

1 9 8 5 - 1

Reg. No. 80361807

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

FACULTAD DE CIENCIAS



**“EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS GENES  
GLOBINICOS GAMMA EN PACIENTES  
CON NEOPLASIAS”**

**JUAN CARLOS BECERRA FIGUEROA**

GUADALAJARA JAL. 1986.

**T E S I S**

**"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS GENES GLOBINICOS  
GAMMA EN PACIENTES CON NEOPLASIAS".**

**PRESENTADA POR:**

**JUAN CARLOS BECERRA FIGUEROA**

**DIRIGIDA POR:**

**M. EN C. JUAN MORA GALINDO**

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, División de Genética I.M.S.S., bajo la Dirección del M. en C. Juan Mora Galindo, la Asesoría de la Q.F.B. Bertha Ibarra Cortés y el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## A G R A D E C I M I E N T O S

A la Q.F.B. BERTHA IBARRA CORTES,  
Investigadora de la Unidad de Investigación Biomédica,  
por su guía, apoyo y enseñanzas.

A EUGENIA DE LA MORA,  
Laboratorista de la División de Genética de la Unidad  
de Investigación Biomédica, por su asistencia técnica.

A la Q.F.B. ENRIQUETA FRANCO GAMBOA,  
Química de la Unidad de Investigación, por su partici-  
pación en este trabajo.

A la Sra. ARCELIA BECERRA VDA. DE FIGUEROA,  
por su generosa hospitalidad.

Al Arq. BENJAMIN FIGUEROA BECERRA,  
por su labor artística.

A la Bióloga MARIA GUADALUPE RAMIREZ DUEÑAS,  
por su cariño e interés perennes.

**A la memoria  
de mi Padre**

**Con cariño a mi  
Madre y Hermanos**

# I N D I C E

CAPITULO	Pag.
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	5
A. <u>La Hemoglobina</u>	
A.1 Aspectos generales sobre la Hemoglobina	6
A.2 La Hemoglobina en el reino animal	8
A.3 La Hemoglobina en humanos	9
B. <u>Mecanismos de Activación-Inactivación Génica</u>	
B.1 Consideraciones generales	15
B.2 Mecanismos de Activación-Inactivación de los genes globínicos.	17
B.3 Síntesis de Hemoglobinas durante la diferenciación celular.	24
C. <u>Producción de Hemoglobina Fetal en Adultos.</u>	
C.1 Drogas asociadas con la síntesis de Hemoglobina Fetal.	27
C.2 Hemoglobina Fetal en estados Neoplásicos y no Neoplásicos.	28
C.3 Oncogenes y Cáncer.	30
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
IV HIPOTESIS	37
V OBJETIVOS	39
VI MATERIAL	41
VII METODOS	45
VIII RESULTADOS Y DISCUSION	52
IX CONCLUSIONES	67
X BIBLIOGRAFIA	70

INSTRUMENTOS

**CAPITULO I**

**INTRODUCCION**

El presente trabajo tiene como finalidad proporcionar una visión general de los instrumentos utilizados en el estudio de la economía. Se abordan los aspectos más relevantes de los instrumentos de medida y de análisis, así como su aplicación en la práctica. El objetivo es ofrecer una guía clara y concisa para el lector interesado en este campo.

En primer lugar, se describen los instrumentos de medida más comunes, como el producto interno bruto (PIB) y el índice de precios al consumidor (IPC). Se explican sus alcances, limitaciones y cómo se calculan. Posteriormente, se detallan los instrumentos de análisis, como los modelos de oferta y demanda, y se muestra cómo se utilizan para estudiar el comportamiento de la economía.

Además, se discuten los instrumentos de política económica, como los impuestos y los subsidios, y se evalúa su impacto en la actividad económica. Finalmente, se concluye con una reflexión sobre el papel de los instrumentos en la toma de decisiones económicas y políticas.

## INTRODUCCION.

La Hemoglobina, una de las primeras moléculas protéicas de las que se conoció su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional, ha sido utilizada para ilustrar la interrelación entre estructura y función.

