCCTCCAATAGCCTAATGCCATTGTCTCTCTGCCTCAAAAGGAAAACA  
CTAAAAATGTTGGGA ACTTCCGCCACTTTCTATATTTGCCTTTTCCTTC

### Exón 2

■ 2F:

ACAGTGTCTCTCTTGGGTTCCCTTCTTTGTGTCTCCACTGAATTTTGGGGTTCAT  
AAAATTTCAATTTGTTGTGCTTGCTTAATTCCTGGGAATCAGACTGTTCTGATC  
GGATGACATTTCTGGTTAATTTCTTTAGTTGGCAGGAAATAGACACAGGAAACGTG  
GTCAGTTTCTGATTCTGGCGTTGAGAGACCCTTTCTCCTTTTCTCTCTCAGT  
GGGCGACAGATGCGAAAGAAACGAGTTCAGTGCCAAGACGGGAAATGCATCTCC  
TACAAGTGGGTCTGCGATGGCAGCGCTGAGTGCCAGGATGGCTCTGATGAGTCCC  
AGGAGACGTGCTGTGAGTCCCCTTTGGGCATGATATGCATTTATTTTTGTAATAG  
AGACAGGGTCTCGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAATTTCTGGTCTCAAGTGA  
TCCGCTGGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCACCACGCCTGGCCTG  
TGACACGATTCTTAACCCCTTTTTGATGATGGCGGCTGGAAAAGTGGCCAGTGGA  
TTTTGATGTATTCAATCATGAATTAGGAGGTGGG

■ 2R:

TTTTCCAGCCGCCATCATCAAAAAGGGGTAAAGAATCGTGTCACAGGCCAGGCGT  
GGTGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCCAGCGGATCACTTGAGACC  
AGAAATTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAGACCCTGTCTCTATTACAAAAA  
TAAATGCATATCATGCCCAAAGGGGACTCACAGCACGTCTCCTGGGACTCATCAG  
AGCCATCCTGGCACTCAGCGCTGCCATCGCAGACCCACTTGTAGGAGATGCATTT  
CCCGTCTTGGCACTGGA ACTCGTTTCTTTTCGCATCTGTGCGCCACTGAGAGAGAG  
GAAAAGGAGAAAGGGTCTCTCAACGCCAGAATCAGAAACTGACCACGTTTCTGT  
GTCTATTTCTGCCA ACTAAAGAATTAACCAGAAATGTCATCCGATCAGGAACAG  
TCTGATTCCCAGGGAATTAAGCAAGCACAACAAATGAAATTTTATGAACCCCAA  
ATTCAGTGGAGGACACAAAGAAGGAACCCAAGAGAGACACTTGTCAACAAAGGCT  
AGTGTGTTGATTCCAAAATATGGACTCTCTGGG

### Exón 3

■ 3F:

TCTCACTCTGCCACCCAGGCTGGAGTGCAATGGCAGGATCTCGGCTCACCGCAA  
CCTCCTCCTCCCAGGTTAAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGG  
GACTACAGGTGCCCGCCACCACACCCAACTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGAC  
AGGGTTTCACTATATTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCCCTGACCTCACGTGATCC  
ACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGTGCTCG  
GCCTCAGTGGGTCTTTCCCTTTGAGTGACAGTTCAATCCTGTCTCTTCTGTAGTG

TCTGTACCTGCAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGGGGCCGTGTCAACCGCTGC  
ATTCCTCAGTTCTGGAGGTGCGATGGCCAAGTGGACTGCGACAACGGCTCAGAC  
GAGCAAGGCTGTGTAAGTGTGGCCCTGCCTTTGCTATTGAGCCTATCTGAGTC  
CTGGGGAGTGGTCTGACTTTGTCTCTACGGGGTCCTGCTCGAGCTGCAAGGCAG  
CTGCCCCGAACTGGGCTCCATCTCTTGGGGGCTCATACCAAGCCC

■ 3R:

CTGCCTTGCAGCTCGAGCAGGACCCCGTAGAGACAAAGTCAGACCACTCCCCAG  
GACTCAGATAGGCTCAATAGCAAAGGCAGGGCCACACTTACGACAGCCTTGCTC  
GTCTGAGCCGTTGTGCGAGTCCACTTGGCCATCGCACCTCCAGAAGTGAAGTGA  
GCAGCGTTGACACGGCCCCCACAGCTGAAGTCCCGGATTTGCAGGTGACAGA  
CACTACAGAAGAGACAGGATTGAACTGTCACTCAAAGGAAAGACCCACTGAGGC  
CGAGCACAGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCGGGT  
GGATCACGTGAGGTGAGGGTTCAAGACCAGCCTGGCCAATATAGTAAAACCT  
GTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGTTGGGTGTGGTGGCGGGCACCTGTAGTC  
CCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTTAACCTGGGAGGAGGAGG  
TTGCGGTGAGCCGAGATCCTGCCATTGCACTCCAGCCTGGGTGGCAGAGTGAGA  
CTCCGTCACACACACACACAAAAAAGACCCACTGGCCTTG

**Exón 4**

■ 4F:

TCCCTGCAGCCCCAAGACGTGCTCCCAGGACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAA  
GTGCATCTCTCGGCAGTTCGTCTGTGACTCAGACCCGGACTGCTTGGACGGCTCA  
GACGAGGCCTCCTGCCCCGTGCTCACCTGTGGTCCCAGCCTTCCAGTGCAACA  
GCTCCACCTGCATCCCCAGCTGTGGCCCTGCGACAACGACCCCGACTGCGAAGA  
TGGCTCGGATGAGTGGCCGACGCTGTAGGGGTCTTTACGTGTTCCAAGGGGAC  
AGTAGCCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCCTACTGCCTAAGTGGCGAGTGCATCCACT  
CCAGCTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAA  
CTGCGGTATGGGCGGGGCCAGGGTGGGGGCGGGGCGTCTATCACCTGTCCCTGG  
GCTCCCCCAGGTGTGGGACATGCAGTGATTTAA

■ 4R:

GCTGGAGTGGATGCACTCGCCACTTAGGCAGTGGAAGTTCGAAGGCCGAGCAGGGG  
CTACTGTCCCCTTGGAAACACGTAAAGACCCCTACAGCGCTGCGGCCACTCATCCG  
AGCCATCTTCGAGTCGGGGTTCGTTGTGCGAGGCCACAGCTGGGGGATGCAGGT  
GGAGCTGTTGCACTGGAAGCTGGCGGGACCACAGGTGAGCACCGGGCAGGAGGCC  
TCGTCTGAGCCGTCCAAGCAGTCCCCTGCTGAGTACAGACGAACTGCCGAGAGA  
TGCACTTCCCATCGTGGCAGCGAAACTCGTCCTGGGAGCACGTCTTGGGGGCTGC  
AGGGATGGATGGGCCGAGACCACCATCACCGTGTGAAGTCTCCCAACACCAGCCC  
ATTCTATAGCCGGGGACGCTGCCGAGTGGGCCAGGCCCTGGAAAGGCGGGCT  
GGGGAGCAGTCAGGGGCCATGACTCTGAACCACTGGCCCTCTCAA

**Exón 5**

■ 5F:

TCTGTCTGTTTTCCAGCTGTGGCCACCTGTGCCCCTGACGAATTCCAGTGCTC  
TGATGGAAACTGCATCCATGGCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAA

GGACATGAGCGATGAAGTTGGCTGCGTTAATGGTGAGCGCTGGCCATCTGGTTT  
TCCATCCCCATTCTCTGTGC

- 5R:  
CTCACCATTAACGCAGCCAACTTCATCGCTCATGTCCTTGCAGTCATATTCCCG  
GTCACACTGCCGGCTGCCATGGATGCAGTTTCCATCAGAGCACTGGAATTCGTC  
AGGGCGACAGGTGGCCACAGCTGGAAAACAGGACAGAGTGTGTTGATTTTCTCA  
AGAAGAGACAACCAGAGAAAAAGAAGCAG

### Exón 6

- 6F:  
CCACCGTGCCCGACGCGTTTTCTTAATGAATCCATTTGCATGCGTTCTTATGTGA  
ATAAACTATTATATGAATGAGTGCCAAGCAAAGTGGCTCAGACACACCTGACC  
TTCTCCTTCTCTCTCTGGCTCTCACAGTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAG  
TTCAAGTGTACAGCGGCGAATGCATCACCTGGACAAAGTCTGCAACATGGCTA  
GAGACTGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAGAGTGCGGTGAGTCTCGGTG  
CAGGCGCTTGCAGAGTTTGTGGGGAGCCAGGAAAGGGACTGAGACATGAGTGCT  
GTAG

- 6R:  
CTCTGCAAGCCGCCTGCACCGAGACTCACCGCACTCTTTGATGGGTTCATCTGAC  
CAGTCCCAGCAGTCTCTAGCCATGTTGCAGACTTTGTCCAGGGTGATGCATTTCGC  
CGCTGTGACACTTGAACCTGTTGGGTCCCTCGCAGAGTGTCACTGTGAGAGCCAG  
AGAGAGGAAGGAGGAAGGTCAGGTGTGTCTGAGCCTCAGTTTGCTTGGCACTCAT  
TCATATAATAGTTTATTCACATAAGAACGCATGCAAATGGATTCATTAAGAAAAC  
GCGTCCGGGCACGGTGGTTTGTGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCA  
GGCAGATCGC

### Exón 7

- 7F:  
TGAGGCAGGAGAATCGCTTGTACCCAGGAGGCGGAGGTGCGCAGTGAGCCGAGATC  
GTGCCATTACACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGTGAAACTCCGTCTCTCCTAAAAA  
TACAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCATGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGG  
AGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGTAATGAGCCAA  
GGTTGGCGGCGAAGGGATGGGTAGGGGCCCGAGAGTGACCAGTCTGCATCCCCTG  
GCCCTGCGCAGGGACCAACGAATGCTTGGACAACAACGGCGGCTGTTCCCACGTC  
TGCAATGACCTTAAGATCGGCTACGAGTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGCTGG  
TGGCCAGCGAAGATGCGAAGGTGATTCCCGGGTGGGACTGAGCCCTGGGCCCCC  
TCTGCGCTTCTGACATGGCAACCAACCCTCATGCCTCAGTTTCCCCATCTGT  
TAA

- 7R:  
TCAGGAAGCGCAGAGGGGGCCAGGGCTCAGTCCCACCCGGAATCACCTTCGCA  
TCTTCGCTGGGCCACCAGCTGGAAGCCGTCCGGGCACAGGCACTCGTAGCCGATC  
TTAAGGTCATTGCAGACGTGGGAACAGCCGCGTGTGTGCCAAGCATTCTGTTGG  
TCCCTGCGCAGGGCCAGGGGATGCAGACTGGTCACTCTCGGGCCCTACCCATCC  
CTTCGCCGCCAACCTTGGCTCATTACAACCTCCACCTCCCAGGGTTCAAGTGATTC

TCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCATGCGCCACCATGCCAG  
CTAATTTTTTTGTATTTTTAGGAGAGACGGAGTTTACTCTTGTTGCCAGGCTG  
GAGTGTAATGGCACGATCTCGGCTCACTGCGACCTCCGCCTCTGGGTACAAGCG  
ATTCTCTGCCTCAGCCTCCCACTTAGCTGGGATTACAGGCACCCACGACCA

**Exón 8**

- 8F:  
GGCTGCCTTCGAGGTGTGGGTTTTGGCCTGGGCCCATCGCTCCGTCTCTAGCCA  
TTGGGGAAGAGCCTCCCAACCAAGCCTCTTTCTCTCTTCCAGATATCGATGAG  
TGTCAGGATCCCGACACCTGCAGCCAGCTCTGCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACA  
AGTGCCAGTGTGAGGAAGGCTTCCAGCTGGACCCACACGAAGGCCTGCAAGGC  
TGTGGGTGAGCACGGGAAGGCGGGTGGGGCGGCCTCACCCCTTGCAGGCAG  
CAGTGGTGGGGGAGTTTCATCCTCTGAACTTTGCACAGACT
- 8R:  
CTGCTGCCTGCAAGGGGTGAGGCCGCCCCACCCGCCCTTCCCGTGCTCACCC  
ACAGCCTTGCAGGCCTTCGTGTGGGGTCCAGCTGGAAGCCTTCCACACTGGC  
ACTTGTAGCCACCCTCCAGGTTACGCAGAGCTGGCTGCAGGTGTCGGGATCCTG  
ACACTCATCGATATCTGGAAGAGAGAGAAAGAGGCTTGGTGGGGAGGCTCTTCC  
CAATGGCTAGAGACGGAGCGATGGGGCCAGGCCAAAACCCACACCTTCGAAGGC  
AGCCAGGAGACAGCCAGCCTCTCGGGAGATGTAATCAAGGA

**Exón 9**

- 9F:  
GACCCCAAGGCTCCATCGCCTACCTCTTCTTACCAACCGGCACGAGGTCAGGAA  
GATGACGCTGGACCGGAGCGAGTACACCAGCCTCATCCCAACCTGAGGAACGTG  
GTCGCTCTGGACACGGAGGTGGCCAGCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCC  
AGAGAATGATCTGCAGGTGAGCGTCGCCCTGCCTGCAGCCTTGGCCCCGAGGTG  
AGATGAGGGCTCCTGGTGCTGATGCCCTTCTCTCCTCCTGCCTCAGCACCCAGCT  
TGACAGAGCCCACGGCGTCTCT
- 9R:  
TGAGGCAGGAGGAGAGAAGGGCATCAGCGCCAGGAGCCCTCATCTCACCTGCGGG  
CCAAGGCTGCAGGCAGGGGCGACGCTCACCTGCAGATCATTCTCTGGGACAGGTC  
AGACCAGTAGATTCTATTGCTGGCCACCTCCGTGTCCAGAGCGACCACGTTCTC  
AGGTTGGGGATGAGGCTGGTGTACTCGCTCCGGTCCAGCGTCATCTTCTGACCT  
CGTGCCGGTTGGTGAAGAAGAGGTAGGCGATGGAGCCTGGGGGTCCGGGGAGCGA  
GGTCAGGGGGTCAGAGGGGACCCGTCGATGGAACC

**Exón 10**

- 10F:  
GCAGCCTTGGCCCCGAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGCTGATGCCCTTCTCTCC  
TCCTGCCTCAGCACCCAGCTTGACAGAGCCCACGGCGTCTTTCCTATGACACCG  
TCATCAGCAGGGACATCCAGGCCCCCGACGGGCTGGCTGTGGACTGGATCCACAG  
CAACATCTACTGGACCGACTCTGTCTGGGCACTGTCTCTGTTGCGGATACCAAG

GGCGTGAAGAGGAAAACGTTATTCAGGGAGAACGGCTCCAAGCCAAGGGCCATCG  
TGGTGGATCCTGTTTCATGGGTGCGTATCCACGACGCTGAGGGCTGCAGAGGGAAT  
GGAGG

- 10R:  
GAACAGGATCCACCACGATGGCCCTTGGCTTGGAGCCGTTCTCCCTGAATAACG  
TTTTCTCTTACAGCCCTTGGTATCCGCAACAGAGACAGTGCCACAGGACAGAGT  
CGGTCCAGTAGATGTTGCTGTGGATCCAGTCCACAGCCAGCCCGTCGGGGGCT  
GGATGTCCTGCTGATGACGGTGTGATAGGAAGAGACGCCGTGGGCTCTGTCAA  
GCTGGGTGCTGAGGCAGGAGGAGAGAAGGGCATCAGCACCAGGAGCCCTCATCT  
CACCTGCGGGCCAAGGCTGCAGGCAGGGGCGACGCTCACCTGCAGATCATTCTC  
TGGG

### Exón 11

- 11F:  
CCTGGCTGTTTCTTCCAGAATTCGTTGCACGCATTGGCTGGGATCCTCCCCGCC  
CTCCAGCCTCACAGCTATTCTCTGTCTCCACCAGCTTCATGTACTGGACTGAC  
TGGGAACTCCCGCCAAGATCAAGAAAGGGGGCCTGAATGGTGTGGACATCTACT  
CGCTGGTGACTGAAAACATTGAGTGGCCCAATGGCATCACCTAGGTATGTTGCG  
AGGACAGCCGTCCAGCCAGGGCCGGGCACAGGCTGGAGGACAGACGGGGTTGC  
CAGGTGGCTCTGGGACAAGCCCAAGCTGC
- 11R:  
CCCGTCTGTCTCCAGCCTGTGCCCGGCCCTGGCTGGGACGGCTGTCTGCGAAC  
ATACCTAGGGTGATGCCATTGGGCCACTGAATGTTTTTCAGTCACCAGCGAGTAGA  
TGTCCACACCATTCAGGCCCCCTTTCTTGATCTTGGCGGGAGTCCCCAGTCAGT  
CCAGTACATGAAGCTGGTGGGAGGACAGAGAATAGCTGTGAGGCTGGAGGGCGGG  
GGAGGATCCCAGCCAATGCGTGCAACGAATTCTGGAAGAAACAGCCAGGCTCAGG  
CTTGGGAAATAGTCTGCTGGGAACCCCAAACCTC

### Exón 12

- 12F:  
GGCCAGGCCCTCAGGACCCTCTGGGACTGGCATCAGCACGTGACCTCTCCTTATC  
CACTTGTGTGTCTAGATCTCCTCAGTGGCCGCTCTACTGGGTTGACTCCAAACT  
TCACTCCATCTCAAGCATCGATGTCAATGGGGGCAACCGGAAGACCATCTTGGAG  
GATGAAAAGAGGCTGGCCACCCCTTCTCCTTGGCCGTCTTTGAGGTGTGGCTTA  
CGTACGAGATGCAAGCACTTAGGTGGCGGATAGACACAGACTATAGATCACTCAA  
GCCAAGATGAACGC
- 12R:  
TCCGCCACCTAAGTGCTTGCATCTCGTACGTAAGCCACACCTCAAAGACGGCCAA  
GGAGAAGGGGTGGGCCAGCCTCTTTTCATCCTCCAAGATGGTCTTCCGGTTGCC  
CCGTTGACATCGATGCTTGAGATGGAGTGAAGTTTGGAGTCAACCCAGTAGAGGC  
GGCCACTGAGGAGATCTAGACACACAAGTGGATAAGGAGAGGTACAGTGCTGATG  
CCAGTCCCAGAGGGGCTGAGGGCCTGGCCACGCTGCTCCGGGCAGGAAGACCC  
CTGCCAGGGACCTAGCA





- 16F:  
TCAGTGTCCAGGGAGATGTGCCAGGCGCTTTCCTGCCGTGACCACCGTCCTCTGC  
CTGCTCCATTTCTTGGTGGCCTTCCCTTTAGACCTGGGCCTCACTCTTGCTTCTCT  
CCTGCAGCTCTGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAATGAGAAGAAGCCAGTAGCG  
TGAGGGCTCTGTCCATTGTCTCCCCATCGGTAAGCGCGGGCCGGTCCCCAGCG  
TCCCCAGGTCACAGCCTCCCGCTATGTGACCTCGTGCTGGCTGGTTGGGCCTG  
TTCACTTTTTCTCC
- 16R:  
GAGGCTGTGACCTGGGGGACGCTGGGGGACCGGCCCGCGCTTACCGATGGGGAGG  
ACAATGGACAGAGCCCTCACGCTACTGGGCTTCTTCTCATTTCTCTGCCAGCAA  
CGTCGCCCAGAGCTGCAGGAGAGAAGCAAGAGTGAGGCCAGGTCTAAAGGAAGG  
CCACCAAGAAATGGAGCAGGCAGAGGACGGTGGTCACGGCAGGAAAGCGCCTGGC  
ACATCTCCCTGGACACTTGGAGAACTTCCCAAGTCTGCGAGAGGCCACACGGGC

### Exón 17

- 17F:  
ACTCTTGACCTCATGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGG  
CGTGAGCCACCAGGCCCAGGCCACAAGGCGATCTCTAAACAAACATAAAAGACCA  
GGAGTCAAGGTTATGGTACGATGCCCGTGTTCCTCACTCCAGCCACGGAGCTGGGT  
CTCTGGTCTCGGGGGCAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCTCTCCCTACAGTGCTCCT  
CGTCTTCCCTTGCCTGGGGGTCTTCCCTTCTATGGAAGAAGTGGCGGCTTAAGAAC  
ATCAACAGCATCAACTTTGACAACCCCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGATGAGG  
TCCACATTTGCCACAACCAGGACGGCTACAGCTACCCCTCGGTGAGTGACCCTCT  
CTAGAAAGCCAGAGCCCATGGCGGCCCCCTCCCAGCTGGAGGCATATGATCCTCA  
AG
- 17R:  
GGGCTCTGGCTTTCTAGAGAGGGTCACTCACCGAGGGGTAGCTGTAGCCGTCCCTG  
GTTGTGGCAAATGTGGACCTCATCCTCTGTGGTCTTCTGATAGACGGGGTTGTCA  
AAGTTGATGCTGTTGATGTTCTTAAGCCGCCAGTTCTTCCATAGAAGGAAGACCC  
CCAGGCAAAGGAAGACGAGGAGCACTGTAGGGAGAGGCACGCTCTGTACACACAGC  
TGCCCCCGAGACCAGAGACCCAGCTCCGTGGCTGGAGTGAAAACACGGGCATCGT  
ACCATAACCTTGACTCCTGGTCTTTTATGTTTGTGTTAGAGATCGCCTTGCGGCCT  
GGGCTGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCATTTTGGGAGGCTGAGGCGGGCGG  
ATCATGAGGTCAAGAGTTGAGACCAGCCTGGCCAACATGATGAAACCCAG