El estudio de las estructuras y secuencias de la Hemoglobina y la Mioglobina en diferentes especies ha contribuído a dilucidar la mayoría de los conceptos básicos en Biología y Evolución Molecular, por ejemplo, ha sido posible elaborar un árbol evolutivo para tratar de explicar los orígenes de las diferentes globinas; por otra parte, uno de los conceptos más importantes está relacionado con los eventos moleculares que ocurren durante la síntesis de proteínas, ésto ha sido posible gracias al conocimiento de la anatomía de los genes involucrados en los diferentes tipos de Hemoglobinas.

En el Humano se ha demostrado la existencia de seis diferentes tipos de Hemoglobinas características de los períodos de desarrollo embrionario, fetal y adulto, ya que existen genes globínicos específicos activos en las tres etapas, de manera que los genes activos de la etapa fetal se encuentran inactivos o reducidos a su mínima expresión en la etapa adulta; el fenómeno de activación-inactivación de los genes globínicos durante el desarrollo, proporciona un marco ade-



cuado para el estudio de los mecanismos involucrados en el control de la expresión génica. A este respecto, la activación de los genes beta de la Hemoglobina Adulta ó A y la inactivación de los gamma de la Hemoglobina Fetal ó F, es el fenómeno más estudiado, aunque aún no se conocen en detalle los acontecimientos que lo producen. De la secuenciación de los genes se ha hecho evidente la importancia de las regiones próximas a los genes globínicos y las modificaciones químicas de las bases, y se ha sugerido además que algunas proteínas pueden participar en el control de estos genes.

La Hemoglobina Humana presenta una amplia variedad de patologías de severidad variable, algunas de las cuales inician sus manifestaciones en el tiempo en que ocurre el reemplazo de Hemoglobina Fetal por Hemoglobina A. Algunas de estas afecciones son: Anemia Drepanocítica (estado homocigoto para Hemoglobina S) y Talasemia Beta, padecimientos cuyo tratamiento generalmente es paliativo. Existen reportes en la literatura de que la Hemoglobina Fetal puede disminuir la severidad del padecimiento, por lo que se ha intentado el uso de drogas capaces de estimular la actividad de los genes gamma y por tanto la síntesis de Hemoglobina Fetal, sin embargo, los fármacos empleados hasta hoy, pertenecen al grupo de las sustancias citotóxicas, por lo que es importante la búsqueda de soluciones alternas.

Por otra parte, se ha observado un incremento en la actividad de los genes gamma en pacientes con ciertos tipos de

Neoplasias, este hecho ofrece la oportunidad de indagar acerca de la presencia de factores neoplásicos involucrados en los mecanismos de la expresión génica.

**CAPITULO II**  
**ANTECEDENTES.**

## A. LA HEMOGLOBINA

### A.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA HEMOGLOBINA.

El término Hemoglobina (Hb) fué usado por primera vez - por Hope-Seyler en 1864 para describir el pigmento rojo de - los eritrocitos, y ellos observaron además la absorción óptica característica de la Hb oxigenada. En ese año Stokes notó el cambio en el espectro de la Hb desoxigenada. En 1852- el cromóforo (grupo Hem) de la Hb había sido aislado en forma de cloruro de hemina por Teichman, su estructura dilucidada por Kuster en 1912 y sintetizado por Fischer en 1929. - - Haurowitz en 1928 demostró que el Hem como grupo prostético - no solo se encuentra en las Hbs de una amplia variedad de especies, sino también en otras proteínas respiratorias como - las mioglobinas y las enzimas citocrómicas (1).

La presencia de subunidades se sospechó debido a la existencia de cuatro grupos Hem por molécula. Un hallazgo significativo ocurrió cuando Ingram en 1956 separó los péptidos - producidos después del tratamiento de la globina con tripsina, la cual corta los polipéptidos en los residuos lisina y arginina. Aunque por cada mol de Hb se obtienen 60 residuos de lisina y arginina, únicamente resultaron 30 péptidos, sugiriendo fuertemente que la Hb consistía en dos medias moléculas idénticas.

La revisión de las secuencias del  $\text{NH}_2$  terminal de la Hb humana por Rhinesmith en el 57 y Braunitzer en el 58 revelaron 2 moles de valina-leucina y 2 moles de valina-histidina-leucina por mol de Hb. La evidencia en conjunto indicaba que la Hb era un tetrámero compuesto de dos pares de cadenas polipeptídicas diferentes, las cuales se denominaron alfa y beta y parecía razonable suponer que a cada cadena estaba unido un grupo Hem (1).

Las subunidades de la Hb interactúan entre sí por medio de enlaces no covalentes, tales como fuerzas de Van der - - Walls, puentes de hidrógeno y uniones salinas.

Los análisis cristalográficos por rayos X, mostraron que la conformación era dependiente de la oxigenación; así de los modelos tridimensionales, se hizo aparente que cada cadena  $\alpha$  contacta con las dos cadenas  $\beta$  a lo largo de dos superficies diferentes; de aquí que si las subunidades se designan  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  pueden definirse dos intercontatos como  $\alpha_1 \beta_1$  y  $\alpha_2 \beta_2$ , donde el intercontacto de  $\alpha_1 \beta_1$  es idéntico al  $\alpha_2 \beta_2$  y el  $\alpha_1 \beta_2$  es idéntico al  $\alpha_2 \beta_1$ . Los modelos de alta resolución (2.8 Å) indicaron que durante la oxigenación ocurre un movimiento considerable del intercontacto  $\alpha_1 \beta_2$ , en contraste al  $\alpha_1 \beta_1$  que permanece relativamente fijo.

La afinidad por  $\text{O}_2$  de la Hb puede ser influenciada por alteraciones en las condiciones del solvente, tales como: -

pH, fuerza iónica, temperatura y concentración de fosfatos orgánicos (1,2).

#### A.4 . LA HEMOGLOBINA EN EL REINO ANIMAL.

La mayoría de los organismos unicelulares se proveen del oxígeno ( $O_2$ ) que necesitan para su metabolismo, por simple difusión, y de igual forma eliminan el dióxido de carbono ( $CO_2$ ), en cambio, en los organismos multicelulares, el metabolismo activo de sus tejidos es posible gracias a un mecanismo que permite el suministro de  $O_2$  y la eliminación de  $CO_2$  constantes. La necesidad de un portador de  $O_2$  ha sido satisfecha de diferentes maneras; en los animales inferiores que son relativamente pequeños y con una velocidad metabólica baja, los pigmentos portadores pueden encontrarse disueltos en el plasma (3,4), mientras que en los animales superiores, los portadores fueron encerrados en células especializadas, esto permite la presencia de grandes cantidades de portador sin una elevación excesiva de la viscosidad y de la presión osmótica del medio circulante (3).

Hay un cierto número de portadores de  $O_2$  distribuidos en el reino animal con diferentes propiedades. El portador universal de casi todos los vertebrados es una Hb de peso molecular (P.M.) promedio de 70 kilodaltons (Kd) con ferroporfirina 9 como grupo prostético, que sin embargo, presenta diferencias notables entre las especies, v.gr; secuencia de aminoácidos, espectro de absorción, estructura

cristalina, afinidad por  $O_2$ , resistencia a la desnaturalización ácida o alcalina, etc. (1,3).

En los vertebrados, los portadores de  $O_2$  que pueden encontrarse son: Hemoglobina, la cual por tratarse de una molécula compleja se ha denominado eritrocruorina (P.M. 1,500 a 3,000 Kd); Hemocianina (780 a 6,760 Kd); Hemeritrina (66 Kd) y Clorocruorina (3,000 Kd), las cuales son moléculas que van de monómeros simples a grandes polímeros, en los cuales el grupo prostético puede contener hierro o cobre (Hemocianina). Los portadores de P.M. bajo (17.6 a 70.4 Kd) son intracelulares, mientras que los de P.M. elevado están invariablemente disueltos en el plasma.

Los anélidos pueden presentar eritrocruorinas, hemeritrinas o clorocruorinas, los artrópodos hemocianinas y eritrocruorinas y los sipunculoideos hemeritrina (2,3,4).