### Exón 18

- 18F:  
CTGGCGGCTCCTGGGGGAACATGCTTGGGGATCAGGCTGGGGGAGGCTGCCAGGC  
CCAGGAGGTGAGAAGTAGGTGGCCTCCAGCCGTGTTTCCCTGAGTGCTGGACTGAT  
AGTTTCCGCTGTTTACCATTTGTTGGCAGAGACAGATGGTCAGTCTGGAGGATGA  
CGTGGCGTGAACATCTGCCTGGAGTCCCGTCCCTGCCAGAACCCTTCCCTGAGAC  
CTCGCCGGCCTTGTTTATTCAAAGACAGAGAAGACCAAAGCATTGCCCTGCCAGA  
GCTTTGTTTTATATATTTATTCATCTGGGAGGCAGAACAGGCTTCCGACAGTGCC  
CATGCAATGGCTTGGGTTGGGATTTTGGTTTCTTCCCTTCCCTCGTGAAGGATAAG  
AGAAACAGGCCCGGGGGGACCAGGATGACACCTCCATTTCTCTCCAGGAAGTTTT  
GAGTTTCTCTCCACCGTGACACAATCCTCAAACATGGAAGATGAAAGGGCAGGGG

ATGTCAGGCCAGAGAAGCAAGTGGCTTTCAACACACAACAGCAGATGGCACCAA  
CGGGACCCCTGGCCCTGCCTCATCCACCAATCTCTAAGCCAAACCCCTAAACTC  
AGGAGTCAACGTGTTTACCTCTTCTATGCAAGCCTTGCTAGACAGCC

- 18R:  
CGTTGACTCCTGAGTTTAGGGGTTTGGCTTAGAGATTGGTGGATGAGGCAGGGCC  
AGGGGGTCCCCTGGTGGCCATCTGCTGTTGTGTGTTGAAAGCCACTTGCTTCTCT  
GGGCCTGACATCCCCTGCCCTTTCATCTTCCATGTTTGAGGATTGTGTCACGGTG  
GAGAGAAACTCAAACTTCTGGAGAGAAATGGAGGTGTCATCCTGGTCCCCCG  
GGCCTGTTTCTTATCCTTACAGAGGAAAGGAAGAAACCAAAATCCCAACCCAA  
GCCATTGCATGGGCACTGTCCGAAGCCTGTTCTGCCTCCAGATGAATAAATATA  
TAAAACAAAGCTCTGGCAGGCAATGCTTTGGTCTTCTGTCTTTGAATAAAACA  
AGGCCGGCAGGTCTCAGGAAGGGTCTGGGCAGGGACGGGACTCCAGGCAGATG  
TTCACGCCACGTATCCTCCAGACTGACCATCTGTCTCTGCCAACAATGGTAAA  
CAGCGGAAACTATCAGTCCAGCATTGAGGAAACACGGCTGGAGGCCACCTACTTC  
TCACCTTCTGGGCCTGGCAGCCTCCCCAGCCTGATCCCCAAGCATGTTCCCCA  
GGAGCCGCCAGAGGGAGATGGTGAGTACCGGATTCAGTCACTTCCCCTGCTCTC  
AGGGCAAAA

## 12.4.2. Muestra 2

### Exón 1

- 1F:  
TTTTTAGTGTTTTCTTTTTGAGGCAGAGAGGACAATGGCATTAGGCTATTGGAGG  
ATCTTGAAAGGCTGTTGTTATCCTTCTGTGGACAACAACAGCAAATGTTAACAG  
TTAAACATCGAGAAATTCAGGAGGATCTTTCAGAAGATGCGTTTCCAATTTTGA  
GGGGCGTCAGCTCTTACC GGAGACCCAAATACAACAATCAAGTCGCCTGCC  
TGCGGACACTTTCGAAGGACTGGAGTGGGAATCAGAGCTTACGGGTTAAAAAGC  
CGATGTCACATCGGCCGTTTCGAAACTCCTCCTTGCAGTGAGGTGAAGACATTT  
GAAATCACCCCCTGCAAACTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTCACATTGAAATGC  
TGTAATGACGTGGGCCCGAGTGCAATCGCGGGAAGCCAGGGTTTCCAGCTAGG  
ACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCCGGACACTGCCTGGCAGAGGCTGCGAGCATG  
GGCCCTGGGGCTGGAAATTGCGCTGGACCGTCCGCTTGCCTCGCCGCGGCGG  
GACTGCAGGTAAGGCTTGCTCCAGGCGCCAGAATAGGTTGAGAGGGAGCCCCG  
GGGGCCCTTGGGAATTTATTTTTTTGGGTACAAATAATCACTCCA
- 1R:  
GGGCCCCCGGGGGCTCCCTCTCAACCTATTCTGGCGCCTGGAGCAAGCCTTACC  
TGCAGTCCCCGCGCGGAGGAGCAAGGCGACGGTCCAGCGCAATTTCCAGCCC  
CAGGGCCCCATGCTCGCAGCCTCTGCCAGGCAGTGTCCCGACCCGGATCACGACC  
TGCTGTGTCTTAGCTGGAAACCCTGGCTTCCCGCGATTGCACTCGGGGCCACGT  
CATTTACAGCATTTCATGTGAGGTTTCTAGCAGGGGGAGGAGTTTGCAGTGGGG  
TGATTTTCAAATGTCTTACCTCACTGCAAGAGGAGGAGTTTTCGAACGGCCGATG  
TGACATCGGCTTTTTAACCCTGAAAGCTCTGATTCCCACTCCAGTCCTTCGAAAG  
TGTCGCCAGGGCAGGCGACTTGATTTGTTGTATTTGGGTCTCCGGTGAAGAGCTG  
ACGCCCCCTCAAATTTGAAACGCATCTTCTGAAAGATCCTCCTGAAATTTCTCG  
ATGTTTAACTGTAAACATTTTGTGTTGTTGTCCACAGAAGGATAACAACAGCCT  
TTCAAGATCCTCCAATAGCCTAATGCCATTGTCTCTCTGCCTCAAAGGAAAAC  
ACTAAAATGTTGGGAACCTCCGCCACTTCTATATTTGCCTTTTTCTT

## Exón 2

### ■ 2F:

TTGACAGTGTCTCTCTTGGGTTCCCTTCTTTGTGTCCCTCCACTGAATTTT  
GGGGTTCATAAAATTTCAATTTGTTGTGCTTGCTTAATTCCTGGGAATCAGACTG  
TTCCTGATCGGATGACATTTCTGGTTAATTTCTTTAGTTGGCAGGAAATAGACACA  
GGAAACGTGGTCAGTTTCTGATTCTGGCGTTGAGAGACCCTTTCTCCTTTTCCTC  
TCTCTCAGTGGGCGACAGATGCGAAAGAAACGAGTTCCAGTGCCAAGACGGGAAA  
TGCATCTCCTACAAGTGGGTCTGCGATGGCAGCGCTGAGTGCCAGGATGGCTCTG  
ATGAGTCCCAGGAGACGTGCTGTGAGTCCCCTTTGGGCATGATATGCATTTATTT  
TTGTAATAGAGACAGGGTCTCGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAATTTCTGGT  
CTCAAGTGATCCGCTGGCCTCGGCCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCACCACG  
CCTGGCCTGTGACACGATTCTTAACCCCTTTTGGATGATGGCGCTGGAAAAGTG  
GCCAGTGGATTTTGATGTATTCAATCATGAATTAGGAGGTGG

### ■ 2R:

TTTCCAGCCGCCATCATCAAAAAGGGGTTAAGAATCGTGTACAGGCCAGGCGTG  
GTGCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCCAGCGGATCACTTGAGACCA  
GAAATTCAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAGACCCTGTCTTATTACAAAAAT  
AAATGCATATCATGCCCAAAGGGGACTCACAGCACGTCTCCTGGGACTCATCAGA  
GCCATCCTGGCACTCAGCGCTGCCATCGCAGACCCACTTGTAGGAGATGCATTT  
CCGTCTTGGCACTGGAACCTGTTTCTTTTCGCATCTGTGCCCCACTGAGAGAGAGG  
AAAAGGAGAAAGGGTCTCTCAACGCCAGAATCAGAAACTGACCACGTTTCTGTG  
TCTATTTCTGCCAATAAAGAATTAACCAGAAATGTCATCCGATCAGGAACAGT  
CTGATTTCCAGGGAATTAAGCAAGCACAACAAATGAAATTTTATGAACCCCAAAA  
TTCAGTGGAGGACACAAAGAAGGAACCCAAGAGAGACACTTGTCAACAAAGGCTA  
GTGTTGTTGATTCCAAAATATGGACTCTCTGGGGATTGGG

## Exón 3

### ■ 3F:

CTCACTCTGCCACCCAGGCTGGAGTGCAATGGCAGGATCTCGGCTCACCGCAACC  
TCCTCCTCCCAGGTTAAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGAC  
TACAGGTGCCCGCCACCACACCCAACTAATTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGG  
TTTCACTATATTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCCCTGACCTCACGTGATCCACCCG  
CCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGTGCTCGGCCTCA  
GTGGGTCTTTCTTTGAGTGACAGTTCAATCCTGTCTCTTGTAGTGTCTGTCA  
CCTGCAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGGGGCCGTGTAACCGCTGCATTCCTCA  
GTTCTGGAGGTGCGATGGCCAAGTGGACTGCGACAACGGCTCAGACGAGCAAGGC  
TGTCGTAAGTGTGGCCCTGCCTTTGCTATTGAGCCTATCTGAGTCTGGGGAGTG  
GTCTGACTTTGTCTCTACGGGGTCTGCTCGAGCTGCAAGGCAGCTGCCCCGAAC  
TGGGCTCCATCTCTTGGGGGCTCATACCAAGCCCTCTTCCGA

### ■ 3R:

CAGCTGCCTTGACAGCTCGAGCAGGACCCCGTAGAGACAAAGTCAGACCACTCCCC  
AGGACTCAGATAGGCTCAATAGCAAAGGCAGGGCCACACTTACGACAGCCTTGCT  
CGTCTGAGCCGTTGTGCGAGTCCACTTGGCCATCGCACCTCCAGAACTGAGGAAT  
GCAGCGTTGACACGGCCCCACAGCTGAAGTCCCCGATTGTCAGGTGACAGAC  
ACTACAGAAGAGACAGGATTGAACTGTCACTCAAAGGAAAGACCCACTGAGGCCG  
AGCACAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCGGGTGA  
TCACGTGAGGTCAGGGGTTCAAGACCAGCCTGGCCAATATAGTGAAACCCCTGTCT

CTACTAAAAATACAAAAATTAGTTGGGTGTGGTGGCGGGCACCTGTAGTCCCAGC  
TACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTTAACCTGGGAGGAGGAGGTTGCGG  
TGAGCCGAGATCCTGCCATTGCACTCCAGCCTGGGTGGCAGAGTGAGACTCCGTC  
ACACACACACACAAAAAAGACCCACTGGCCTTGCCAT

#### Exón 4

■ 4F:

GGGGCCTGGCCTCACTGCGGCAGCGTCCCCGGCTATAGAATGGGCTGGTGTGGGA  
GACTTCACACGGTGATGGTGGTCTCGGCCCATCCATCCCTGCAGCCCCAAGACGT  
GCTCCCAGGACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGCAGTTCGTC  
TGTGACTCAGACCGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCCTCCTGCCCGGTGCT  
CACCTGTGGTCCCCGCCAGCTTCCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCCAGCTGT  
GGGCCTGCGACAACGACCCCCGACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGCAGCGC  
TGTAGGGGTCTTTACGTGTTCCAAGGGGACAGTAGCCCTGCTCGGCCTTCGAGTT  
CCACTGCCTAAGTGGCGAGTGCATCCACTCCAGCTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCG  
ACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAAGTGCGGTATGGGCGGGGCCAGGGTGGGG  
GCGGGCGTCTATCACCTGTCCCTGGGCTCCCCCAGGTGTGGGA

■ 4R:

CCCCACCCTGGCCCCGCCCATACCGCAGTTTTCTCGTCAGATTTGTCCCTGCAG  
TCGGGGCCACCATCACAGCGCCAGCTGGAGTGGATGCACTCGCCACTTAGGCAGTG  
GAACTCGAAGGCCGAGCAGGGGCTACTGTCCCCTTGGAACACGTAAAGACCCCTAC  
AGCGCTGCGGCCACTCATCCGAGCCATCTTCGAGTCGGGGTCGTTGTTCGAGGCC  
CACAGCTGGGGGATGCAGGTGGAGCTGTTGCACTGGAAGCTGGCGGGACCACAGGT  
GAGCACCGGGCAGGAGGCCTCGTCTGAGCCGTCCAAGCAGTCCCAGTCTGAGTCAC  
AGACGAACTGCCGAGAGATGCACTTCCCATCGTGGCAGCGAAACTCGTCCCTGGGAG  
CACGTCTTGGGGGCTGCAGGGATGGATGGGCCGAGACCACCATCACCGTGTGAAGT  
CTCCCAACACCAGCCATTCTATAGCCGGGGACGCTGCCGAGTGAGGCCAGGCC  
CTGGAAAGGCGGGCTGGGGAGCAGTCAGGGGCCATGGACTCTGAAC

#### Exón 5

■ 5F:

TCTGTCCCTGTTTTCCAGCTGTGGCCACCTGTGCCCCTGACGAATTCCAGTGCTCTG  
ATGGAAACTGCATCCATGGCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGAC  
ATGAGCGATGAAGTTGGCTGCGTTAATGGTGTGAGCGCTGGCCATCTGGTTTTCCATC  
CCCATTCTCTGTGC

■ 5R:

CCGGCTGCCATGGATGCAGTTTTCCATCAGAGCACTGGAATTCGTCAGGGCGACAGG  
TGGCCACAGCTGGAAAACAGGACAGAGTGTGTTGATTTTCTCAAGAAGAGACAACC  
AGAGAAAAAGAAGCAGGGCCTTTTGA

#### Exón 6

■ 6F:

CCACCGTGCCCGACGCGTTTTCTTAATGAATCCATTTGCATGCGTTCTTATGTGAAT

AAACTATTATATGAATGAGTGCCAAGCAAAGTCTGAGGCTCAGACACACCTGACCTTCC  
TCCTTCTCTCTCTGGCTCTCACAGTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAG  
TGTCACAGCGGCGAATGCATCACCTGGACAAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGC  
CGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAGAGTGCGGTGAGTCTCGGTGCAGGCGGCTT  
GCAGAGTTTGTGGGGAGCCAGGAAAGGGACTGAGACATGAGTGCTGT

- 6R: CTCTGCAAGCCGCCTGCACCGAGACTCACCGCACTCTTTGATGGGTTTCATCTGAC-  
CA  
GTCCCGGCAGTCTCTAGCCATGTTGCAGACTTTGTCCAGGGTGATGCATTGCGCCGT  
GTGACACTTGAACCTGTTGGGTCCCTCGCAGAGTGTCACTGTGAGAGCCAGAGAGAG  
GAAGGAGGAAGGTCAGGTGTGTCTGAGCCTCAGTTTGCTTGGCACTCATTCATATAA  
TAGTTTATTACATAAGAACGCATGCAAATGGATTCAATTAAGAAAACGCGTCGGGCA  
CGGTGGTTTGTGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATC

### Exón 7

- 7F:  
AGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGTACCCAGGAGGCGGAGGTGCGAGTGAGCCGAGAT  
CGTGCCATTACACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGTGAAACTCCGTCTCTCCTAAAAATA  
CAAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCATGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCT  
GAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGTAATGAGCCAAGGTTGGCG  
GCGAAGGGATGGGTAGGGGCCCGAGAGTGACCAGTCTGCATCCCCTGGCCCTGCGCAG  
GGACCAACGAATGCTTGGACAACAACGGCGGCTGTTCCCACGTCTGCAATGACCTTAA  
GATCGGCTACGAGTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGCTGGTGGCCAGCGAAGATGC  
GAAGGTGATTCCCCGGTGGGACTGAGCCCTGGGCCCCCTCTGCGCTTCTGACATGGC  
AACCAAACCCCTCATGCCTCAGTTTCCCACATCTGTTAAGGTGCTTGAAAA
- 7R:  
ATGTCAGGAAGCGCAGAGGGGGCCAGGGCTCAGTCCCACCGGGGAATCACCTTCGCA  
TCTTCGCTGGGCCACCAGCTGGAAGCCGTCGGGGCACAGGCACTCGTAGCCGATCTTA  
AGGTCATTGCAGACGTGGGAACAGCCGCCGTTGTTGTCCAAGCATTGTTGGTCCCTG  
CGCAGGGCCAGGGATGCAGACTGGTCACTCTCGGGCCCCTACCCATCCCTTCGCCGC  
CAACCTTGGCTCATTACAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGC  
CTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCATGCGCCACCATGCCAGCTAATTTTTTTGTAT  
TTTTAGGAGAGACGGAGTTTCACTCTTGTGCCCAGGCTGGAGTGAATGGCACGATC  
TCGGCTCACTGCGACCTCCGCCTCCTGGGTACAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCC  
ACTTAGCTGGGATTACAGGCACCCACGACCA

### Exón 8

- 8F:  
CTCTGGCTGCCTTCGAGGTGTGGGTTTTGGCCTGGGCCCCATCGCTCCGTCTCTAGCC  
ATTGGGGAAGAGCCTCCCCACCAAGCCTCTTTCTCTCTTCCAGATATCGATGAGTG  
TCAGGATCCCGACACCTGCAGCCAGCTCTGCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACAAGTGC  
CAGTGTGAGGAAGGCTTCCAGCTGGACCCCCACACGAAGGCCTGCAAGGCTGTGGGTG  
AGCACGGGAAGGCGGCGGGTGGGGCGGCCTCACCCCTTGCAGGCAGCAGTGGTGGGG  
GAGTTTCATCCTCTGAACTTTGCACAGACTC

- 8R:  
 CTGCTGCCTGCAAGGGGTGAGGCCGCCCCACCCGCCGCTTCCCGTGCTCACCCACA  
 GCCTTGACAGGCCTTCGTGTGGGGGTCCAGCTGGAAGCCTTCCTCACACTGGCACTTGT  
 AGCCACCCTCCAGGTTACGCAGAGCTGGCTGCAGGTGTCGGGATCCTGACACTCATC  
 GATATCTGGAAGAGAGAGAAAAGAGGCTTGGTGGGGAGGCTCTTCCCCAATGGCTAGAG  
 ACGGAGCGATGGGGCCCAGGCCAAAACCCACACCTTCGAAGGCAGCCAGGAGACAGCC  
 CAGCCTCTCGGGAGATGTAATCAAGGAA

**Exón 9**

- 9F:  
 GGACCCCCAGGCTCCATCGCCTACCTCTTCTTCACCAACCGGCACGAGGTCAGGAAGA  
 TGACGCTGGACCGGAGCGAGTACACCAGCCTCATCCCCAACCTGAGGAACGTGGTCGC  
 TCTGGACACGGAGGTGGCCAGCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCCAGAGAATG  
 ATCTGCAGGTGAGCGTCGCCCTGCCTGCAGCCTTGGCCCGCAGGTGAGATGAGGGCT  
 CCTGGCGCTGATGCCCTTCTCTCCTCCTGCCTCAGCACCCAGCTTGACAGAGCCCACG  
 GCGTCTTCTCCTATGACACCGTC
- 9R:  
 CTGGGTGCTGAGGCAGGAGGAGAGAAGGGCATCAGCGCCAGGAGCCCTCATCTCACCT  
 GCGGGCCAAGGCTGCAGGCAGGGGCGACGCTCACCTGCAGATCATTCTCTGGGACAGG  
 TCAGACCAGTAGATTCTATTGCTGGCCACCTCCGTGTCCAGAGCGACCACGTTCCCTCA  
 GGTTGGGGATGAGGCTGGTGTACTCGCTCCGGTCCAGCGTCATCTTCTGACCTCGTG  
 CCGGTTGGTGAAGAAGAGGTAGGCGATGGAGCCTGGGGGTCCGGGGAGCGAGGTCAGG  
 GGGTCAGAGGGGACCCGTCGATGGAACCA