### A.3. LA HEMOGLOBINA EN HUMANOS.

En contraste a la uniformidad en las Hbs de los vertebrados en cuanto al Hem, las comparaciones de las propiedades físicas y químicas apoyaron la existencia de diferencias inter e intraespecie. En 1866 Körbel había notado que las Hbs diferían marcadamente en sus tasas de desnaturalización en ácidos fuertes o alcalis. Su observación de que la Hb de neonatos humanos es resistente a la desnaturalización alcalina, proporcionó las bases para los métodos de estimación de Hb Fetal (Hb F) (1). De forma similar Kleihauer (5), utili-

zando la resistencia a la desnaturalización ácida describió un método para visualizar los eritrocitos con Hb F; posteriormente Wood y cols. (6) desarrollaron una técnica con anticuerpos fluorescentes para hacer evidentes las células con este tipo de Hb.

En los inicios de los 60's de este siglo, el advenimiento de nuevas técnicas, permitió la determinación de las secuencias de los aminoácidos y de la estructura tridimensional de la oxi y desoxihemoglobina (1).

La introducción de técnicas analíticas que pudieran separar proteínas estructuralmente diferentes, posibilitó la identificación de diferentes tipos de Hbs en humanos normales. El desarrollo de la electroforesis en medios sólidos y semisólidos demostró que los hemolizados de individuos adultos, consistía de tres componentes, los cuales, Kunkel y Wallenius en 1955 llamaron  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$ .

La Hb  $A_1$ , hoy llamada A, constituye aproximadamente el 95% del total de las Hbs de los adultos normales. La Hb  $A_2$ , constituye aproximadamente el 2.5% y se encuentra distribuída uniformemente en las células rojas. La Hb  $A_3$ , está constituída por Hb A con ligeras modificaciones, v.gr: Glucosilaciones o uniones a fosfato de piridoxal, etc.

En vista de la marcada resistencia de la Hb de cordón umbilical a la desnaturalización en soluciones alcalinas, se



sospechaba que los eritrocitos de neonatos contenían una Hb estructuralmente distinta, la cual se denominó Hb F, sin embargo, los hemolizados de recién nacidos contienen tres componentes principales: Hb F 60%, Hb F<sub>1</sub> 15%, Hb A 25%; la Hb F<sub>1</sub> difiere de la Hb F únicamente en el NH<sub>2</sub> terminal, el cual está acetilado (1).

Actualmente se ha demostrado que en los humanos existen varios tipos de Hbs cuya estructura es un tetrámero de aproximadamente 65 Kd con un grupo Hem por cadena, siendo ésta de dos tipos: alfas ( $\zeta$  zetas y  $\alpha$  alfas) y no alfas ( $\epsilon$  epsilon,  $\gamma$  gamma,  $\delta$  delta y  $\beta$  beta). Las cadenas alfas constan de 141 aminoácidos y las no alfas de 146 (1,2).

Estas cadenas están codificadas por ocho genes globínicos funcionales que se hallan dispuestos en dos grupos génicos; los genes alfa, localizados en la región 16p12-pter y los genes no alfa en el segmento 11p1205-1208 (7).

El grupo de los genes no alfa (5 funcionales y 1 no funcional o pseudogen) se extiende sobre aproximadamente 60 kilobases (kb) de ADN, en el siguiente orden de 5' a 3'  $\epsilon$   $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$  y  $\beta$ , y los genes alfa (3 funcionales y 3 pseudogenes) en 30 kb  $\zeta$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  en el mismo orden;  $\gamma^G$  y  $\gamma^A$  difieren en un aminoácido en la posición 136 ( $\gamma^G$  glicina,  $\gamma^A$  alanina) (2,7,8,9,10). Fig. 1

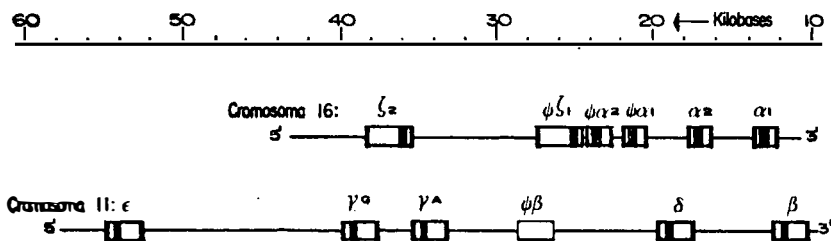


Figura 1. Estructura y localización cromosómica de los genes globínicos alfa y no alfa.

Durante el desarrollo normal del ser humano aparecen seis diferentes Hbs: Gower 1, Gower 2, Portland, Fetal, A y  $A_2$ , las cuáles difieren en el tipo de asociación entre las cadenas alfas y no alfas ( $2\alpha + 2\text{no } \alpha$ ), Fig. 2.

PERODO	Embrionario	Fetal	Adulto
HEMOGLOBINAS	Hb Gower 1 $\zeta_2 \epsilon_2$		HbA $\alpha_2 \beta_2$
	Hb Gower 2 $\alpha_2 \epsilon_2$	Hb Fetal $\alpha_2 \gamma_2$	
	Hb Portland $\zeta_2 \gamma_2$		HbA <sub>2</sub> $\alpha_2 \delta_2$

Figura 2. Hemoglobinas Humanas durante el desarrollo.

La eritropoyesis de las Hbs durante la ontogenia, ocurre en el saco vitelino, luego en el hígado y bazo y finalmente en la médula ósea, (1,8.11). Fig. 3.

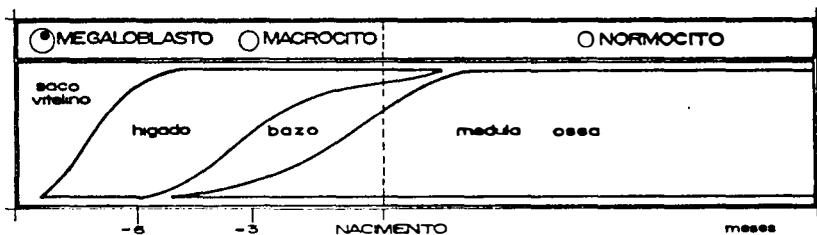


Figura 3. Tejidos eritropoyéticos en la ontogenia.

En el saco vitelino, las células eritroides nucleadas que miden aproximadamente  $200 \mu^3$ , llamadas megaloglastos, sintetizan la Hb Gower 1 hasta la 5<sup>a</sup> semana de gestación, a partir de la 6<sup>a</sup> a la 12<sup>a</sup> semana, las células megaloblásticas que se encuentran en el hígado, sintetizan Hbs Gower 1, Gower 2, Portland y Fetal. Desde la 6<sup>a</sup> semana se inicia la producción en el hígado de otras células eritroides sin núcleo, llamadas macroцитos de  $125 \mu^3$  que sintetizan Hbs Gower 2, Fetal y una pequeña cantidad de Hb A, estas células sintetizan predominantemente Hb F y muy poca Hb A desde la 8<sup>a</sup> semana. A partir de la 12<sup>a</sup> semana, las células megaloblásticas desaparecen (8, 12).

La eritropoyesis en el bazo ocurre transitoriamente durante la gestación, (Fig. 3); los macroцитos presentes en -

este tejido y en el hígado, sintetizan preferencialmente Hb F. Cuando la eritropoyesis se realiza en médula ósea, por un tiempo se conserva la relación de Hb F/ Hb A semejante a la de hígado y bazo, sin embargo, al acercarse los nueve meses de gestación se observa un incremento en la producción de Hb A con una disminución proporcional de Hb F, para este tiempo, la eritropoyesis sucede casi exclusivamente en médula ósea. Por otra parte, la Hb A<sub>2</sub> inicia su síntesis poco antes de los nueve meses de gestación, para alcanzar los niveles del adulto alrededor de los seis meses de vida postnatal (8).

## B. MECANISMOS DE ACTIVACION-INACTIVACION GENICA.

### B.1. CONSIDERACIONES GENERALES.

Uno de los temas más interesantes de la Biología, es la comprensión de los fenómenos involucrados en el desarrollo de un organismo; se ha hecho evidente que la información contenida en el genoma, requiere de la expresión diferencial de sus genes, a medida que el desarrollo avanza, (13).

En la Biología contemporánea, el concepto de la célula como la expresión de un programa genético es común, sin embargo, este programa podría estar también regulado por el entorno metabólico de la célula, así debido a las condiciones en las que viven los procariontes, necesitan responder a las fluctuaciones de las fuentes de nutrientes, por lo que su supervivencia depende de su habilidad para cambiar de sustrato metabólico. Entre las bacterias, es por tanto primordial la flexibilidad, además de la economía, pues sería desventajoso producir enzimas para una ruta metabólica que no puede ser utilizada por estar ausente el sustrato.