**Exón 10**

- 10F:  
 TGCAGCCTTGGCCCGCAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGCTGATGCCCTTCTCTCCTC  
 CTGCCTCAGCACCCAGCTTGACAGAGCCCACGGCGTCTCTTCCTATGACACCGTCATC  
 AGCAGGGACATCCAGGCCCCCGACGGGCTGGCTGTGGACTGGATCCACAGCAACATCT  
 ACTGGACCGACTCTGTCCTGGGCACTGTCTCTGTTGCGGATACCAAGGGCGTGAAGAG  
 GAAAACGTTATTCAGGGAGAACGGCTCCAAGCCAAGGGCCATCGTGGTGGATCCTGTT  
 CATGGGTGCGTATCCACGACGCTGAGGGCTGCAGAGGGAATGG
- 10R:  
 CACCCATGAACAGGATCCACCACGATGGCCCTTGGCTTGGAGCCGTTCTCCCTGAATA  
 ACGTTTTCTCTTTCACGCCCTTGGTATCCGCAACAGAGACAGTGCCAGGACAGAGTC  
 GGTCCAGTAGATGTTGCTGTGGATCCAGTCCACAGCCAGCCGTCGGGGGCCTGGATG  
 TCCCTGCTGATGACGGTGTTCATAGGAAGAGACGCCGTGGGCTCTGTCAAGCTGGGTGC  
 TGAGGCAGGAGGAGAGAAGGGCATCAGCACCCAGGAGCCCTCATCTCACCTGCGGGCCA  
 AGGCTGCAGGCAGGGGCGACGCTCACCTGCAGATCATTCTCTGGG

**Exón 11**

- 11F:  
 CCTGGCTGTTTCTTCCAGAAATTCGTTGCACGCATTGGCTGGGATCCTCCCCGCCCTC

CAGCCTCACAGCTATTCTCTGTCCTCCCACCAGCTTCATGTACTGGACTGACTGGGGA  
ACTCCCGCCAAGATCAAGAAAGGGGGCCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGCTGGTGA  
CTGAAAACATTCAGTGGCCCAATGGCATCACCCCTAGGTATGTTTCGACAGGACAGCCGTC  
CCAGCCAGGGCCGGGCACAGGCTGGAGGACAGACGGGGGTTGCCAGGTGGCTCTGGGA  
CAAGCCCAAGCTGCT

- 11R:  
CCCCGTCTGTCCTCCAGCCTGTGCCCGGCCCTGGCTGGGACGGCTGTCCTGCGAACAT  
ACCTAGGGTGATGCCATTGGGCCACTGAATGTTTTTCAGTCACCAGCGAGTAGATGTCC  
ACACCATTCAGGCCCCCTTTCTTGATCTTGGCGGGAGTTCACCAGTCAGTCCAGTACA  
TGAAGCTGGTGGGAGGACAGAGAATAGCTGTGAGGCTGGAGGGCGGGGGAGGATCCCA  
GCCAATGCGTGCAACGAATTCTGGAAGAAACAGCCAGGCTCAGGCTTGGGAAATAGTC  
CTGCTGGGAACCCCAAACCT

### Exón 12

- 12F:  
CGTGGCCAGGCCCTCAGGACCCTCTGGGACTGGCATCAGCACGTGACCTCTCCTTATC  
CACTTGTGTGTCTAGATCTCCTCAGTGGCCGCCTCTACTGGGTTGACTCCAAACTTCA  
CTCCATCTCAAGCATCGATGTCAATGGGGGCAACCGGAAGACCATCTTGGAGGATGAA  
AAGAGGCTGGCCACCCCTTCTCCTTGGCCGTCTTTGAGGTGTGGCTTACGTACGAGA  
TGCAAGCACTTAGGTGGCGGATAGACACAGACTATAGATCACTCAAGCCAAGATGAAC  
GCA

- 12R:

### Exón 13-14

- 13-14F:  
GACAACAAAAAACTAGTTGTGGAGAGAGGGTGGCCTGTGTCTTATCCCAGTGTTTAA  
CGGGATTTGTCATCTTCCTTGCTGCCTGTTTAGGACAAAGTATTTTGGACAGATATCA  
TCAACGAAGCCATTTTCAGTGCCAACCGCCTCACAGGTTCCGATGTCAACTTGTGGC  
TGAAAACCTACTGTCCCCAGAGGATATGGTTCTCTTCCACAACCTCACCCAGCCAAGA  
GGTAAGGGTGGGTCAGCCCCACCCCCCAACCTTGAAACCTCCTTGTGGAAACTCTGG  
AATGTTCTGGAAATTTCTGGAATCTTCTGGTATAGCTGATGATCTCGTTCCCTGCCCTG  
ACTCCGCTTCTTCTGCCCCAGGAGTGAACCTGGTGTGAGAGGACCACCCTGAGCAATGG  
CGGCTGCCAGTATCTGTGCCTCCCTGCCCGCAGATCAACCCCACTCGCCCAAGTTT  
ACCTGCGCCTGCCCGGACGGCATGCTGCTGGCCAGGGACATGAGGAGCTGCCTCACAG  
GTGTGGCACACGCCTTGTTTCTGCGTCTGTGTCTCCAACCTGCCCTCCTGAGCCT  
CTCTCTGCTCATCTGTCAAATGGGTAC
- 13-14R:  
GGGGCAGTTGGAGGACACAGGACGCAGAAACAAGGCGTGTGCCACACCTGTGAGGCAG  
CTCCTCATGTCCCTGGCCAGCAGCATGCCGTCCGGGCAGGCGCAGGTAAACTTGGGCG  
AGTGGGGGTTGATCTGCGGGGCAGGAGGCACAGATACTGGCAGCCGCCATTGCTCAG  
GGTGGTCCCTCTCACACCAGTTCACCTCCTGGGGCAGAAGAAGCGGAGTCAGGGCAGGAA  
CGAGATCATCAGCTATAACCAGAAGATTCCAGAAATTTCCAGAACATTCCAGAGTTTCC  
ACAAGGAGGTTTCAAGGTTGGGGGGTGGGGCTGACCCACCCTTACCTCTTGGCTGGG  
TGAGGTTGTGGAAGAGAACCATATCCTCTGGGGACAGTAGGTTTTTCAGCCAACAAGTT

GACATCGGAACCTGTGAGGCGGTTGGCACTGAAAATGGCTTCGTTGATGATATCTGTC  
CAAAATACTTTGTCCTAAACAGGCAGCAAGGAAGATGACAAATCCCGTTAAACACTGG  
GATGAGACACAGGCCACCCTCTCTCCACAAGTATTTTTTTGTTTGTCTGTTTGTGTTG  
TTTGTGTTTTCAGACAGAGTTTCACTTTTGT

**Exón 15**

- 15F:  
CAGAGATCCTCCTGCCTTGGCCTCCCAAGGTCATTTGAGACTTTCGTCATTAGGCGCA  
CACCTATGAGAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACTCAGAAGACGTTTATTTATTTCTTTC  
AGAGGCTGAGGCTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGC  
TCCACAGCCGTAAGGACACAGCACACAACCACCCGGCCTGTTCCCGACACCTCCCGGC  
TGCCTGGGGCCACCCCTGGGCTCACCACGGTGGAGATAGTGACAATGTCTCACCAAGG  
TAAAGACTGGGCCCTCCCTAGGCCCTCTTACCCAGAGACGGGTCCCTTCAGTGGCC  
ACGAACATTTTGGTAC
  
- 15R:  
TCTCTGGGTGAGAGGGGCTAGGGAGGGCCAGTCTTTACCTTGGTGAGACATTGTCA  
CTATCTCCACCGTGGTGAGCCAGGGGTGGCCCCAGGCAGCCGGAGGTGTGCGGAAC  
AGGCCGGGTGGTTGTGTGCTGTGTCTTACGGCTGTGGAGCTGACCTTTAGCCTGACG  
GTGGATGTCTCCTGGGTGGCCACTGCAGCCTCAGCCTCTGAAAGAATAAATAAACGTC  
TTCTGAGTGCCACGTGCCTGCAGGCCCTTCTCATAGGTGTGCGCCTAATGACGAAAGT  
CTCAAATGACCTTGGGAGGCCAAGGCAGGAGGATCTCTTGAGTGAGTCCAGGAGTTTA  
AGACTAGCCTGGTCAACATG

**Exón 16**

- 16F:  
GTGTCCAGGGAGATGTGCCAGGCGCTTTCCTGCCGTGACCACCGTCCTCTGCCTGCTC  
CATTTCTTGGTGGCCTTTCCTTTAGACCTGGGCCTCACTCTTGCTTCTCTCCTGCAGCT  
CTGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAATGAGAAGAAGCCCAGTAGCGTGAGGGCTCTGT  
CCATTGTCTCCTCCCATCGGTAAGCGCGGGCCGGTCCCCCAGCGTCCCCCAGGTCACAG  
CCTCCCGCTATGTGACCTCGTGCTGGCTGGTTGGGCCTGTTCACTTTTTCTCCG
  
- 16R:  
AGGCTGTGACCTGGGGGACGCTGGGGGACCGGCCCGCGCTTACCGATGGGGAGGACAA  
TGGACAGAGCCCTCACGCTACTGGGCTTCTTCTCATTTCCTCTGCCAGCAACGTCGCC  
CAGAGCTGCAGGAGAGAAGCAAGAGTGAGGCCAGGTCTAAAGGAAGGCCACCAAAAA  
ATGGAGCAGGCAGAGACGGTGGTACGGCAGGAAAGCGCCTGGCACATCTCCCTGGA  
CACTTGGAGAACTTCCAAGTCTGCGAGAGGCCACACGGGCTTATTTGTGAGA

**Exón 17**

- 17F:  
TTGACCTCATGATCCGCCCCGCTCAGCCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGGCGTGAGC  
CACCAGGCCAGGCCACAAGGCGATCTCTAAACAAACATAAAAGACCAGGAGTCAAGG  
TTATGGTACGATGCCCGTGTFTTCACTCCAGCCACGGAGCTGGGTCTCTGGTCTCGGG  
GGCAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCTCTCCCTACAGTGCTCCTCGTCTTCTTTGCCTG



GGGGTCTTCCTTCTATGGAAGAAGTGGCGGCTTAAGAACATCAACAGCATCAACTTTG  
ACAACCCCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGATGAGGTCCACATTTGCCACAACCAGGA  
CGGCTACAGCTACCCCTCGGTGAGTGACCTCTCTAGAAAGCCAGAGCCCATGGCGGC  
CCCCTCCAGCTGGAGGCATATGATCCTCAAG

■ 17R:

GGGCTCTGGCTTTCTAGAGAGGGTCACTCACCGAGGGGTAGCTGTAGCCGTCCTGGTT  
GTGGCAAATGTGGACCTCATCCTCTGTGGTCTTCTGATAGACGGGGTTGTCAAAGTTG  
ATGCTGTTGATGTTCTTAAGCCGCCAGTTCTTCCATAGAAGGAAGACCCCCAGGCAA  
GGAAGACGAGGAGCACTGTAGGGAGAGGCACGCTCTGTACACAGCTGCCCCGAGAC  
CAGAGACCCAGCTCCGTGGCTGGAGTGAACACGGGCATCGTACCATAACCTTGACT  
CCTGGTCTTTTATGTTTGTAGAGATCGCCTTGCGGCCTGGGCCTGGTGGCTCACGC  
CTGTAATCCCAGCATTTTGGGAGGCTGAGGCGGGCGGATCATGAGGTCAAGAGTTCGA  
GACCAGCCTGGCCAACATGATGAAACCCAG

**Exón 18**

■ 18F:

TCTGGCGGCTCCTGGGGGAACATGCTTGGGGATCAGGCTGGGGGAGGCTGCCAGGCC  
AGGAGGTGAGAAGTAGGTGGCCTCCAGCCGTGTTTCCTGAATGCTGGACTGATAGTTT  
CCGCTGTTTACCATTTGTTGGCAGAGACAGATGGTCAGTCTGGAGGATGACGTGGCGT  
GAACATCTGCCTGGAGTCCCCTGCCAGAACCTTCCCTGAGACCTCGCCGGCCT  
TGTTTTATTCAAAGACAGAGAAGACCAAAGCATTGCCTGCCAGAGCTTTGTTTTATAT  
ATTTATTCATCTGGGAGGCAGAACAGGCTTCGGACAGTGCCCATGCAATGGCTTGGGT  
TGGGATTTTGGTTTCTTCCCTTTCCTCGTGAAGGATAAGAGAAACAGGCCCGGGGGAC  
CAGGATGACACCTCCATTTCTCTCCAGGAAGTTTGTAGTTTCTCTCCACCGTGACACA  
ATCCTCAAACATGGAAGATGAAAGGGCAGGGGATGTCAGGCCAGAGAAGCAAGTGGC  
TTTCAACACACAACAGCAGATGGCACCAACGGGACCCCTGGCCCTGCCTCATCCACC  
AATCTTAAGCCAAACCCCTAAACTCAGGAGTCAACGTGTTTACCTCTTCTATGCAAG  
CCTTGCTAGACAGCCAGGTTAAGCCTTTGA

■ 18R:

CTCCTGAGTTTAGGGGTTTGGCTTAGAGATTGGTGGATGAGGCAGGGCCAGGGGGTCC  
CGTTGGTGCCATCTGCTGTTGTGTGTTGAAAGCCACTTGCTTCTCTGGGCCTGACATC  
CCCTGCCCTTTCATCTTCCATGTTTGGAGGATGTGTACGCTGGAGAGAACTCAAAA  
CTTCCCTGGAGAGAAATGGAGGTGTCATCCTGGTCCCCCGGGCCTGTTTCTCTTATCC  
TTCACGAGGAAAGGAAGAAACCAAAATCCCAACCCAAGCCATTGCATGGGCACTGTCC  
GAAGCCTGTTCTGCCTCCAGATGAATAAATATATAAAACAAAGCTCTGGCAGGCAAT  
GCTTTGGTCTTCTCTGTCTTTGAATAAAACAAGGCCGGCGAGGTCTCAGGAAGGGTTC  
TGGGCAGGGACGGGACTCCAGGCAGATGTTTACGCCACGTCATCCTCCAGACTGACCA  
TCTGTCTCTGCCAACAATGGTAAACAGCGGAAACTATCAGTCCAGCATTCAGGAAAC  
ACGGCTGGAGGCCACCTACTTCTCACCTTCTGGGCCTGGCAGCCTCCCCAGCCTGAT  
CCCCAAGCATGTTCCCCAGGAGCCGCCAGAGGGAGATGGTGTAGTACCGGATTCAGTC  
ACTTCCACTGCTCTCAGGGCAAAAGCCAAAAGTA

### 12.4.3. Congruencia entre cebadores

```

PCRLDLR1_LDLR-1F -----TTTTAGTGTTCCTTT
PCRLDLR1_LDLR-1R GAAGGAAAAGGCAAATATAGAAAAGTGGCGGAAGTCCCAACATTTTTAGTGTTCCTTT
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F TGAGGCAGAGAGGACAATGGCATTAGGCTATTGGAGGATCTTGAAAGGCTGTTGTTATCC
PCRLDLR1_LDLR-1R TGAGGCAGAGAGGACAATGGCATTAGGCTATTGGAGGATCTTGAAAGGCTGTTGTTATCC
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F TTCTGTGGACAACAACAGCAAAATGTTAACAGTTAAACATCGAGAAATTCAGGAGGATC
PCRLDLR1_LDLR-1R TTCTGTGGACAACAACAGCAAAATGTTAACAGTTAAACATCGAGAAATTCAGGAGGATC
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F TTTCAGAAGATGCGTTTCCAATTTTGAGGGGGCGTCAGCTCTTCACCGGAGACCAAATA
PCRLDLR1_LDLR-1R TTTCAGAAGATGCGTTTCCAATTTTGAGGGGGCGTCAGCTCTTCACCGGAGACCAAATA
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F CAACAAATCAAGTCGCTGCCCTGGCGACACTTTCGAAGGACTGGAGTGGGAATCAGAGC
PCRLDLR1_LDLR-1R CAACAAATCAAGTCGCTGCCCTGGCGACACTTTCGAAGGACTGGAGTGGGAATCAGAGC
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F TTCACGGGTTAAAAAGCCGATGTCACATCGGCCGTTGAAACTCCTCCTTGCAGTGAG
PCRLDLR1_LDLR-1R TTCACGGGTTAAAAAGCCGATGTCACATCGGCCGTTGAAACTCCTCCTTGCAGTGAG
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F GTGAAGACATTTGAAAATCACCCACTGCAAACTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTCACATT
PCRLDLR1_LDLR-1R GTGAAGACATTTGAAAATCACCCACTGCAAACTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTCACATT
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F GAAATGCTGTAATGACGTGGGCCCGAGTGAATCGCGGGAAGCCAGGGTTCCAGCTA
PCRLDLR1_LDLR-1R GAAATGCTGTAATGACGTGGGCCCGAGTGAATCGCGGGAAGCCAGGGTTCCAGCTA
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F GGACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCGGGACACTGCCTGGCAGAGGCTGCGAGCATGGGG
PCRLDLR1_LDLR-1R GGACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCGGGACACTGCCTGGCAGAGGCTGCGAGCATGGGG
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F CCCTGGGGCTGGAATTTGCGTGGACCGTCGCCTTGTCTCCTCGCCGCGGGGGACTGCA
PCRLDLR1_LDLR-1R CCCTGGGGCTGGAATTTGCGTGGACCGTCGCCTTGTCTCCTCGCCGCGGGGGACTGCA
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F GGTAAGGCTTGCTCCAGGCAGCAATAGGTTGAGAGGGAGCCCCGGGGGCTTGGG
PCRLDLR1_LDLR-1R GGTAAGGCTTGCTCCAGGCAGCAATAGGTTGAGAGGGAGCCCCGGGGGCTTGGG
*****

PCRLDLR1_LDLR-1F AATTTATTTTTTGGGTACAATAATCACTCC
PCRLDLR1_LDLR-1R -----

```

Figura 12.9: Congruencia entre cebadores F y R del exón 1.

```

PCRLDLR2_LDLR-2F -----AC-AGTGTCTCTCTT
PCRLDLR2_LDLR-2R CCCAGAGAGTCCATATTTTGAATCAACAACACTAGCCTTTGTTGACAAGTGTCTCTCTT
** *****

PCRLDLR2_LDLR-2F GGGTTCCTTCTTTGTGTCTCCACTGAATTTGGGGTTCATAAAATTTTCATTTGTTGTGC
PCRLDLR2_LDLR-2R GGGTTCCTTCTTTGTGTCTCCACTGAATTTGGGGTTCATAAAATTTTCATTTGTTGTGC
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F TTGCTTAATCCCTGGGAATCAGACTGTTCTGATCGGATGACATTTCTGGTTAATCTT
PCRLDLR2_LDLR-2R TTGCTTAATCCCTGGGAATCAGACTGTTCTGATCGGATGACATTTCTGGTTAATCTT
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F TAGTTGGCAGGAAATAGACACAGGAAACGTGGTCAGTTTCTGATTCTGGCGTTGAGAGAC
PCRLDLR2_LDLR-2R TAGTTGGCAGGAAATAGACACAGGAAACGTGGTCAGTTTCTGATTCTGGCGTTGAGAGAC
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F CCTTTCCTTTTCTCTCTCAGTGGCGACAGATGCGAAAGAAACGAGTTCAGTGC
PCRLDLR2_LDLR-2R CCTTTCCTTTTCTCTCTCAGTGGCGACAGATGCGAAAGAAACGAGTTCAGTGC
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F CAAGACGGGAAATGCATCTCCTACAAGTGGGTCTGCGATGGCAGCGCTGAGTGCCAGGAT
PCRLDLR2_LDLR-2R CAAGACGGGAAATGCATCTCCTACAAGTGGGTCTGCGATGGCAGCGCTGAGTGCCAGGAT
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F GGCTCTGATGAGTCCCAGGAGACGTGCTGTGAGTCCCCTTTGGGCATGATATGCATTTAT
PCRLDLR2_LDLR-2R GGCTCTGATGAGTCCCAGGAGACGTGCTGTGAGTCCCCTTTGGGCATGATATGCATTTAT
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F TTTTGAATAGAGACAGGGTCTCGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAATTTCTGGTCTC
PCRLDLR2_LDLR-2R TTTTGAATAGAGACAGGGTCTCGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAATTTCTGGTCTC
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F AAGTGATCCGCTGGCCTCGGCCTCCAAAGTGTGGGATTACAGGCACACGCCTGGCCT
PCRLDLR2_LDLR-2R AAGTGATCCGCTGGCCTCGGCCTCCAAAGTGTGGGATTACAGGCACACGCCTGGCCT
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F GTGACACGATTCTTAACCCCTTTTGTGATGGCGGCTGGAAAAGTGGCCAAGTGGATTTT
PCRLDLR2_LDLR-2R GTGACACGATTCTTAACCCCTTTTGTGATGGCGGCTGGAAA-----
*****

PCRLDLR2_LDLR-2F GATGATTCAATCATGAATTAGGAGGTGGG
PCRLDLR2_LDLR-2R -----