Los genes bacterianos están dispuestos en grupos, de modo que las enzimas necesarias para una vía metabólica son codificadas por genes adyacentes y el grupo entero puede ser transcrito en un ARN mensajero (ARNm) policistrónico para que sea traducido secuencialmente por los ribosomas en cada una de las proteínas. Esta forma de organización permite la regulación de la expresión de los genes de las proteínas in-

volucradas como una unidad, ésto se logra por la interacción de proteínas reguladoras con sitios de control específicos - para cada grupo de genes. Este tipo de respuesta rápida a cambios en la fuente de nutrientes, ha sido caracterizada en E. coli, donde el sistema del Operón Lactosa proporciona un modelo adecuado (14). El Operón Lactosa interviene en la utilización de la Lactosa y comprende tres genes estructurales (Z, Y y A) que producen un ARNm policistrónico (ARNm Lac). Este mensajero codifica la  $\beta$  galactosidasa (Z), la Lac permeasa (Y) y la transacetilasa (A). La  $\beta$  galactosidasa hidrolisa la lactosa en galactosa y glucosa; la Lac permeasa actúa como un transportador de la lactosa al interior de la célula y la transacetilasa cataliza la transferencia de un grupo acetilo, de la Acetil CoA a la galactosa. Estos genes son controlados por tres segmentos de ADN, el gen i ó gen regulador que codifica el represor Lac, el promotor y el operador. En E. coli hay unas diez moléculas de represor - que al unirse al operador impide la síntesis de ARNm Lac, la afinidad del represor por el operador es regulada por el inductor, en este caso, lactosa, así, si el nivel de lactosa es bajo las moléculas del represor son activas e impiden la fijación de la ARN polimerasa o si el medio es rico en lactosa el inductor se une al represor Lac inactivándolo y permitiendo la transcripción del mensajero (15, 16).

El desarrollo de un organismo multicelular requiere que la información de su genoma sea expresado diferencialmente -

a través de las diversas etapas, para lograr constituir los tejidos especializados, de este modo, cada estirpe celular, se caracteriza por un patrón determinado de genes activos e inactivos que cambian a medida que el desarrollo avanza; dado que el genoma de un organismo superior puede contener hasta  $200 \times 10^3$  genes, no parece probable que cada gen se regule individualmente, sino que, posiblemente los genes se controlen en grupos. Los procesos que utilizan porciones limitadas del genoma, conducen a la diferenciación celular y por tanto se restringe la capacidad para sintetizar ciertas proteínas; la secuencia de expresión de proteínas en la ontogenia ha sido adquirida a través de la evolución y así capacita al organismo para vivir en su medio (13, 17).

## B.2 MECANISMOS DE ACTIVACION-INACTIVACION DE LOS GENES GLOBINICOS.

Casi todas las especies de vertebrados presentan cambios en la producción de Hbs en el transcurso de su desarrollo; los eritrocitos derivados del saco vitelino en aves y mamíferos y los anfibios en la etapa larvaria, producen Hbs embrionarias. La Hb A usualmente reemplaza a la embrionaria directamente, sin embargo, en algunos mamíferos (arteodáctilos y primates) se sintetiza Hb F al establecerse la eritropoyesis en el embrión, para predominar la Hb A poco después del nacimiento (18).