```

Figura 12.10: Congruencia entre cebadores F y R del exón 2.

```

PCRLDLR3_LDLR-3F -----TCTCACTCTGCCACCCAG
PCRLDLR3_LDLR-3R CAAGGCCAGTGGGTCTTTTGTGTGTGTGTGTGACGGAGTCTCACTCTGCCACCCAG
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F GCTGGAGTGAATGGCAGGATCTCGGCTCACCCGAACCTCCTCTCCAGGTTAAAGTGA
PCRLDLR3_LDLR-3R GCTGGAGTGAATGGCAGGATCTCGGCTCACCCGAACCTCCTCTCCAGGTTAAAGTGA
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F TTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGTGCCCGCACCACACCCAACT
PCRLDLR3_LDLR-3R TTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGTGCCCGCACCACACCCAACT
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F AATTTTGTATTTTGTAGTAGACAGGGTTTCACTATATTGGCCAGGCTGGTCTTGAACC
PCRLDLR3_LDLR-3R AATTTTGTATTTTGTAGTAGACAGGGTTTCACTATATTGGCCAGGCTGGTCTTGAACC
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F CCTGACCTCACGTGATCCACCCGCCCTTGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCGTGAG
PCRLDLR3_LDLR-3R CCTGACCTCACGTGATCCACCCGCCCTTGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCGTGAG
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F CCACTGTGCTCGGCCCTCAGTGGGTCTTCTTTGAGTGACAGTTCAATCCTGTCTTCT
PCRLDLR3_LDLR-3R CCACTGTGCTCGGCCCTCAGTGGGTCTTCTTTGAGTGACAGTTCAATCCTGTCTTCT
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F GTAGTGTCTGTACCTGCAAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGGGCCGTGCAACC6CTGC
PCRLDLR3_LDLR-3R GTAGTGTCTGTACCTGCAAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGGGCCGTGCAACC6CTGC
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F ATTCTCAGTTCTGGAGGTGCGATGGCCAAGTGGACTGCGACAACGGCTCAGACGAGCAA
PCRLDLR3_LDLR-3R ATTCTCAGTTCTGGAGGTGCGATGGCCAAGTGGACTGCGACAACGGCTCAGACGAGCAA
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F GGCTGTGTAAGTGTGGCCCTGCCTTGTCTATTGAGCCTATCTGAGTCTGGGGAGTGGT
PCRLDLR3_LDLR-3R GGCTGTGTAAGTGTGGCCCTGCCTTGTCTATTGAGCCTATCTGAGTCTGGGGAGTGGT
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F CTGACTTTGTCTCTACGGGGTCTGCTCGAGCTGCAAGGCAGCTGCCCGAATGGGCTC
PCRLDLR3_LDLR-3R CTGACTTTGTCTCTACGGGGTCTGCTCGAGCTGCAAGGCAG-----
*****

PCRLDLR3_LDLR-3F CATCTCTTGGGGGCTCATACCAAGCCC
PCRLDLR3_LDLR-3R -----

```

Figura 12.11: Congruencia entre cebadores F y R del exón 3.

```

PCRLDLR4_LDLR-4F -----TCCCTGCAGCCCCAAGACGTGCTCCCAG
PCRLDLR4_LDLR-4R TCACACGGTATGGTGTCTCGGCCATCCATCCCTGCAGCCCCAAGACGTGCTCCCAG
*****

PCRLDLR4_LDLR-4F GACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGAGTTCGTCTGTGACTCAGAC
PCRLDLR4_LDLR-4R GACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGAGTTCGTCTGTGACTCAGAC
*****

PCRLDLR4_LDLR-4F CGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCTCCTGCCCGGTGCTCACCTGTGGTCCC GCC
PCRLDLR4_LDLR-4R CGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCTCCTGCCCGGTGCTCACCTGTGGTCCC GCC
*****

PCRLDLR4_LDLR-4F AGCTTCCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCAGCTGTGGGCTGCGACAACGACCCC
PCRLDLR4_LDLR-4R AGCTTCCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCAGCTGTGGGCTGCGACAACGACCCC
*****

PCRLDLR4_LDLR-4F GACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGACGCGCTGTAGGGGTCTTACGTGTTCCAA
PCRLDLR4_LDLR-4R GACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGACGCGCTGTAGGGGTCTTACGTGTTCCAA
*****

PCRLDLR4_LDLR-4F GGGGACAGTAGCCCTGCTCGGCTTTCGAGTTCCTACTGCCTAAGTGGCAGTGCATCCAC
PCRLDLR4_LDLR-4R GGGGACAGTAGCCCTGCTCGGCTTTCGAGTTCCTACTGCCTAAGTGGCAGTGCATCCAC
*****

PCRLDLR4_LDLR-4F TCCAGCTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAAGTGC
PCRLDLR4_LDLR-4R TCCAGC-----
*****

```

Figura 12.12: Congruencia entre cebadores F y R del exón 4.

```

PCRLDLR5_LDLR-5F -----TCTGTCTGTTTTTC
PCRLDLR5_LDLR-5R CTGCTTCTTTTTCTCTGTTGTCTCTTCTTGAGAAAATCAACACACTCTGTCTGTTTTTC
*****

PCRLDLR5_LDLR-5F CAGCTGTGGCCACCTGTCGCCCTGACGAATTCAGTGCTCTGATGGAAACTGCATCCATG
PCRLDLR5_LDLR-5R CAGCTGTGGCCACCTGTCGCCCTGACGAATTCAGTGCTCTGATGGAAACTGCATCCATG
*****

PCRLDLR5_LDLR-5F GCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGATGAAGTTGGCTGCG
PCRLDLR5_LDLR-5R GCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGATGAAGTTGGCTGCG
*****

PCRLDLR5_LDLR-5F TTAATGGTGAGCGCTGGCCATCTGGTTTTCCATCCCCATTCTCTGTGC
PCRLDLR5_LDLR-5R TTAATGGTGAG-----
*****

```

Figura 12.13: Congruencia entre cebadores F y R del exón 5.

```

PCRLDLR6_LDLR-6F -----CCACCGTGCC
PCRLDLR6_LDLR-6R GCGATCTGCCTGCCTTGCCTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCACAAACCACCGTGCCC
*****

PCRLDLR6_LDLR-6F GACGCGTTTTCTTAATGAATCCATTTGCATGCGTTCTTATGTGAATAAACTATTATATGA
PCRLDLR6_LDLR-6R GACGCGTTTTCTTAATGAATCCATTTGCATGCGTTCTTATGTGAATAAACTATTATATGA
*****

PCRLDLR6_LDLR-6F ATGAGTGCCAAGCAAAGTGAAGCTCAGACACACCTGACCTTCTCCTCTCTCTGCG
PCRLDLR6_LDLR-6R ATGAGTGCCAAGCAAAGTGAAGCTCAGACACACCTGACCTTCTCCTCTCTCTGCG
*****

PCRLDLR6_LDLR-6F TCTCACAGTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAGTGTACAGCGGCGAATGCAT
PCRLDLR6_LDLR-6R TCTCACAGTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAGTGTACAGCGGCGAATGCAT
*****

PCRLDLR6_LDLR-6F CACCCTGGACAAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCAT
PCRLDLR6_LDLR-6R CACCCTGGACAAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCAT
*****

PCRLDLR6_LDLR-6F CAAAGAGTGCGGTGAGTCTCGGTGCAGGCGGCTTGCAAGTTTGTGGGGAGCCAGGAAAG
PCRLDLR6_LDLR-6R CAAAGAGTGCGGTGAGTCTCGGTGCAGGCGGCTTGCAAG-----
*****

```

Figura 12.14: Congruencia entre cebadores F y R del exón 6.

```

PCRLDLR7_LDLR-7F -----TGAGGCAGGAGAATCGTTGTA
PCRLDLR7_LDLR-7R TGGTCGTGGGTGCCTGTAATCCCAGCTAAGTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGTTGTA
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F CCCAGGAGCGGAGGTCGCAGTGAGCCGAGATCGTGCCATTACACTCCAGCCTGGGCAAC
PCRLDLR7_LDLR-7R CCCAGGAGCGGAGGTCGCAGTGAGCCGAGATCGTGCCATTACACTCCAGCCTGGGCAAC
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F AAGAGTGAAACTCCGTCTCTCTCTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCAT
PCRLDLR7_LDLR-7R AAGAGTGAAACTCCGTCTCTCTCTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCAT
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F GCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGTG
PCRLDLR7_LDLR-7R GCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGTG
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F GAGGTTGTAATGAGCCAAGGTTGGCGGCAGAGGATGGGTAGGGGCCGAGAGTGACCAG
PCRLDLR7_LDLR-7R GAGGTTGTAATGAGCCAAGGTTGGCGGCAGAGGATGGGTAGGGGCCGAGAGTGACCAG
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F TCTGCATCCCCTGGCCCTGCGCAGGGACCAACGAATGCTTGGACAACACGGCGGCTGT
PCRLDLR7_LDLR-7R TCTGCATCCCCTGGCCCTGCGCAGGGACCAACGAATGCTTGGACAACACGGCGGCTGT
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F CCCACGTCTGCAATGACCTTAAGATCGGCTACGAGTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGC
PCRLDLR7_LDLR-7R CCCACGTCTGCAATGACCTTAAGATCGGCTACGAGTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGC
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F TGGTGGCCAGCGAAGATGCGAAGGTTGATCCCGGGTGGGACTGAGCCCTGGGCCCCCTC
PCRLDLR7_LDLR-7R TGGTGGCCAGCGAAGATGCGAAGGTTGATCCCGGGTGGGACTGAGCCCTGGGCCCCCTC
*****

PCRLDLR7_LDLR-7F TGCCTTCTGACATGGCAACCAACCCTCATGCCTCAGTTTCCCATCTGTTAA
PCRLDLR7_LDLR-7R TGCCTTCTGACATGGCAACCAACCCTCATGCCTCAGTTTCCCATCTGTTAA
*****

```

Figura 12.15: Congruencia entre cebadores F y R del exón 7.

```

PCRLDLR8_LDLR-8F -----GGCTGCCTTCG-AGGTGTGGGT
PCRLDLR8_LDLR-8R TCCTTGATTACATCTCCCAGAGGCTGGGCTGTCTCTGGCTGCCTTCAAGGTGTGGGT
*****

PCRLDLR8_LDLR-8F TTTGGCTGGGCCCATCGCTCCGTCTCTAGCCATTGGGGAAGAGCCTCCCACCAAGCC
PCRLDLR8_LDLR-8R TTTGGCTGGGCCCATCGCTCCGTCTCTAGCCATTGGGGAAGAGCCTCCCACCAAGCC
*****

PCRLDLR8_LDLR-8F TCTTTCTCTCTTCCAGATATCGATGAGTGTGAGGATCCCACACTGCAGCCAGCTCT
PCRLDLR8_LDLR-8R TCTTTCTCTCTTCCAGATATCGATGAGTGTGAGGATCCCACACTGCAGCCAGCTCT
*****

PCRLDLR8_LDLR-8F GCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACAAGTCCAGTGTGAGGAAGGCTTCCAGCTGGACCCC
PCRLDLR8_LDLR-8R GCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACAAGTCCAGTGTGAGGAAGGCTTCCAGCTGGACCCC
*****

PCRLDLR8_LDLR-8F ACACGAAGCCTGCAAGGCTGTGGGTGAGCACGGGAAGCGGGTGGGGCGGCCTCA
PCRLDLR8_LDLR-8R ACACGAAGCCTGCAAGGCTGTGGGTGAGCACGGGAAGCGGGTGGGGCGGCCTCA
*****

PCRLDLR8_LDLR-8F CCCCTTGACAGCAGCAGTGGTGGGGAGTTTCATCCTCTGAACCTTGCACAGACT
PCRLDLR8_LDLR-8R CCCCTTGACAGCAGCAGTGGTGGGGAGTTTCATCCTCTGAACCTTGCACAGACT
*****

```

Figura 12.16: Congruencia entre cebadores F y R del exón 8.

```

PCRLDLR9_LDLR-9F -----GACCCCAAGGCTCCA
PCRLDLR9_LDLR-9R GGTTCATCGACGGTCCCTCTGACCCCTGACCTCGCTCCCGGACCCCAAGGCTCCA
*****

PCRLDLR9_LDLR-9F TCGCCTACCTCTTCTTCAACAACCGGCACGAGGTCAGGAAGATGACGCTGGACCGGAGCG
PCRLDLR9_LDLR-9R TCGCCTACCTCTTCTTCAACAACCGGCACGAGGTCAGGAAGATGACGCTGGACCGGAGCG
*****

PCRLDLR9_LDLR-9F AGTACACCAGCCTCATCCCCAACCTGAGGAACGTGGTCGCTCTGGACACGGAGGTGGCCA
PCRLDLR9_LDLR-9R AGTACACCAGCCTCATCCCCAACCTGAGGAACGTGGTCGCTCTGGACACGGAGGTGGCCA
*****

PCRLDLR9_LDLR-9F GCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCCAGAGAATGATCTGCAGGTGAGCGTCGCCCC
PCRLDLR9_LDLR-9R GCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCCAGAGAATGATCTGCAGGTGAGCGTCGCCCC
*****

PCRLDLR9_LDLR-9F TGCCTGCAGCCTTGCCCGCAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGTGATGCCCTTCTCTCC
PCRLDLR9_LDLR-9R TGCCTGCAGCCTTGCCCGCAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGCGTGTGATGCCCTTCTCTCC
*****

PCRLDLR9_LDLR-9F TCCTGCCTCAGCACCCAGCTTGACAGAGCCACGGCGTCTTCTCTATGACAC
PCRLDLR9_LDLR-9R TCCTGCCTCA-----
*****

```

Figura 12.17: Congruencia entre cebadores F y R del exón 9.

```

PCRLDLR10_LDLR-10F -----GCAGCCTTGGCCCGCAGGTGAG
PCRLDLR10_LDLR-10R CCCAGAGAATGATCTGCAGGTGAGCGTCGCCCTGCCTGCAGCCTTGGCCCGCAGGTGAG
*****

PCRLDLR10_LDLR-10F ATGAGGGCTCCTGGTGTGATGCCCTTCTCTCCTCCTGCCTCAGCACCCAGCTTGACAGA
PCRLDLR10_LDLR-10R ATGAGGGCTCCTGGTGTGATGCCCTTCTCTCCTCCTGCCTCAGCACCCAGCTTGACAGA
*****

PCRLDLR10_LDLR-10F GCCCACGGCGTCTTCTTATGACACCGTCTATCAGCAGGACATCCAGGCCCCGACGGG
PCRLDLR10_LDLR-10R GCCCACGGCGTCTTCTTATGACACCGTCTATCAGCAGGACATCCAGGCCCCGACGGG
*****

PCRLDLR10_LDLR-10F CTGGCTGTGGACTGGATCCACAGCAACATCTACTGGACCGACTGTCTCTGGCACTGTC
PCRLDLR10_LDLR-10R CTGGCTGTGGACTGGATCCACAGCAACATCTACTGGACCGACTGTCTCTGGCACTGTC
*****

PCRLDLR10_LDLR-10F TCTGTTGCGGATACCAAGGGCGTGAAGAGAAAACGTTATTAGGGAGAACGGCTCCAAG
PCRLDLR10_LDLR-10R TCTGTTGCGGATACCAAGGGCGTGAAGAGAAAACGTTATTAGGGAGAACGGCTCCAAG
*****

PCRLDLR10_LDLR-10F CCAAGGGCCATCGTGGTGGATCCTGTTCTGTTGCGTATCCACGACGCTGAGGGCTGCA
PCRLDLR10_LDLR-10R CCAAGGGCCATCGTGGTGGATCCTGTTCTGTTGCGTATCCACGACGCTGAGGGCTGCA
*****

```

Figura 12.18: Congruencia entre cebadores F y R del exón 10.

```

PCRLDLR11_LDLR-11F -----CCTGGCTGTTCTTCCAGAA
PCRLDLR11_LDLR-11R GAGTTTGGGGTCCAGCAGGACTATTCCCAAGCCTGAGCCTGGCTGTTCTTCCAGAA
*****

PCRLDLR11_LDLR-11F TTCGTTGCACGCATTGGCTGGGATCCTCCCCGCCCTCCAGCCTCACAGCTATTCTCTGT
PCRLDLR11_LDLR-11R TTCGTTGCACGCATTGGCTGGGATCCTCCCCGCCCTCCAGCCTCACAGCTATTCTCTGT
*****

PCRLDLR11_LDLR-11F CCTCCCACAGCTTCATGTAAGTACTGGACTGACTGGGGAACCTCCGCAAGATCAAGAAAGGG
PCRLDLR11_LDLR-11R CCTCCCACAGCTTCATGTAAGTACTGGACTGACTGGGGAACCTCCGCAAGATCAAGAAAGGG
*****

PCRLDLR11_LDLR-11F GGCCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGTGGTACTGAAAACATTCAAGTGGCCAATGGC
PCRLDLR11_LDLR-11R GGCCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGTGGTACTGAAAACATTCAAGTGGCCAATGGC
*****

PCRLDLR11_LDLR-11F ATCACCTAGGTATGTTTCGAGGACAGCCGTCCCAGCCAGGGCCGGGCACAGGCTGGAGG
PCRLDLR11_LDLR-11R ATCACCTAGGTATGTTTCGAGGACAGCCGTCCCAGCCAGGGCCGGGCACAGGCTGGAGG
*****

PCRLDLR11_LDLR-11F ACAGACGGGGTTGCCAGGTGGCTCTGGGACAAGCCCAAGCTGC
PCRLDLR11_LDLR-11R ACAGACGGG-----
*****

```

Figura 12.19: Congruencia entre cebadores F y R del exón 11.



```

PCRLDLR12_LDLR-12F -----GGCCAGGCCCTCAGGACC
PCRLDLR12_LDLR-12R TGCTAGGTCCTGGCAGGGGTCTTCTGCCCGGAGCAGCTGGCCAGGCCCTCAGGCC
*****

PCRLDLR12_LDLR-12F CTCTGGGACTGGCATCAGCACGTGACCTCTCTTATCCACTTGTGTGTAGATCTCCTC
PCRLDLR12_LDLR-12R CTCTGGGACTGGCATCAGCACGTGACCTCTCTTATCCACTTGTGTGTAGATCTCCTC
*****

PCRLDLR12_LDLR-12F AGTGGCCGCCTACTGGGTTGACTCCAACCTCCTCCATCTCAAGCATCGATGTCAAT
PCRLDLR12_LDLR-12R AGTGGCCGCCTACTGGGTTGACTCCAACCTCCTCCATCTCAAGCATCGATGTCAAC
*****

PCRLDLR12_LDLR-12F GGGGGCAACCGAAGACCATCTTGGAGGATGAAAAGAGGCTGGCCACCCCTTCTCCTTG
PCRLDLR12_LDLR-12R GGGGGCAACCGAAGACCATCTTGGAGGATGAAAAGAGGCTGGCCACCCCTTCTCCTTG
*****

PCRLDLR12_LDLR-12F GCCGTCTTTGAGGTGTGGCTTACGTACGAGATGCAAGCACTTAGGTGGCGGATAGACACA
PCRLDLR12_LDLR-12R GCCGTCTTTGAGGTGTGGCTTACGTACGAGATGCAAGCACTTAGGTGGCGGA-----
*****

PCRLDLR12_LDLR-12F GACTATAGTCACTCAAGCCAAGATGAACGC
PCRLDLR12_LDLR-12R -----

```

Figura 12.20: Congruencia entre cebadores F y R del exón 12.

```

PCRLDLR13-4_LDLR-134F -----GAC-AACAAAAAACTAGTT
PCRLDLR13-4_LDLR-134R AAAAGTGAAACTGTCTGAAACAACAAACAAACAAACAGACAAACAAAAAACTAGTT
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F GTGGAGAGAGGGTGGCCTGTGTCTCATCCAGTGTTAACGGGATTGTGCATCTCCTTG
PCRLDLR13-4_LDLR-134R GTGGAGAGAGGGTGGCCTGTGTCTCATCCAGTGTTAACGGGATTGTGCATCTCCTTG
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F CTGCCTGTTTAGGACAAAGTATTTTGGACAGATATCATCAACGAAGCCATTTTCAGTGCC
PCRLDLR13-4_LDLR-134R CTGCCTGTTTAGGACAAAGTATTTTGGACAGATATCATCAACGAAGCCATTTTCAGTGCC
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F AACCGCCTCACAGGTTCCGATGTCAACTTGTGGCTGAAAACCTACTGTCCCCAGAGGAT
PCRLDLR13-4_LDLR-134R AACCGCCTCACAGGTTCCGATGTCAACTTGTGGCTGAAAACCTACTGTCCCCAGAGGAT
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F ATGGTCTCTTCCACAACCTCACCCAGCCAAGAGTAAAGGTTGGTGGGTCAGCCCCACCCCC
PCRLDLR13-4_LDLR-134R ATGGTCTCTTCCACAACCTCACCCAGCCAAGAGTAAAGGTTGGTGGGTCAGCCCCACCCCC
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F CAACCTTGAAACCTCCTTGTGAAACTCTGGAATGTTCTGGAATTTCTGGAATCTTCTG
PCRLDLR13-4_LDLR-134R CAACCTTGAAACCTCCTTGTGAAACTCTGGAATGTTCTGGAATTTCTGGAATCTTCTG
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F GTATAGCTGATGATCTCGTTCCTGCCCTGACTCCGCTTCTTCTGCCCAGGAGTGAAGT
PCRLDLR13-4_LDLR-134R GTATAGCTGATGATCTCGTTCCTGCCCTGACTCCGCTTCTTCTGCCCAGGAGTGAAGT
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F GTGTGAGAGGACCACCTGAGCAATGGCGCTGCCAGTATCTGTGCTCCCTGCCCGCA
PCRLDLR13-4_LDLR-134R GTGTGAGAGGACCACCTGAGCAATGGCGCTGCCAGTATCTGTGCTCCCTGCCCGCA
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F GATCAACCCCACTCGCCCAAGTTTACCTGCGCTGCCCGGACGGCATGCTGTGCCAG
PCRLDLR13-4_LDLR-134R GATCAACCCCACTCGCCCAAGTTTACCTGCGCTGCCCGGACGGCATGCTGTGCCAG
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F GGACATGAGGAGCTGCCTCACAGGTGTGGCACACGCCTTGTCTTCTGCGTCTGTCTCTC
PCRLDLR13-4_LDLR-134R GGACATGAGGAGCTGCCTCACAGGTGTGGCACACGCCTTGTCTTCTGCGTCTGTCTCTC
*****

PCRLDLR13-4_LDLR-134F CAACTGCCCCCTCTGAGCCTCTCTGCTCATCTGTCAAATGG
PCRLDLR13-4_LDLR-134R CAACTGCCCC-----
*****

```

Figura 12.21: Congruencia entre cebadores F y R del exón 13-14.



```

PCRLDLR15_LDLR-15F -----TCAGAGATCCTCCTGCCTGGC
PCRLDLR15_LDLR-15R CATGTTGACCAGGCTAGTCTTAACTCCTGGACTCAAGAGATCCTCCTGCCTGGC
*****

PCRLDLR15_LDLR-15F CTCCCAAGGTCATTTGAGACTTTCGTATTAGGCGCACACCTATGAGAAGGGCCTGCAGG
PCRLDLR15_LDLR-15R CTCCCAAGGTCATTTGAGACTTTCGTATTAGGCGCACACCTATGAGAAGGGCCTGCAGG
*****

PCRLDLR15_LDLR-15F CACGTGGCACTCAGAAGACGTTTATTTATTTCTTTAGAGGCTGAGGCTGCAGTGGCCACC
PCRLDLR15_LDLR-15R CACGTGGCACTCAGAAGACGTTTATTTATTTCTTTAGAGGCTGAGGCTGCAGTGGCCACC
*****

PCRLDLR15_LDLR-15F CAGGAGACATCCACCCTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCACAGCCGTAAGGACACAGCACACA
PCRLDLR15_LDLR-15R CAGGAGACATCCACCCTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCACAGCCGTAAGGACACAGCACACA
*****

PCRLDLR15_LDLR-15F ACCACCCGGCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGGGGCCACCCCTGGGCTCACCACG
PCRLDLR15_LDLR-15R ACCACCCGGCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGGGGCCACCCCTGGGCTCACCACG
*****

PCRLDLR15_LDLR-15F GTGGAGATAGTGACAATGTCTACCAAGGTAAGACTGGGCCCTCCCTAGGCCCTCTTC
PCRLDLR15_LDLR-15R GTGGAGATAGTGACAATGTCTACCAAGGTAAGACTGGGCCCTCCCTAGGCCCTC-TC
*****

PCRLDLR15_LDLR-15F ACCCAGAGACGGGTCCTTCAGTGCCACGAACATTTTGGTCAC
PCRLDLR15_LDLR-15R ACCCAGAGAC-----
*****

```

Figura 12.22: Congruencia entre cebadores F y R del exón 15.

```

PCRLDLR16_LDLR-16F -----TCAGTGTCCAGGGAGATGTCCAGG
PCRLDLR16_LDLR-16R GCCCGTGTGGCTCTCGCAGACTTGGGAAGTTCTCCAAGTGTCCAGGGAGATGTCCAGG
*****

PCRLDLR16_LDLR-16F CGCTTTCCTGCCGTGACCACCGTCTCTGCCTGTCCATTTCTTGGTGGCCTTCTTTAG
PCRLDLR16_LDLR-16R CGCTTTCCTGCCGTGACCACCGTCTCTGCCTGTCCATTTCTTGGTGGCCTTCTTTAG
*****

PCRLDLR16_LDLR-16F ACCTGGGCTCACTCTTGTCTCTCTGCAGCTCTGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAA
PCRLDLR16_LDLR-16R ACCTGGGCTCACTCTTGTCTCTCTGCAGCTCTGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAA
*****

PCRLDLR16_LDLR-16F TGAGAAGAAGCCAGTAGCGTGAGGGCTGTCCATTGTCTCCCATCGGTAAGCGCGG
PCRLDLR16_LDLR-16R TGAGAAGAAGCCAGTAGCGTGAGGGCTGTCCATTGTCTCCCATCGGTAAGCGCGG
*****

PCRLDLR16_LDLR-16F GCCGGTCCCCAGCGTCCCCAGGTCACAGCCTCCCGCTATGTGACCTCGTGCCTGGCTG
PCRLDLR16_LDLR-16R GCCGGTCCCCAGCGTCCCCAGGTCACAGCCTCCCGCTATGTGACCTCGTGCCTGGCTG
*****

```

Figura 12.23: Congruencia entre cebadores F y R del exón 16.

```

PCRLDLR17_LDLR-17F -----ACTTTGACCTCATGATCCGCCCGCC
PCRLDLR17_LDLR-17R CTGGGTTTCATCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCTTGACCTCATGATCCGCCCGCC
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F TCAGCCTCCAAAATGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCAGGCCAGGCCACAAGGCGA
PCRLDLR17_LDLR-17R TCAGCCTCCAAAATGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCAGGCCAGGCCACAAGGCGA
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F TCTCTAAACAAACATAAAAAGACCAGGAGTCAAGGTTATGGTACGATGCCCGTGTTCAC
PCRLDLR17_LDLR-17R TCTCTAAACAAACATAAAAAGACCAGGAGTCAAGGTTATGGTACGATGCCCGTGTTCAC
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F TCCAGCCACGGAGCTGGGTCTCTGGTCTCGGGGGCAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCTCTC
PCRLDLR17_LDLR-17R TCCAGCCACGGAGCTGGGTCTCTGGTCTCGGGGGCAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCTCTC
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F CCTACAGTGCTCCTCGTCTTCTTTGCCGCGGGGTCTTCTTCTATGGAAGAACTGGCGG
PCRLDLR17_LDLR-17R CCTACAGTGCTCCTCGTCTTCTTTGCCGCGGGGTCTTCTTCTATGGAAGAACTGGCGG
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F CTTAAGAACATCAACAGCATCAACTTTGACAACCCCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGAT
PCRLDLR17_LDLR-17R CTTAAGAACATCAACAGCATCAACTTTGACAACCCCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGAT
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F GAGGTCCACATTTGCCACAACCAGGACGGCTACAGCTACCCCTCGGTGAGTGACCCCTCTC
PCRLDLR17_LDLR-17R GAGGTCCACATTTGCCACAACCAGGACGGCTACAGCTACCCCTCGGTGAGTGACCCCTCTC
*****

PCRLDLR17_LDLR-17F TAGAAAAGCCAGAGCCCATGGCGGCCCCCTCCAGCTGGAGGCATATGATCCTCAAG
PCRLDLR17_LDLR-17R TAGAAAAGCCAGAGCCC-----
*****

```

Figura 12.24: Congruencia entre cebadores F y R del exón 17.

```

PCRLDLR18_LDLR-18F -----CTGGCGG
PCRLDLR18_LDLR-18R TTTTGCCCTGAGAGCAGTGGGAAGTGACTGAATCCGGTACTCACCATCTCCCTCTGGCGG
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F CTCTGGGGGAACATGCTTGGGGATCAGGCTGGGGGAGGCTGCCAGGCCAGGAGGTGAG
PCRLDLR18_LDLR-18R CTCTGGGGGAACATGCTTGGGGATCAGGCTGGGGGAGGCTGCCAGGCCAGGAGGTGAG
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F AAGTAGGTGGCTCCAGCCGTGTTCTCTGAGTGTGGACTGATAGTTTCCGCTGTTTACC
PCRLDLR18_LDLR-18R AAGTAGGTGGCTCCAGCCGTGTTCTCTGAGTGTGGACTGATAGTTTCCGCTGTTTACC
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F ATTTGTTGGCAGAGACAGATGGTCAGTCTGGAGGATGACGTGGCGTGAACATCTGCCTGG
PCRLDLR18_LDLR-18R ATTTGTTGGCAGAGACAGATGGTCAGTCTGGAGGATGACGTGGCGTGAACATCTGCCTGG
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F AGTCCCGTCCCTGCCAGAACCTTCTCTGAGACCTCGCCGGCCTTGTTTATTCAAAGAC
PCRLDLR18_LDLR-18R AGTCCCGTCCCTGCCAGAACCTTCTCTGAGACCTCGCCGGCCTTGTTTATTCAAAGAC
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F AGAGAAGACCAAAGCATTGCCTGCCAGAGCTTTGTTTATATATTTATTCATCTGGGAGG
PCRLDLR18_LDLR-18R AGAGAAGACCAAAGCATTGCCTGCCAGAGCTTTGTTTATATATTTATTCATCTGGGAGG
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F CAGAACAGGCTTCGGACAGTGCCCATGCAATGGCTTG6GTTGGGATTTTGGTTTCTTCT
PCRLDLR18_LDLR-18R CAGAACAGGCTTCGGACAGTGCCCATGCAATGGCTTG6GTTGGGATTTTGGTTTCTTCT
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F TTCTCGTGAAGGATAAGAGAAACAGGCCCGGGGGACCAGGATGACACCTCCATTTCTC
PCRLDLR18_LDLR-18R TTCTCGTGAAGGATAAGAGAAACAGGCCCGGGGGACCAGGATGACACCTCCATTTCTC
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F TCCAGGAAGTTTTGAGTTTCTCTCACCGTGACACAATCCTCAAACATGGAAGATGAAAG
PCRLDLR18_LDLR-18R TCCAGGAAGTTTTGAGTTTCTCTCACCGTGACACAATCCTCAAACATGGAAGATGAAAG
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F GGCAGGGGATGTCAGGCCAGAGAAGCAAGTGGCTTTCAACACACAACAGCAGATGGCAC
PCRLDLR18_LDLR-18R GGCAGGGGATGTCAGGCCAGAGAAGCAAGTGGCTTTCAACACACAACAGCAGATGGCAC
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F CAACGGGACCCCTGGCCCTGCCTCATCCACCAATCTCTAAGCCAAACCCCTAAACTCAG
PCRLDLR18_LDLR-18R CAACGGGACCCCTGGCCCTGCCTCATCCACCAATCTCTAAGCCAAACCCCTAAACTCAG
*****

PCRLDLR18_LDLR-18F GAGTCAACGTGTTTACCTCTTCTATGCAAGCCTTGCTAGACAGCC
PCRLDLR18_LDLR-18R GAGTCAACG-----
*****

```

Figura 12.25: Congruencia entre cebadores F y R del exón 18.

#### 12.4.4. Alineamiento con secuencia de referencia

```

LDLR_E1M1      TTTTATGTTTTCTTTTGAGGCAGAGAGGACAATGGCATTAGGCTATTGGAGGATCTT
LDLR_E1M2      TTTTATGTTTTCTTTTGAGGCAGAGAGGACAATGGCATTAGGCTATTGGAGGATCTT
NG_009060.1_E1 -----

LDLR_E1M1      GAAAGGCTGTTGTTATCCTTCTGTGGACAACAACAGCAAAATGTTAACAGTTAAACATCG
LDLR_E1M2      GAAAGGCTGTTGTTATCCTTCTGTGGACAACAACAGCAAAATGTTAACAGTTAAACATCG
NG_009060.1_E1 -----

LDLR_E1M1      AGAAATTCAGGAGGATCTTTCAGAAGATGCGTTTCCAATTTTGAGGGGGCGTCAGCTCT
LDLR_E1M2      AGAAATTCAGGAGGATCTTTCAGAAGATGCGTTTCCAATTTTGAGGGGGCGTCAGCTCT
NG_009060.1_E1 -----

LDLR_E1M1      TCACCGGAGACCCAAATACAACAAATCAAGTCGCCTGCCCTGGCGACACTTTCGAAGGAC
LDLR_E1M2      TCACCGGAGACCCAAATACAACAAATCAAGTCGCCTGCCCTGGCGACACTTTCGAAGGAC
NG_009060.1_E1 -----

LDLR_E1M1      TGGAGTGGGAATCAGAGCTTACGGGTTAAAAAGCCGATGTACATCGGCCGTTTCAAAC
LDLR_E1M2      TGGAGTGGGAATCAGAGCTTACGGGTTAAAAAGCCGATGTACATCGGCCGTTTCAAAC
NG_009060.1_E1 -----

LDLR_E1M1      TCCTCCTCTTGCAGTGAGGTGAAGACATTTGAAAATCACCCACTGCAAACTCCTCCCC
LDLR_E1M2      TCCTCCTCTTGCAGTGAGGTGAAGACATTTGAAAATCACCCACTGCAAACTCCTCCCC
NG_009060.1_E1 ----CTCTTGCAGTGAGGTGAAGACATTTGAAAATCACCCACTGCAAACTCCTCCCC
                      *****

LDLR_E1M1      TGCTAGAAACCTCACATTGAAATGCTGTAATGACGTGGGCCCCGAGTGCAATCGCGGGA
LDLR_E1M2      TGCTAGAAACCTCACATTGAAATGCTGTAATGACGTGGGCCCCGAGTGCAATCGCGGGA
NG_009060.1_E1 TGCTAGAAACCTCACATTGAAATGCTGTAATGACGTGGGCCCCGAGTGCAATCGCGGGA
                      *****

LDLR_E1M1      AGCCAGGGTTTCCAGCTAGGACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCGGGACACTGCCTGGCA
LDLR_E1M2      AGCCAGGGTTTCCAGCTAGGACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCGGGACACTGCCTGGCA
NG_009060.1_E1 AGCCAGGGTTTCCAGCTAGGACACAGCAGGTCGTGATCCGGGTCGGGACACTGCCTGGCA
                      *****

LDLR_E1M1      GAGGCTGCGAGCATGGGGCCCTGGGGCTGAAATTGCGCTGGACCGTGCCTTGTCTCCTC
LDLR_E1M2      GAGGCTGCGAGCATGGGGCCCTGGGGCTGAAATTGCGCTGGACCGTGCCTTGTCTCCTC
NG_009060.1_E1 GAGGCTGCGAGCATGGGGCCCTGGGGCTGAAATTGCGCTGGACCGTGCCTTGTCTCCTC
                      *****

LDLR_E1M1      GCCGCGCGGGGACTGCAGGTAAGGCTTGTCCAGGCGCCAGAATAGGTTGAGAGGGAGC
LDLR_E1M2      GCCGCGCGGGGACTGCAGGTAAGGCTTGTCCAGGCGCCAGAATAGGTTGAGAGGGAGC
NG_009060.1_E1 GCCGCGCGGGGACTGCAG-----
                      *****

LDLR_E1M1      CCCCAGGGGGCC-
LDLR_E1M2      CCCCAGGGGGCCC
NG_009060.1_E1 -----

```

Figura 12.26: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 1

```

LDLR_E2M1      -----ACAAGTGTCTCTTGGGTTCCCTTTTGTGTCTCCACTGAATTTGGGGT
LDLR_E2M2      CCTTTGTTGACAGTGTCTCTTGGGTTCCCTTTTGTGTCTCCACTGAATTTGGGGT
NG_009060.1_E2 -----

LDLR_E2M1      TCATAAAATTTCAATTTGTTGCTTGCTTAATCCCTGGGAATCAGACTGTTCTGATCG
LDLR_E2M2      TCATAAAATTTCAATTTGTTGCTTGCTTAATCCCTGGGAATCAGACTGTTCTGATCG
NG_009060.1_E2 -----

LDLR_E2M1      GATGACATTTCTGGTTAATCTTTAGTTGGCAGGAAATAGACACAGGAAACGTGGTCAGT
LDLR_E2M2      GATGACATTTCTGGTTAATCTTTAGTTGGCAGGAAATAGACACAGGAAACGTGGTCAGT
NG_009060.1_E2 -----

LDLR_E2M1      TTCTGATTCTGGCGTTGAGAGACCCCTTCTCCTTTTCTCTCTCAGTGGGCGACAGAT
LDLR_E2M2      TTCTGATTCTGGCGTTGAGAGACCCCTTCTCCTTTTCTCTCTCAGTGGGCGACAGAT
NG_009060.1_E2 -----TGGGCGACAGAT
                        *****

LDLR_E2M1      GCGAAAGAAACGAGTTCCAGTGCCAAGACGGGAAATGCATCTCCTACAAGTGGGTCTGCG
LDLR_E2M2      GCGAAAGAAACGAGTTCCAGTGCCAAGACGGGAAATGCATCTCCTACAAGTGGGTCTGCG
NG_009060.1_E2 -----
                        *****

LDLR_E2M1      ATGGCAGCGCTGAGTGCCAGGATGGCTCTGATGAGTCCCAGGAGACGTGTGAGTCCC
LDLR_E2M2      ATGGCAGCGCTGAGTGCCAGGATGGCTCTGATGAGTCCCAGGAGACGTGTGAGTCCC
NG_009060.1_E2 -----
                        *****

LDLR_E2M1      CTTTGGGCATGATATGCATTTATTTTGTAAATAGAGACAGGGTCTCGCCATGTTGGCCAG
LDLR_E2M2      CTTTGGGCATGATATGCATTTATTTTGTAAATAGAGACAGGGTCTCGCCATGTTGGCCAG
NG_009060.1_E2 -----

LDLR_E2M1      GCTGGTCTTGAATTTCTGGTCTCAAGTGATCCGCTGGCCCTCGGCCTCCCAAAGTCTGGG
LDLR_E2M2      GCTGGTCTTGAATTTCTGGTCTCAAGTGATCCGCTGGCCCTCGGCCTCCCAAAGTCTGGG
NG_009060.1_E2 -----

LDLR_E2M1      ATTACAGGCACCACGCCTGGCCTGTGACACGATTCTTAACCCCTTTTGTGATGATGGCGGC
LDLR_E2M2      ATTACAGGCACCACGCCTGGCCTGTGACACGATTCTTAACCCCTTTTGTGATGATGGCGGC
NG_009060.1_E2 -----

LDLR_E2M1      TGGAAAA
LDLR_E2M2      TGGAAA-
NG_009060.1_E2 -----

```

Figura 12.27: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 2

```

LDLR_E3M2      -CTCACTCTGCCACCCAGGCTGGAGTGCAATGGCAGGATCTCGGCTCACCGCAACCTCCT
LDLR_E3M1      TCTCACTCTGCCACCCAGGCTGGAGTGCAATGGCAGGATCTCGGCTCACCGCAACCTCCT
NG_009060.1_E3 -----

LDLR_E3M2      CCTCCCAGGTTAAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAGTAGCTGGGACTACAGGTGC
LDLR_E3M1      CCTCCCAGGTTAAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAGTAGCTGGGACTACAGGTGC
NG_009060.1_E3 -----

LDLR_E3M2      CCGCCACCACACCAACTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGTTTCACTATATTGG
LDLR_E3M1      CCGCCACCACACCAACTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGTTTCACTATATTGG
NG_009060.1_E3 -----

LDLR_E3M2      CCAGGCTGGTCTTGAACCCCTGACCTCACGTGATCCACCCGCCTTGGCTCCCAAAGTGC
LDLR_E3M1      CCAGGCTGGTCTTGAACCCCTGACCTCACGTGATCCACCCGCCTTGGCTCCCAAAGTGC
NG_009060.1_E3 -----

LDLR_E3M2      TGGGATTACAGCGTGAGCCACTGTGCTCGGCCTCAGTGGGTCTTTCCTTTGAGTGACAG
LDLR_E3M1      TGGGATTACAGCGTGAGCCACTGTGCTCGGCCTCAGTGGGTCTTTCCTTTGAGTGACAG
NG_009060.1_E3 -----

LDLR_E3M2      TTCAATCCTGTCTCTTCTGTAGTGTCTGTACCTGCAAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGG
LDLR_E3M1      TTCAATCCTGTCTCTTCTGTAGTGTCTGTACCTGCAAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGG
NG_009060.1_E3 -----TGTCTGTACCTGCAAAATCCGGGGACTTCAGCTGTGGG
                        *****

LDLR_E3M2      GGCCGTGTCAACCGTGCATTCTCAGTCTGGAGGTGCGATGGCCAAGTGGACTGCGAC
LDLR_E3M1      GGCCGTGTCAACCGTGCATTCTCAGTCTGGAGGTGCGATGGCCAAGTGGACTGCGAC
NG_009060.1_E3 -----
                        *****

LDLR_E3M2      AACGGCTCAGACGAGCAAGGCTGTCGTAAGTGTGGCCCTGCCTTTGCTATTGAGCCTATC
LDLR_E3M1      AACGGCTCAGACGAGCAAGGCTGTCGTAAGTGTGGCCCTGCCTTTGCTATTGAGCCTATC
NG_009060.1_E3 -----AACGGCTCAGACGAGCAAGGCTGTC-----
                        *****

LDLR_E3M2      TGAGTCTGGGGAGTGGTCTGACTTTGTCTCTACGGGGTCTGCTCGAGCTGCAAGGCAG
LDLR_E3M1      TGAGTCTGGGGAGTGGTCTGACTTTGTCTCTACGGGGTCTGCTCGAGCTGCAAGGCAG
NG_009060.1_E3 -----

LDLR_E3M2      CTG
LDLR_E3M1      ---
NG_009060.1_E3      ---