La aparición secuencial de diferentes tipos de Hbs du--

rante la ontogenia del humano, representa un buen ejemplo de expresión regulada de genes específicos a través del desarrollo. Así en las primeras semanas de vida intrauterina, del grupo de los genes alfa, las cadenas  $\zeta$  predominan sobre las cadenas  $\alpha$ , mientras que del grupo de genes no alfa se expresan primordialmente las cadenas  $\epsilon$  sobre las  $\nu$ , y se detecta además una mínima proporción de cadenas  $\beta$ . Alrededor de las 8 semanas, las cadenas  $\zeta$  han sido reemplazadas por las cadenas  $\alpha$  que continuarán expresándose por el resto de la vida del individuo, mientras que las cadenas  $\nu$  mas una pequeña proporción de las  $\beta$  ( $\approx 3\%$ ) substituyen completamente a las  $\epsilon$ , lo que permite establecer que en la primera etapa de gestación ocurren dos cambios, uno  $\zeta \rightarrow \alpha$  en el grupo genético alfa, y el otro  $\epsilon \rightarrow \nu$  en el no alfa y que éstos son asincrónicos. Por otra parte, las cadenas  $\nu$  declinan su síntesis al acercarse el período normal de nacimiento, a la vez que las  $\beta$  incrementan su producción hasta alcanzar los niveles del adulto, seis meses después del nacimiento. Las cadenas  $\delta$  por su parte, aparecen un poco antes de terminar la gestación, para estabilizarse en el rango propio de la etapa adulta, alrededor de los seis meses de vida postnatal (1, 12). Fig. 4.



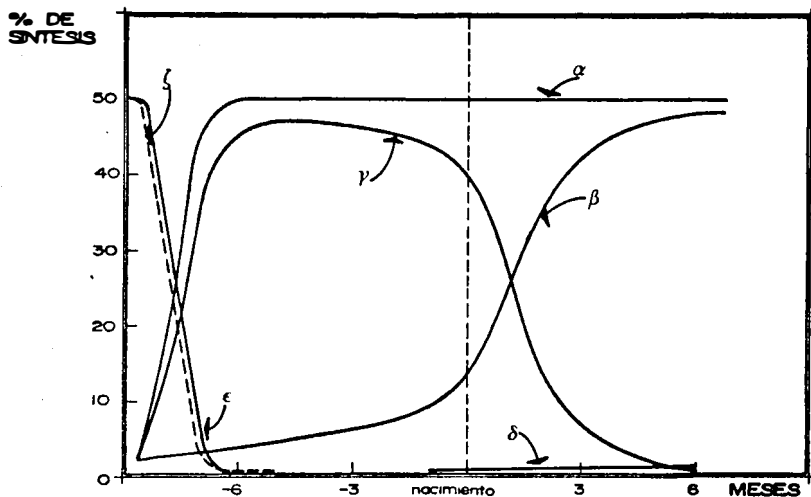


Figura 4. Síntesis de cadenas globínicas durante el desarrollo pre y postnatal del humano.

Durante la ontogenia de las Hbs, existen por lo tanto dos etapas en las que ocurre el fenómeno de activación-inactivación de genes globínicos, la etapa embrionaria y la etapa perinatal, este suceso no coincide con el sitio de la eritropoyesis, sino que parece estar relacionado con la edad ontogénica (1, 8).

Todos los genes globínicos humanos poseen tres segmentos codificadores o exones, separados por dos secuencias intermedias que no codifican o intrones. Fig. 5.

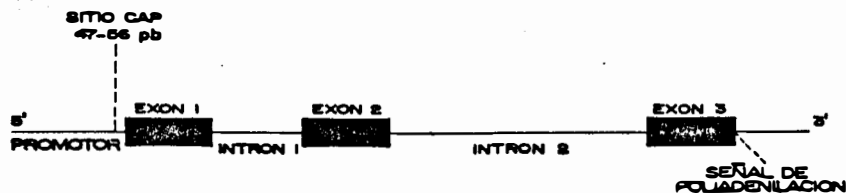


Figura 5. Anatomía de un gen globínico.

La relación entre la expresión de los genes globínicos y su estructura nucleotídica ha sido analizada. Los genes  $\zeta$  y  $\alpha$  están constituidos por aproximadamente 2,200 y 800-pares de bases (pb) respectivamente y los  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$  por aproximadamente 1,600 pb. Existen además dos regiones flanqueadoras que se transcriben pero que no se traducen (7, 8, 20). Fig. 6.



Figura 6. Segmentos codificadores (en negro) y no codificadores de los genes  $\alpha$  y  $\beta$ .

Las secuencias que participan en la expresión del gen - se encuentran dentro y alrededor del mismo, es decir, en la región promotora 5', en las uniones exón/intrón y en el extremo 3'. Fig. 7.