```

Figura 12.28: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 3

```

LDLR_E4M2      GGGGCTGGCCCTACTCGGCGAGCGTCCCGGCTATAGAATGGGCTGGTGTGGAGACT
LDLR_E4M1      -----
NG_009060.1_E4 -----

LDLR_E4M2      TCACACGGTGATGGTGGTCTCGGCCATCCATCCCTGCAGCCCCAAGACGTGCTCCAG
LDLR_E4M1      -----TCCCTGCAGCCCCAAGACGTGCTCCAG
NG_009060.1_E4 -----CCCCAAGACGTGCTCCAG
                      *****

LDLR_E4M2      GACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGAGTTCTGTGTGACTCAGAC
LDLR_E4M1      GACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGAGTTCTGTGTGACTCAGAC
NG_009060.1_E4 GACGAGTTTCGCTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGAGTTCTGTGTGACTCAGAC
                      *****

LDLR_E4M2      CGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCCTCTGCCGGTGTACCTGTGGTCCCGCC
LDLR_E4M1      CGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCCTCTGCCGGTGTACCTGTGGTCCCGCC
NG_009060.1_E4 CGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCCTCTGCCGGTGTACCTGTGGTCCCGCC
                      *****

LDLR_E4M2      AGCTTCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCAGCTGTGGGCTGCACAAACGACCC
LDLR_E4M1      AGCTTCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCAGCTGTGGGCTGCACAAACGACCC
NG_009060.1_E4 AGCTTCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCAGCTGTGGGCTGCACAAACGACCC
                      *****

LDLR_E4M2      GACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGACGCGTGTAGGGTCTTTACGTGTTCCAA
LDLR_E4M1      GACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGACGCGTGTAGGGTCTTTACGTGTTCCAA
NG_009060.1_E4 GACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGACGCGTGTAGGGTCTTTACGTGTTCCAA
                      *****

LDLR_E4M2      GGGGACAGTAGCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCACCTAGCTAAGTGGGAGTGCATCCAC
LDLR_E4M1      GGGGACAGTAGCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCACCTAGCTAAGTGGGAGTGCATCCAC
NG_009060.1_E4 GGGGACAGTAGCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCACCTAGCTAAGTGGGAGTGCATCCAC
                      *****

LDLR_E4M2      TCCAGTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAATCTG
LDLR_E4M1      TCCAGTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAATCTG
NG_009060.1_E4 TCCAGTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAATCTG
                      *****

LDLR_E4M2      GGTATGGGCGGGCCAGGGTGGGGCGGGGCGTCT-----
LDLR_E4M1      GGTATGGGCGGGCCAGGGTGGGGCGGGGCGTCTATCACCTGTCCCTGGGCTCCCCCA
NG_009060.1_E4 G-----
                      *

LDLR_E4M2      -----
LDLR_E4M1      GGTGTGGGACATGCAGTGATTTAA
NG_009060.1_E4 -----

```

Figura 12.29: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 4

```

LDLR_E5M1      TCTGTCTGTTTTCCAGCTGTGGCCACCTGTCGCCCTGACGAATCCAGTGCTGTGATGG
LDLR_E5M2      TCTGTCTGTTTTCCAGCTGTGGCCACCTGTCGCCCTGACGAATCCAGTGCTGTGATGG
NG_009060.1_E5 -----CTGTGGCCACCTGTCGCCCTGACGAATCCAGTGCTGTGATGG
                      *****

LDLR_E5M1      AAATGCATCCATGGCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGA
LDLR_E5M2      AAATGCATCCATGGCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGA
NG_009060.1_E5 AAATGCATCCATGGCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGA
                      *****

LDLR_E5M1      TGAAGTTGGCTGCGTTAATGGTGAG---
LDLR_E5M2      TGAAGTTGGCTGCGTTAATGGTGAGCGC
NG_009060.1_E5 TGAAGTTGGCTGCGTTAATG-----
                      *****

```

Figura 12.30: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 5



```

LDLR_E6M1      CCACCGTGCCCGACGCGTTTTCTTAATGAATCCATTGCATGCGTTCTTATGTGAATAAA
LDLR_E6M2      CCACCGTGCCCGACGCGTTTTCTTAATGAATCCATTGCATGCGTTCTTATGTGAATAAA
NG_009060.1_E6 -----

LDLR_E6M1      CTATTATGAATGAGTGCCAAAGCAAAGTCTGAGGCTCAGACACACCTGACCTTCCTCCTTC
LDLR_E6M2      CTATTATGAATGAGTGCCAAAGCAAAGTCTGAGGCTCAGACACACCTGACCTTCCTCCTTC
NG_009060.1_E6 -----

LDLR_E6M1      CTCTCTGGCTCTCACAGTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAGTGTACAGC
LDLR_E6M2      CTCTCTGGCTCTCACAGTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAGTGTACAGC
NG_009060.1_E6 -----TGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAGTGTACAGC
*****

LDLR_E6M1      GGCGAATGCATCACCTGGACAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTCA
LDLR_E6M2      GGCGAATGCATCACCTGGACAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTCA
NG_009060.1_E6 -----
*****

LDLR_E6M1      GATGAACCCATCAAAGAGTGCAGTCTCGGTGCAGGCGGCTTGACAG
LDLR_E6M2      GATGAACCCATCAAAGAGTGCAGTCTCGGTGCAGGCGGCTTGACAG
NG_009060.1_E6 -----
*****

```

Figura 12.31: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 6

```

LDLR_E7M1      ----TGAGGCAGGAGAATCGCTTGACCCAGGAGGCGGAGGTCGCAAGTGCAGCCGAGATCG
LDLR_E7M2      AGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGACCCAGGAGGCGGAGGTCGCAAGTGCAGCCGAGATCG
NG_009060.1_E7 -----

LDLR_E7M1      TGCCATTACACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGTGAAGTCCGCTCTCTCTAAAAATACAAA
LDLR_E7M2      TGCCATTACACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGTGAAGTCCGCTCTCTCTAAAAATACAAA
NG_009060.1_E7 -----

LDLR_E7M1      AAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCATGCCGTGATGCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCA
LDLR_E7M2      AAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCATGCCGTGATGCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCA
NG_009060.1_E7 -----

LDLR_E7M1      GGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGTAATGAGCCAAGGTTGGCGGCAAGGG
LDLR_E7M2      GGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGTAATGAGCCAAGGTTGGCGGCAAGGG
NG_009060.1_E7 -----

LDLR_E7M1      ATGGGTAGGGGCCGAGAGTGACCAAGTCTGCATCCCCCTGGCCCTGCGCAGGGACCAACGA
LDLR_E7M2      ATGGGTAGGGGCCGAGAGTGACCAAGTCTGCATCCCCCTGGCCCTGCGCAGGGACCAACGA
NG_009060.1_E7 -----GGACCAACGA
*****

LDLR_E7M1      ATGCTTGGACAACAACGGCGGCTGTTCCACGCTGCAATGACCTTAAGATCGGCTACGA
LDLR_E7M2      ATGCTTGGACAACAACGGCGGCTGTTCCACGCTGCAATGACCTTAAGATCGGCTACGA
NG_009060.1_E7 -----
*****

LDLR_E7M1      GTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGCTGGTGGCCAGCGAAGATGCGAAGGTGATCCCG
LDLR_E7M2      GTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGCTGGTGGCCAGCGAAGATGCGAAGGTGATCCCG
NG_009060.1_E7 -----
*****

LDLR_E7M1      GGTGGGACTGAGCCCTGGGCCCCCTCTGCGCTTCTG---
LDLR_E7M2      GGTGGGACTGAGCCCTGGGCCCCCTCTGCGCTTCTGACAT
NG_009060.1_E7 -----

```

Figura 12.32: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 7



```

LDLR_E8M1      ---GGCTGCCTTCGAGGTGTGGGTTTTGGCCTGGGCCCCATCGCTCCGCTCTCTAGCCAT
LDLR_E8M2      CTCTGGCTGCCTTCGAGGTGTGGGTTTTGGCCTGGGCCCCATCGCTCCGCTCTCTAGCCAT
NG_009060.1_E8 -----

LDLR_E8M1      TGGGAAGAGCCTCCCACCAAGCCTTTTCTCTCTCTCCAGATATCGATGAGTGTTCAG
LDLR_E8M2      TGGGAAGAGCCTCCCACCAAGCCTTTTCTCTCTCTCCAGATATCGATGAGTGTTCAG
NG_009060.1_E8 -----ATATCGATGAGTGTTCAG
                        *****

LDLR_E8M1      GATCCCGACACCTGCAGCCAGCTCTGCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACAAGTGCCAGTGT
LDLR_E8M2      GATCCCGACACCTGCAGCCAGCTCTGCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACAAGTGCCAGTGT
NG_009060.1_E8 -----
                        *****

LDLR_E8M1      GAGGAAGGTTCCAGCTGGACCCACACGAAGGCCTGCAAGGCTGTGGGTGAGCACGGG
LDLR_E8M2      GAGGAAGGTTCCAGCTGGACCCACACGAAGGCCTGCAAGGCTGTGGGTGAGCACGGG
NG_009060.1_E8 -----
                        *****

LDLR_E8M1      AAGGCGCGGGTGGGGCGGCCTACCCCTTGCAAGCAGCAG-
LDLR_E8M2      AAGGCGCGGGTGGGGCGGCCTACCCCTTGCAAGCAGCAGT
NG_009060.1_E8 -----

```

Figura 12.33: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 8

```

LDLR_E9M1      -GACCCCGAGGCTCCATCGCCTACCTCTTCTTACCAACCGGCACGAGGTCAGGAAGATG
LDLR_E9M2      GGACCCCGAGGCTCCATCGCCTACCTCTTCTTACCAACCGGCACGAGGTCAGGAAGATG
NG_009060.1_E9 -----GCTCCATCGCCTACCTCTTCTTACCAACCGGCACGAGGTCAGGAAGATG
                        *****

LDLR_E9M1      ACGCTGGACCGGAGCGAGTACACCAGCCTCATCCCAACCTGAGGAACGTGGTGCCTCTG
LDLR_E9M2      ACGCTGGACCGGAGCGAGTACACCAGCCTCATCCCAACCTGAGGAACGTGGTGCCTCTG
NG_009060.1_E9 -----
                        *****

LDLR_E9M1      GACACGGAGGTGGCCAGCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCCAGAGAATGATCTGC
LDLR_E9M2      GACACGGAGGTGGCCAGCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCCAGAGAATGATCTGC
NG_009060.1_E9 -----
                        *****

LDLR_E9M1      AGGTGAGCGTCGCCCTGCCTGCAGCCTTGGCCGCGAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGC
LDLR_E9M2      AGGTGAGCGTCGCCCTGCCTGCAGCCTTGGCCGCGAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGC
NG_009060.1_E9 -----AG-
                        **

LDLR_E9M1      TGATGCCCTTCTCTCCTCTGCCTCAG-----
LDLR_E9M2      TGATGCCCTTCTCTCCTCTGCCTCAGCACCAG
NG_009060.1_E9 -----

```

Figura 12.34: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 9

```

NG_009060.1_E10 -----
LDLR_E10M1 -GCAGCCTTGGCCCGCAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGCTGATGCCCTTCTCTCTCT
LDLR_E10M2 TGCAGCCTTGGCCCGCAGGTGAGATGAGGGCTCCTGGTGCTGATGCCCTTCTCTCTCTCT

NG_009060.1_E10 -----CAGCCAGCTTGACAGAGCCACGGCGTCTTCTTATGACACCGTCATCAGCA
LDLR_E10M1 GCCTCAGCACCCAGCTTGACAGAGCCACGGCGTCTTCTTATGACACCGTCATCAGCA
LDLR_E10M2 GCCTCAGCACCCAGCTTGACAGAGCCACGGCGTCTTCTTATGACACCGTCATCAGCA
*****

NG_009060.1_E10 GAGACATCCAGGCCCCGACGGGCTGGCTGTGGACTGGATCCACAGCAACATCTACTGGA
LDLR_E10M1 GGGACATCCAGGCCCCGACGGGCTGGCTGTGGACTGGATCCACAGCAACATCTACTGGA
LDLR_E10M2 GGGACATCCAGGCCCCGACGGGCTGGCTGTGGACTGGATCCACAGCAACATCTACTGGA
* *****

NG_009060.1_E10 CCGACTCTGTCTGGGCACTGTCTCTGTTGCGGATACCAAGGGCGTGAAGAGGAAAACGT
LDLR_E10M1 CCGACTCTGTCTGGGCACTGTCTCTGTTGCGGATACCAAGGGCGTGAAGAGGAAAACGT
LDLR_E10M2 CCGACTCTGTCTGGGCACTGTCTCTGTTGCGGATACCAAGGGCGTGAAGAGGAAAACGT
*****

NG_009060.1_E10 TATTAGGGAGAACGGCTCCAAGCCAAGGGCCATCGTGGTGGATCCTGTTTCATGG-----
LDLR_E10M1 TATTAGGGAGAACGGCTCCAAGCCAAGGGCCATCGTGGTGGATCCTGTTTCATGGTGGC
LDLR_E10M2 TATTAGGGAGAACGGCTCCAAGCCAAGGGCCATCGTGGTGGATCCTGTTTCATGGTG--
*****

NG_009060.1_E10 -----
LDLR_E10M1 TATCCACGACGCTGAGGGCTGCAGAGGGAATGGAGG
LDLR_E10M2 -----

```

Figura 12.35: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 10

```

LDLR_E11M1 CCTGGCTGTTTCTCCAGAATTCGTTGCACGCATTGGCTGGGATCCTCCCCGCCCTCCA
LDLR_E11M2 CCTGGCTGTTTCTCCAGAATTCGTTGCACGCATTGGCTGGGATCCTCCCCGCCCTCCA
NG_009060.1_E11 -----

LDLR_E11M1 GCCTCACAGCTATTCTGTCTCTCCACCAGCTTCACTACTGGACTGACTGGGGAATC
LDLR_E11M2 GCCTCACAGCTATTCTGTCTCTCCACCAGCTTCACTACTGGACTGACTGGGGAATC
NG_009060.1_E11 -----CTTCATGACTGGACTGACTGGGGAATC
*****

LDLR_E11M1 CCGCCAAGATCAAGAAAGGGGCCCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGTGGTACTGAAA
LDLR_E11M2 CCGCCAAGATCAAGAAAGGGGCCCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGTGGTACTGAAA
NG_009060.1_E11 CCGCCAAGATCAAGAAAGGGGCCCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGTGGTACTGAAA
*****

LDLR_E11M1 ACATTCAGTGGCCCAATGGCATCACCTAGGTATGTTTCGAGGACAGCCGTCCAGCCAG
LDLR_E11M2 ACATTCAGTGGCCCAATGGCATCACCTAGGTATGTTTCGAGGACAGCCGTCCAGCCAG
NG_009060.1_E11 ACATTCAGTGGCCCAATGGCATCACCTAG-----
*****

LDLR_E11M1 GGCCGGGCACAGGCTGGAGGACAGAGGG-
LDLR_E11M2 GGCCGGGCACAGGCTGGAGGACAGAGGG-
NG_009060.1_E11 -----

```

Figura 12.36: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 11

```

LDLR_E12M1      GGCCAGGCCCTCAGGACCCCTCTGGGACTGGCATCAGCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT
LDLR_E12M2      GGCCAGGCCCTCAGGACCCCTCTGGGACTGGCATCAGCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT
NG_009060.1_E12 -----

LDLR_E12M1      GTGTGTCTAGATCTCCTCAGTGGCCGCCTCTACTGGGTTGACTCCAAACTTCACTCCATC
LDLR_E12M2      GTGTGTCTAGATCTCCTCAGTGGCCGCCTCTACTGGGTTGACTCCAAACTTCACTCCATC
NG_009060.1_E12 -----ATCTCCTCAGTGGCCGCCTCTACTGGGTTGACTCCAAACTTCACTCCATC
*****

LDLR_E12M1      TCAAGCATCGATGTCAATGGGGGCAACCGGAAGACCATCTTGGAGGATGAAAAGAGGCTG
LDLR_E12M2      TCAAGCATCGATGTCAATGGGGGCAACCGGAAGACCATCTTGGAGGATGAAAAGAGGCTG
NG_009060.1_E12 TCAAGCATCGATGTCAACGGGGCAACCGGAAGACCATCTTGGAGGATGAAAAGAGGCTG
*****

LDLR_E12M1      GCCCACCCTTCTCCTTGGCCGCTTTGAGGTGTGGCTTACGTACGAGATGCAAGCACTT
LDLR_E12M2      GCCCACCCTTCTCCTTGGCCGCTTTGAGGTGTGGCTTACGTACGAGATGCAAGCACTT
NG_009060.1_E12 -----GCCCACCCTTCTCCTTGGCCGCTTTGAG-----
*****

LDLR_E12M1      AGGTGGCGGA
LDLR_E12M2      AGGTGGCGGA
NG_009060.1_E12 -----

```

Figura 12.37: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 12

```

LDLR_E13-14M1   GACAAACAAAAAACTAGTTGTGGAGAGAGGGTGGCCTGTGTCTCATCCAGTGTAAAC
LDLR_E13-14M2   GACAAACAAAAAACTAGTTGTGGAGAGAGGGTGGCCTGTGTCTCATCCAGTGTAAAC
NG_009060.1_E13-14 -----

LDLR_E13-14M1   GGGATTTGTATCTTCTCTGTGCTGTTTAGGACAAAGTATTTGGACAGATATCATCA
LDLR_E13-14M2   GGGATTTGTATCTTCTCTGTGCTGTTTAGGACAAAGTATTTGGACAGATATCATCA
NG_009060.1_E13-14 -----GACAAAGTATTTGGACAGATATCATCA
*****

LDLR_E13-14M1   ACGAAGCCATTTTCAGTGCCAACCGCCTCACAGGTTCCGATGTCAACTTGTGGCTGAAA
LDLR_E13-14M2   ACGAAGCCATTTTCAGTGCCAACCGCCTCACAGGTTCCGATGTCAACTTGTGGCTGAAA
NG_009060.1_E13-14 ACGAAGCCATTTTCAGTGCCAACCGCCTCACAGGTTCCGATGTCAACTTGTGGCTGAAA
*****

LDLR_E13-14M1   ACCTACTGTCCCAGAGGATATGGTCTCTCCACAACCTCACCCAGCAAGAGGTAAGG
LDLR_E13-14M2   ACCTACTGTCCCAGAGGATATGGTCTCTCCACAACCTCACCCAGCAAGAGGTAAGG
NG_009060.1_E13-14 ACCTACTGTCCCAGAGGATATGGTCTCTCCACAACCTCACCCAGCAAGAGGTAAGG
*****

LDLR_E13-14M1   GTGGGTGAGCCCAACCCCAACCTTGAACCTCCTTGTGGAACTCTGGAATGTTCTG
LDLR_E13-14M2   GTGGGTGAGCCCAACCCCAACCTTGAACCTCCTTGTGGAACTCTGGAATGTTCTG
NG_009060.1_E13-14 GTGGGTGAGCCCAACCCCAACCTTGAACCTCCTTGTGGAACTCTGGAATGTTCTG
*****

LDLR_E13-14M1   GAAATTTCTGGAATCTTCTGGTATAGCTGATGATCTCGTTCTGCCCTGACTCCGCTTCT
LDLR_E13-14M2   GAAATTTCTGGAATCTTCTGGTATAGCTGATGATCTCGTTCTGCCCTGACTCCGCTTCT
NG_009060.1_E13-14 GAAATTTCTGGAATCTTCTGGTATAGCTGATGATCTCGTTCTGCCCTGACTCCGCTTCT
*****

LDLR_E13-14M1   TCTGCCCCAGGAGTGAAGTGGTGTGAGAGGACCACCTGAGCAATGGCGCTGCCAGTAT
LDLR_E13-14M2   TCTGCCCCAGGAGTGAAGTGGTGTGAGAGGACCACCTGAGCAATGGCGCTGCCAGTAT
NG_009060.1_E13-14 TCTGCCCCAGGAGTGAAGTGGTGTGAGAGGACCACCTGAGCAATGGCGCTGCCAGTAT
*****

LDLR_E13-14M1   CTGTGCCCTCCCTGCCCGCAGATCAACCCCACTCGCCCAAGTTTACCTGCGCTGCCCG
LDLR_E13-14M2   CTGTGCCCTCCCTGCCCGCAGATCAACCCCACTCGCCCAAGTTTACCTGCGCTGCCCG
NG_009060.1_E13-14 CTGTGCCCTCCCTGCCCGCAGATCAACCCCACTCGCCCAAGTTTACCTGCGCTGCCCG
*****

LDLR_E13-14M1   GACGGCATGCTGCTGGCCAGGACATGAGGAGTGCCTCACAGGTGGCACACGCTTG
LDLR_E13-14M2   GACGGCATGCTGCTGGCCAGGACATGAGGAGTGCCTCACAGGTGGCACACGCTTG
NG_009060.1_E13-14 GACGGCATGCTGCTGGCCAGGACATGAGGAGTGCCTCACAG-----
*****

LDLR_E13-14M1   TTTCTGCTCCTGTGCTCCTCAACTGCCCC
LDLR_E13-14M2   TTTCTGCTCCTGTGCTCCTCAACTGCCCC
NG_009060.1_E13-14 -----

```

Figura 12.38: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exones 13-14

```

LDLR_E15M1      TCAGAGATCCTCCTGCCTTGGCCTCCCAAGGTCATTTGAGACTTTCGTTCATTAGGGGCAC
LDLR_E15M2      -CAGAGATCCTCCTGCCTTGGCCTCCCAAGGTCATTTGAGACTTTCGTTCATTAGGGGCAC
NG_009060.1_E15 -----

LDLR_E15M1      ACCTATGAGAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACTCAGAAGACGTTTATTTATTCCTTTCAGA
LDLR_E15M2      ACCTATGAGAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACTCAGAAGACGTTTATTTATTCCTTTCAGA
NG_009060.1_E15 -----
                                                                -A
                                                                *

LDLR_E15M1      GGCTGAGGCTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCAC
LDLR_E15M2      GGCTGAGGCTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCAC
NG_009060.1_E15 GGCTGAGGCTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCAC
*****

LDLR_E15M1      AGCCGTAAGGACACAGCACACAACCACCCGGCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGG
LDLR_E15M2      AGCCGTAAGGACACAGCACACAACCACCCGGCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGG
NG_009060.1_E15 AGCCGTAAGGACACAGCACACAACCACCCGGCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGG
*****

LDLR_E15M1      GGCCACCCCTGGGCTCACACGGTGGAGATAGTGACAATGTCTCACCAAGGTAAGACTG
LDLR_E15M2      GGCCACCCCTGGGCTCACACGGTGGAGATAGTGACAATGTCTCACCAAGGTAAGACTG
NG_009060.1_E15 GGCCACCCCTGGGCTCACACGGTGGAGATAGTGACAATGTCTCACCAAG-----
*****

LDLR_E15M1      GGCCCTCCCTAGGCCCTCTTACCACAGAGAC
LDLR_E15M2      GGCCCTCCCTAGGCCCTCTTACCACAGAGA-
NG_009060.1_E15 -----

```

Figura 12.39: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 15

```

LDLR_E16M1      TCAGTGTCCAGGGAGATGTGCCAGGGCTTTCTGCCGTGACCACCGTCTCTGCCTGCT
LDLR_E16M2      ---GTGTCCAGGGAGATGTGCCAGGGCTTTCTGCCGTGACCACCGTCTCTGCCTGCT
NG_009060.1_E16 -----

LDLR_E16M1      CCATTTCTTGGTGGCCTTCCCTTAGACCTGGGCTCACTCTTGTCTCTCTCTGCAGCTC
LDLR_E16M2      CCATTTCTTGGTGGCCTTCCCTTAGACCTGGGCTCACTCTTGTCTCTCTCTGCAGCTC
NG_009060.1_E16 -----
                                                                CTC
                                                                ***

LDLR_E16M1      TGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAATGAGAAGAAGCCAGTAGCGTGAGGGCTCTGTCCA
LDLR_E16M2      TGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAATGAGAAGAAGCCAGTAGCGTGAGGGCTCTGTCCA
NG_009060.1_E16 TGGGCGACGTTGCTGGCAGAGGAAATGAGAAGAAGCCAGTAGCGTGAGGGCTCTGTCCA
*****

LDLR_E16M1      TTGTCCTCCCATCGGTAAGCGCGGGCCGGTCCCCAGCGTCCCCAGGTCACAGCCTCC
LDLR_E16M2      TTGTCCTCCCATCGGTAAGCGCGGGCCGGTCCCCAGCGTCCCCAGGTCACAGCCTCC
NG_009060.1_E16 TTGTCCTCCCATCG-----
*****

```

Figura 12.40: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 16

```

LDLR_E17M1      ACTCTTGACCTCATGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAATGCTGGGATTACAGGCGTGA
LDLR_E17M2      ----TTGACCTCATGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAATGCTGGGATTACAGGCGTGA
NG_009060.1_E17 -----

LDLR_E17M1      GCCACCAGGCCAGGCCACAAGGCGATCTCTAAACAAACATAAAAGACCAGGAGTCAAGG
LDLR_E17M2      GCCACCAGGCCAGGCCACAAGGCGATCTCTAAACAAACATAAAAGACCAGGAGTCAAGG
NG_009060.1_E17 -----

LDLR_E17M1      TTATGGTACGATGCCCGTGTTCCTCACTCCAGCCACGGAGCTGGGTCTCTGGTCTCGGGG
LDLR_E17M2      TTATGGTACGATGCCCGTGTTCCTCACTCCAGCCACGGAGCTGGGTCTCTGGTCTCGGGG
NG_009060.1_E17 -----

LDLR_E17M1      CAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCTCTCCCTACAGTGTCTCTGCTTCTTCCCTTGCCTGGGG
LDLR_E17M2      CAGCTGTGTGACAGAGCGTGCCTCTCCCTACAGTGTCTCTGCTTCTTCCCTTGCCTGGGG
NG_009060.1_E17 -----
                        --TGCTCTGCTTCTTCCCTTGCCTGGGG
                        *****

LDLR_E17M1      TCTTCTTCTATGGAAGAAGTGGCGGCTTAAGAACATCAACAGCATCAACTTTGACAACC
LDLR_E17M2      TCTTCTTCTATGGAAGAAGTGGCGGCTTAAGAACATCAACAGCATCAACTTTGACAACC
NG_009060.1_E17 -----
                        *****

LDLR_E17M1      CCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGATGAGGTCCACATTTGCCACAACAGGACGGCTACA
LDLR_E17M2      CCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGATGAGGTCCACATTTGCCACAACAGGACGGCTACA
NG_009060.1_E17 -----
                        *****

LDLR_E17M1      GCTACCCCTCGGTGAGTGACCCTCTAGAAAGCCAGAGCCC
LDLR_E17M2      GCTACCCCTCGGTGAGTGACCCTCTAGAAAGCCAGAGCCC
NG_009060.1_E17 -----
                        GCTACCCCTCG-----
                        *****

```

Figura 12.41: Alineamiento entre secuencia obtenida y de referencia exón 17

## 12.5. Variantes detectadas

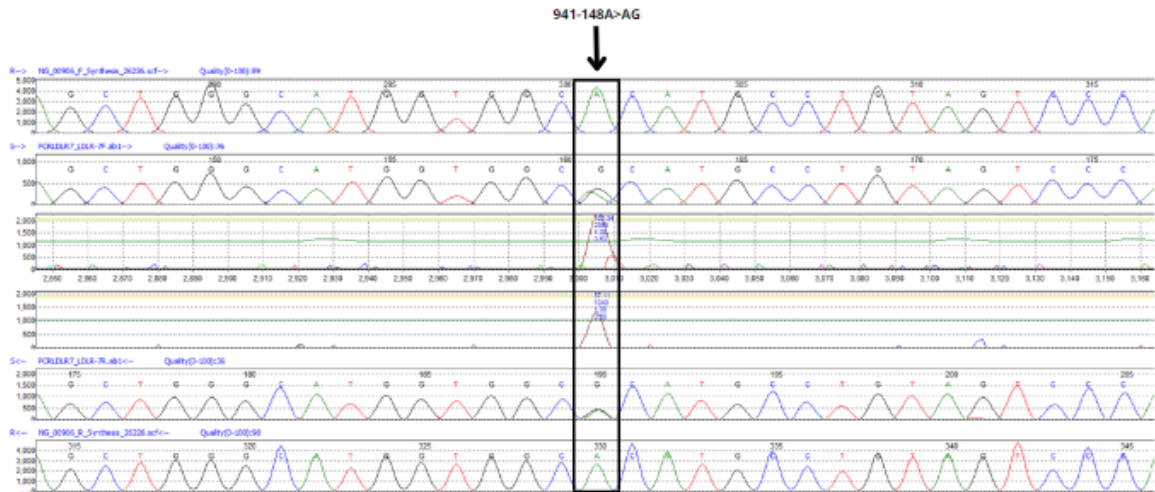


Figura 12.42: Variante Heterocigota c.941-148A>AG en intrón 6-7 del gen LDLR



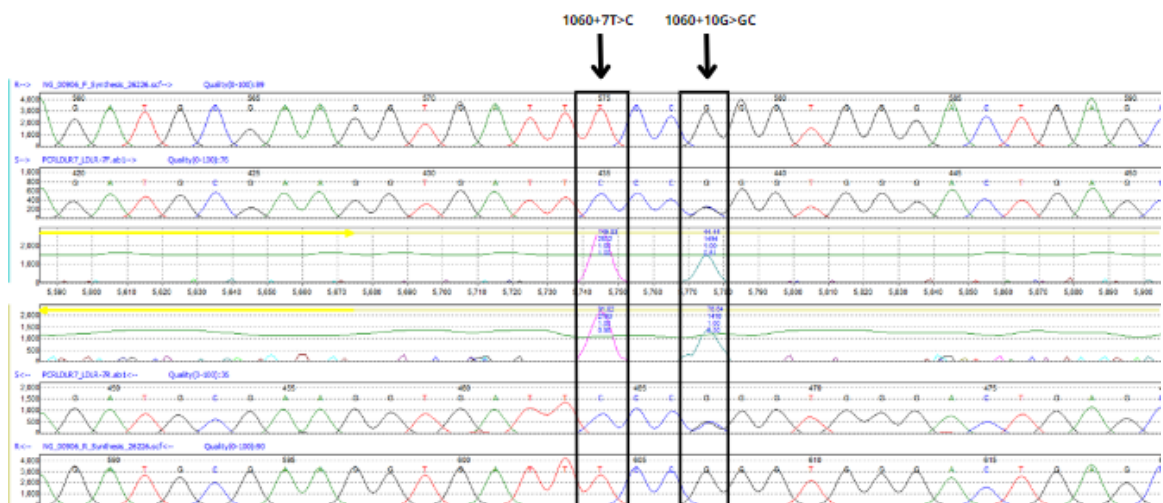


Figura 12.43: Variante homocigota c.1060+7T>C y variante heterocigota c.1060+10G>GC en intrón 7-8 del gen LDLR.

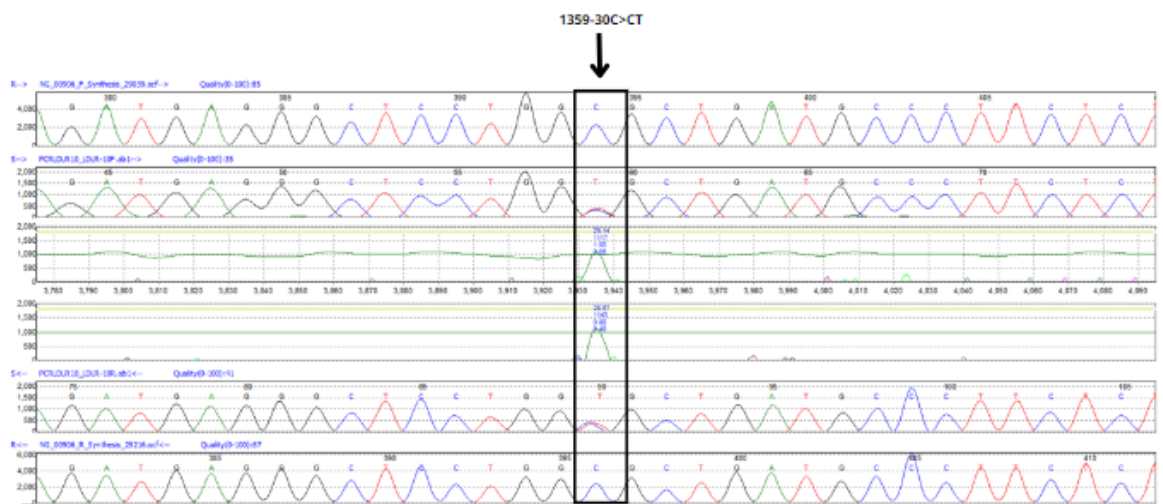


Figura 12.44: Variante heterocigota c.1359-30C>CT y intrón 9-10 del gen LDLR.

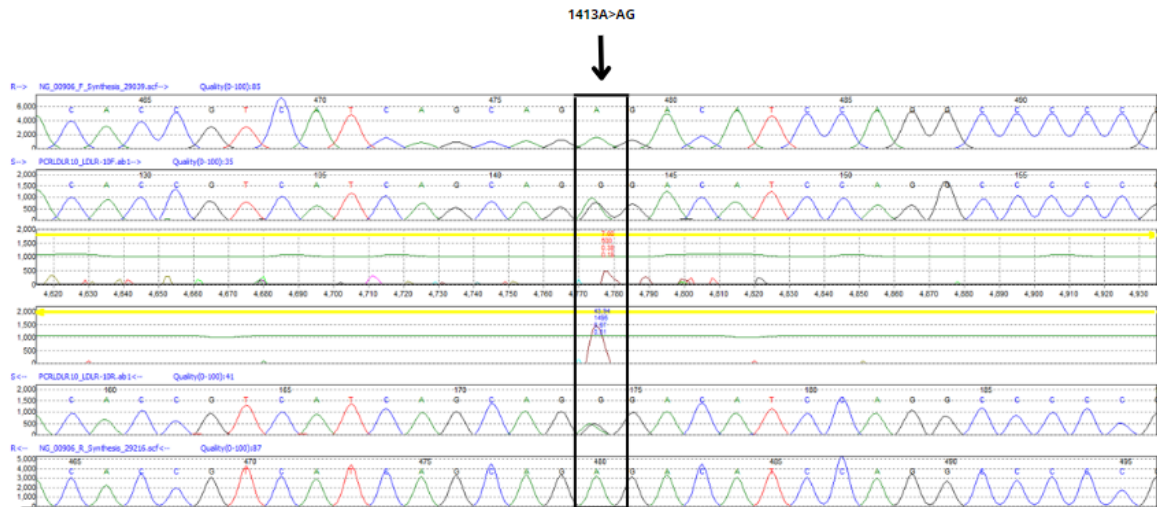


Figura 12.45: Variante heterocigota c.1413A>AG en exón 10 del gen LDLR.

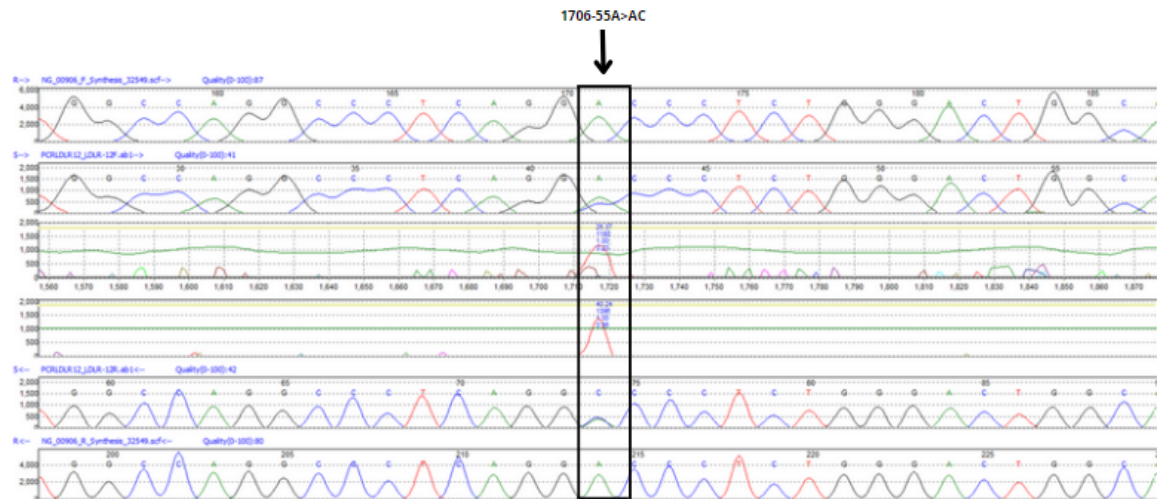


Figura 12.46: Variante heterocigota c.1706-55A>AC en intrón 11-12 del gen LDLR.

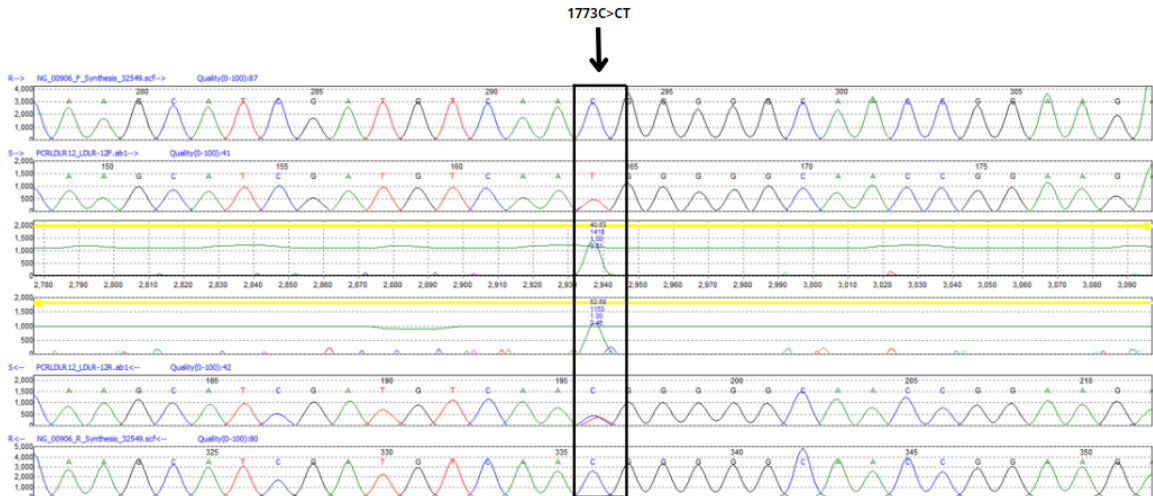


Figura 12.47: Variante heterocigota c.1773C>CT en exón 12 del gen LDLR.

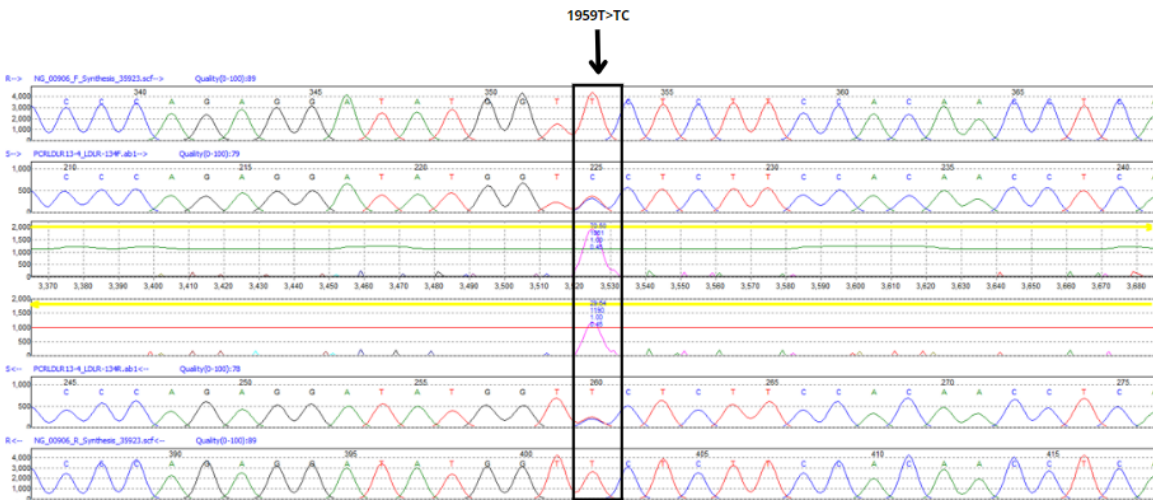


Figura 12.48: Variante heterocigota c.1959T>TC en exón 13-14 del gen LDLR.



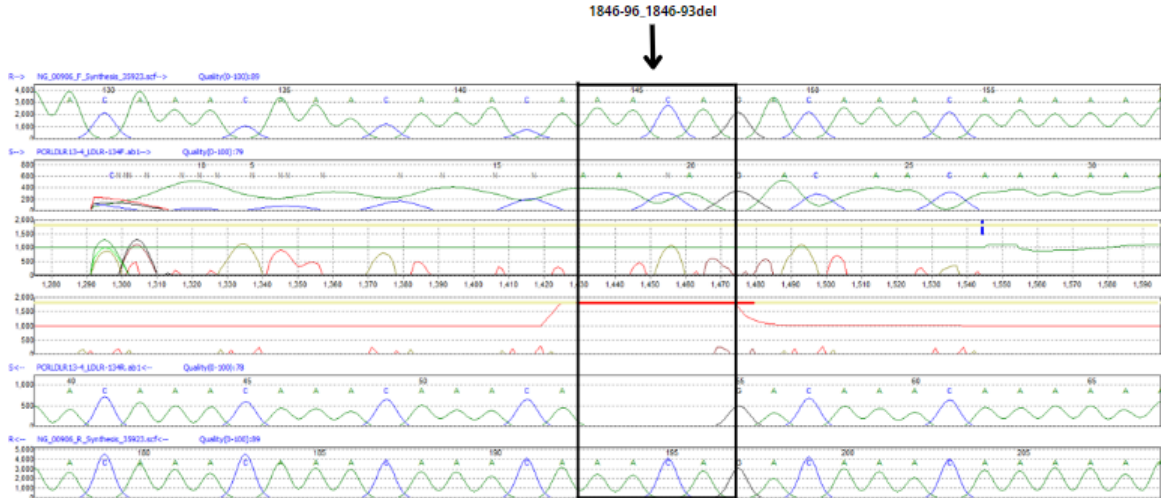


Figura 12.49: Delección c.1846-96\_1846-93del en intrón 12-13 del gen LDLR.

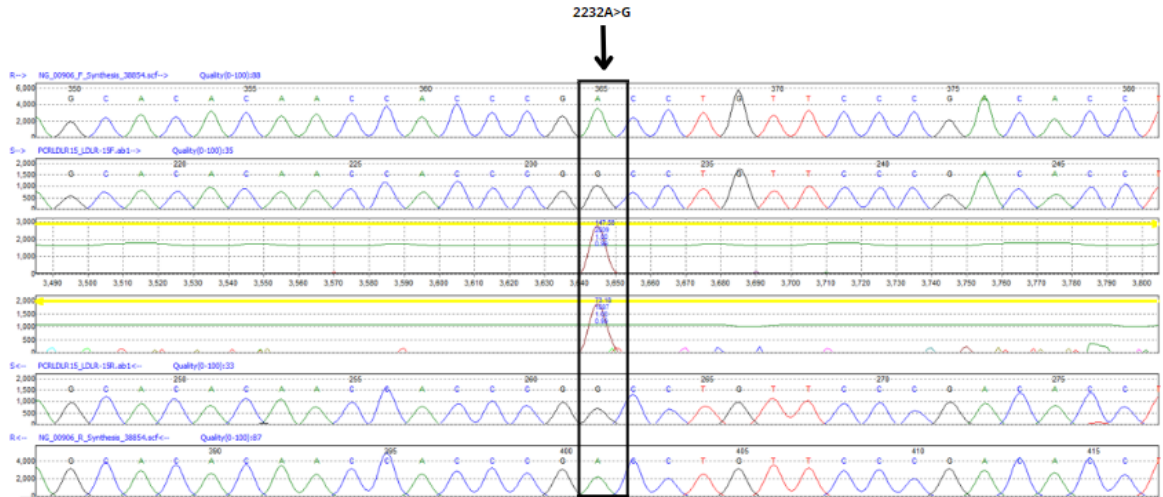


Figura 12.50: Variante homocigota c.2232A>G en exón 15 del gen LDLR.

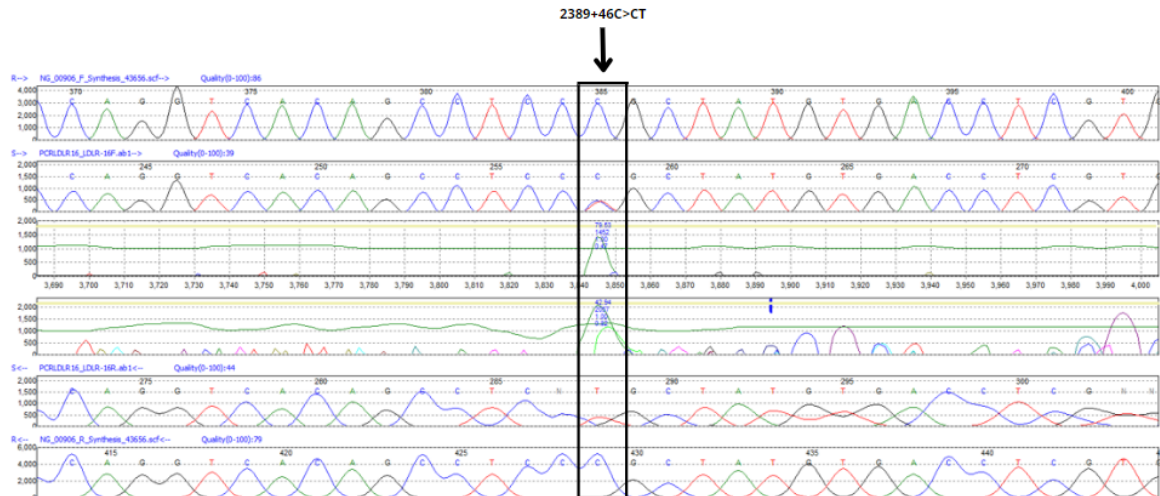


Figura 12.51: Variante heterocigota c.2389+46C>CT en intrón 16-17 del gen LDLR.

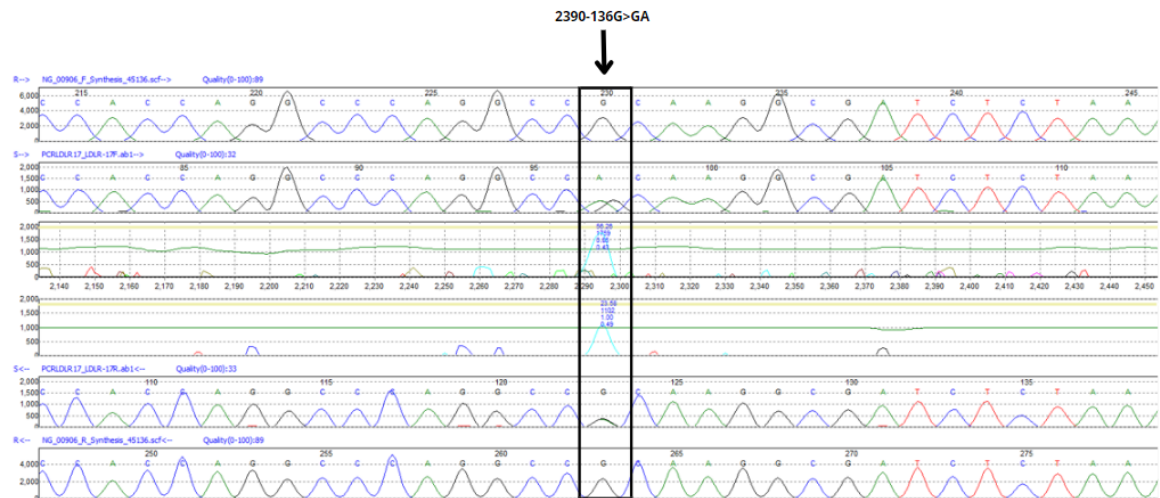


Figura 12.52: Variante heterocigota c.2390-136G>GA en intrón 16-17 del gen LDLR.

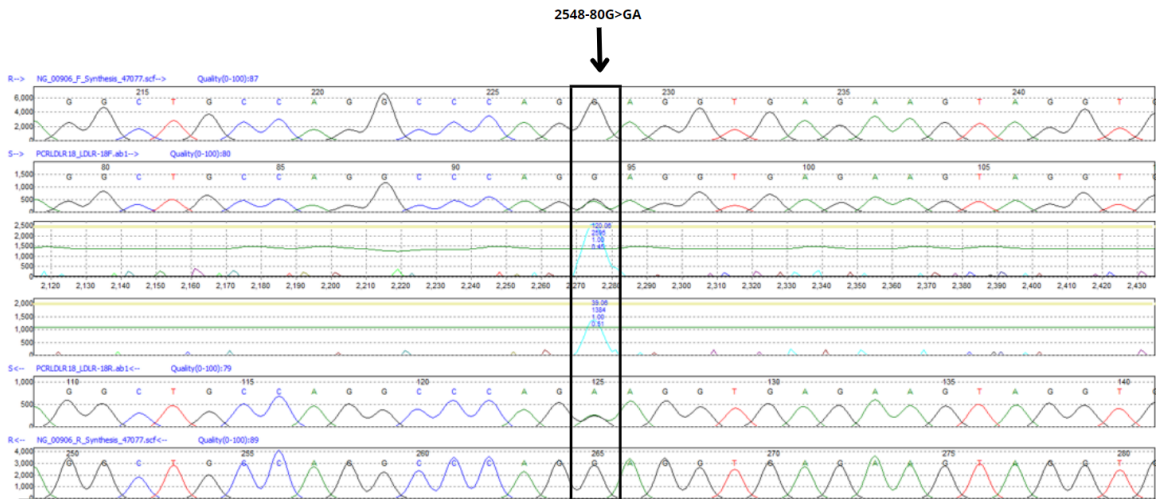


Figura 12.53: Variante heterocigota c.2548-80G>GA en intrón 17-18 del gen LDLR.

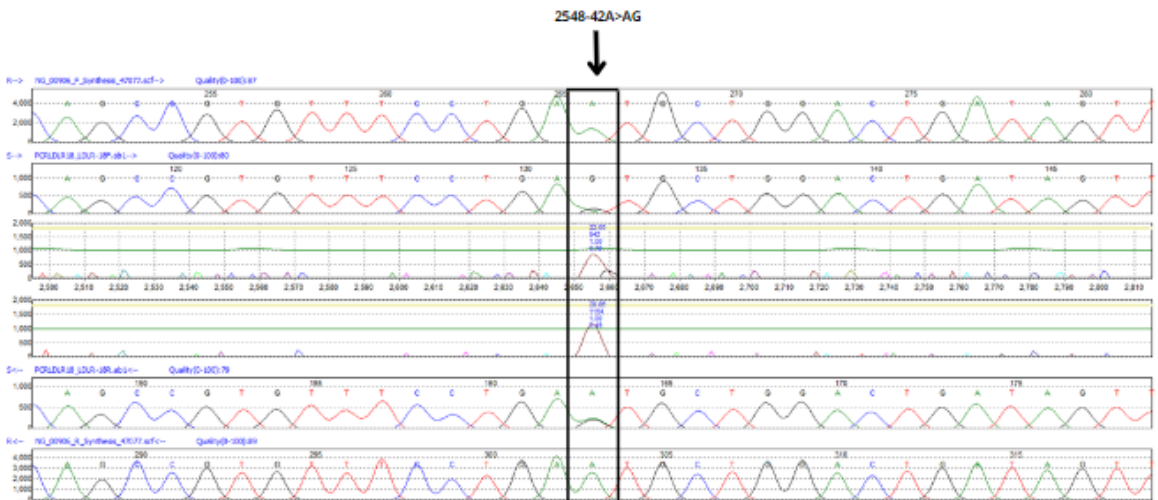


Figura 12.54: Variante heterocigota c.2548-42A>AG en intrón 17-18 del gen LDLR.

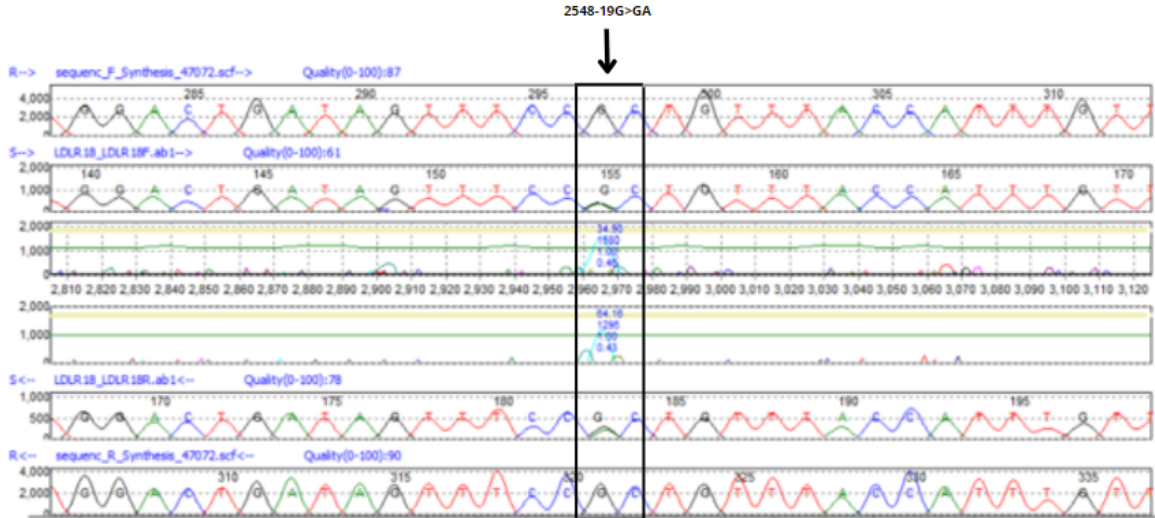


Figura 12.55: Variante heterocigota c.2548-19G>GA en intrón 17-18 del gen LDLR.

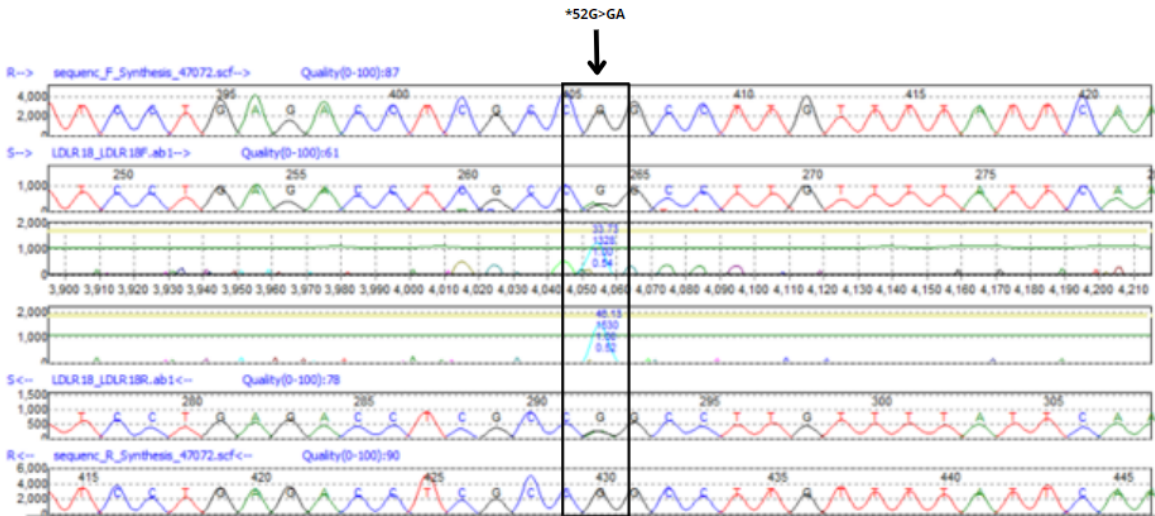


Figura 12.56: Variante heterocigota c.\*52G>GA en exón 18 del gen LDLR.

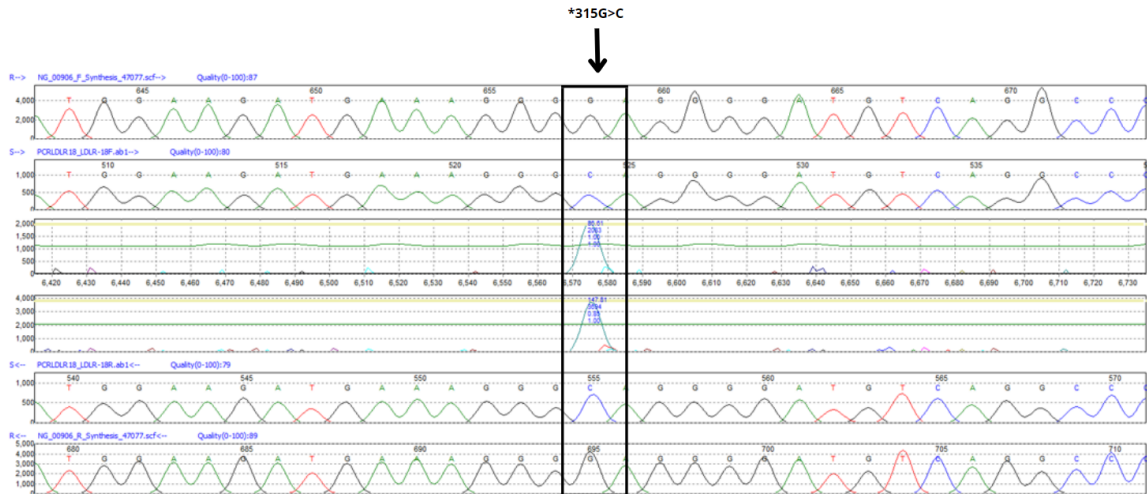


Figura 12.57: Variante homocigota c.\*315G>C en exón 18 del gen LDLR.

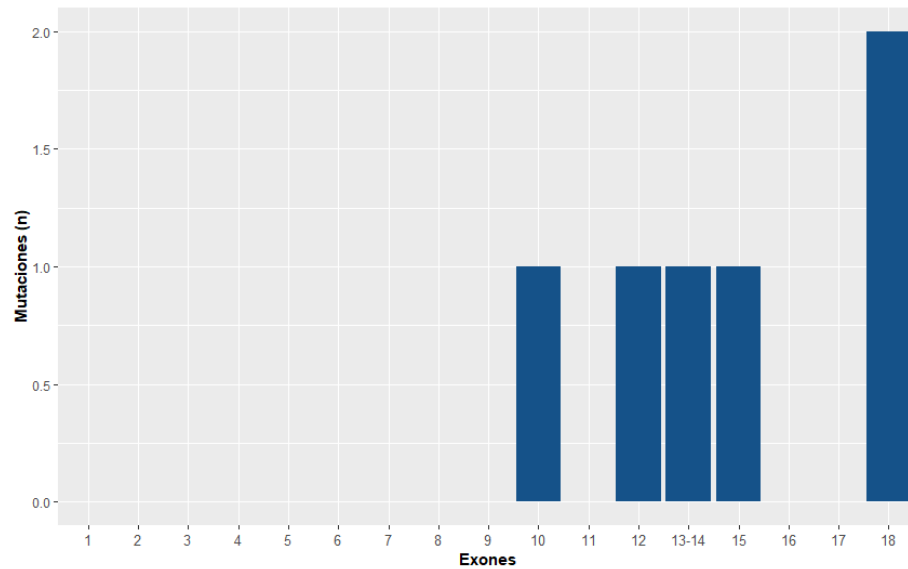


Figura 12.58: Cantidad de mutaciones exónicas detectadas.

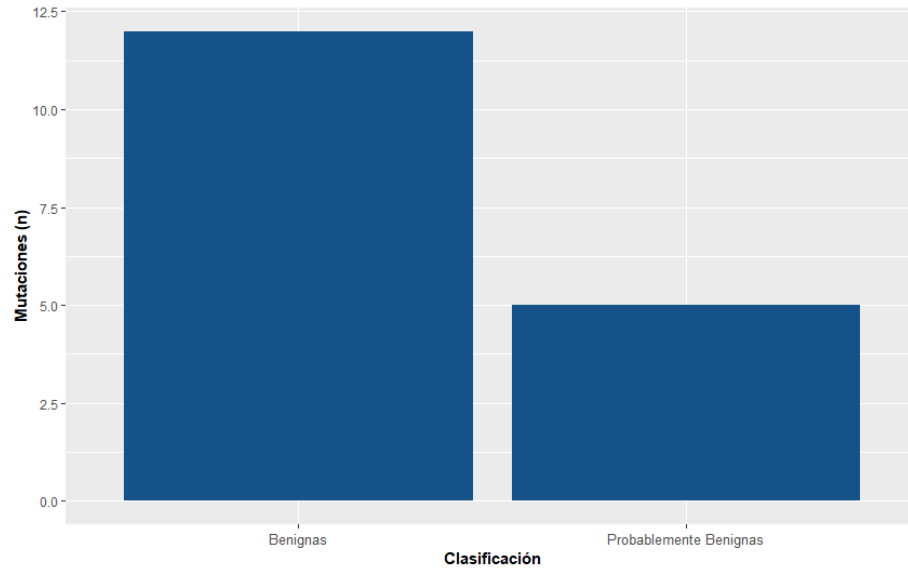


Figura 12.59: Mutaciones benignas y probablemente benignas identificadas