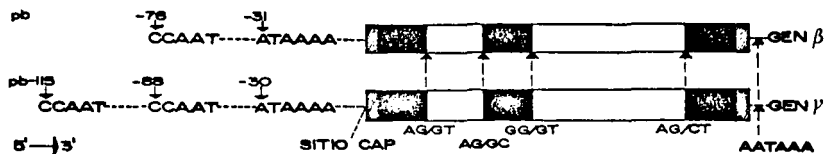


Figura 7. Secuencias involucradas en la transcripción y procesamiento del ARNm de los genes globínicos  $\beta$  y  $\gamma$

Las secuencias CCAAT y ATA participan indirectamente en la velocidad de transcripción, los sitios de ruptura y unión de los intrones AG/GT participan en el procesamiento adecuado del ARNm, mientras que en el extremo 3' el hexanucleótido AATAAA participa en la poliadenilación del ARNm. Estas regiones importantes para la función génica, han sido conservadas a través de la evolución (8,9,19).

La evidencia disponible indica que la modulación principal de la expresión génica ocurre a nivel transcripcional, aunque pueden tener influencias moduladoras menores pero significativas, las diferencias en el procesado del ARNm, su estabilidad y su tasa de traducción.

La estructura de la región promotora, incluyendo su se-

cuencia, metilación y estructura cromatínica, posiblemente - está involucrada en la regulación de la expresión de los genes. En el ADN de los mamíferos el único nucleótido modificado bien caracterizado es la 5-metilcitosina (mC); los residuos metilados de citosina se hallan predominantemente en la secuencia 5'CpG3'. Mediante el uso de enzimas de restricción sensibles a mC, se demostró un grado elevado aunque variable, de metilación en la región de los genes globínicos - en tejidos que no expresan Hb, y una relativa demetilación - de sitios específicos alrededor de estos genes en las células donde se expresan. Las regiones promotoras de los genes humanos  $\epsilon$  y  $\gamma$  exhiben una relación recíproca entre metilación y expresión en las células eritroides de embriones tempranos (8): No obstante, se han originado dudas acerca de - la importancia de la metilación del ADN debido a que ciertos genes pueden ser transcritos activamente a pesar de estar - extensamente metilados. Las células cultivadas en presencia de 5-azacitidina (análogo de citosina) incorporan este compuesto en su ADN e inhibe la actividad de la metil transferasa; la demetilación global del ADN se ha asociado a la expresión de genes específicos (21, 22).

Por otra parte, se ha observado que los genes que se - transcriben, muestran un aumento en la sensibilidad a las nucleasas en secuencias específicas de ADN que se han asociado a la unión de proteínas no histónicas involucradas en la - - transcripción génica. Sitios muy sensibles a ADNasa se han-

encontrado dentro de la región comprendida entre -200pb y el sitio CAP de los genes  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$  en células de hígado fetal, mientras que las células de médula ósea de adulto únicamente presentan sitios sensibles hacia 5' de los genes  $\delta$  y  $\beta$  (8).

En contraste a los elementos que actúan en Cis (sobre la misma cadena de ADN), los factores que actúan en Trans, pueden ser codificados por genes distantes. Un candidato para estos factores es una proteína con capacidad de unirse al ADN que se halla en el núcleo de las células eritroides definitivas del pollo, donde el gen  $\beta$  es expresado, mientras que está ausente del núcleo de eritroblastos primitivos y neuronas (8). Además un factor presente en el suero de fetos de borrego de 80 a 120 días de gestación es capaz de reducir la síntesis de cadenas  $\gamma$  en colonias eritroides formadas por progenitores de neonatos y adultos, si bien no se ha descrito su mecanismo de acción (23, 24, 25). Asimismo, las células nucleadas de sangre periférica de adulto que han sido irradiadas, pueden aumentar la síntesis de Hb A al incluirse en los cultivos de células eritroides de sangre de cordón, en este experimento ocurrió una relación directa entre Hb A y el número de células irradiadas que se adicionaron (26). Este fenómeno se observó in vivo al transplantar células hematopoyéticas del hígado fetal del borrego a un ejemplar adulto en quien las células fetales produjeron Hb Adulta (27). Estos reportes apoyan la participación de factores del entorno celular en los procesos del encendido y apagado-

de por lo menos, los genes globínicos.

### B.3. SINTESIS DE HEMOGLOBINAS DURANTE LA DIFERENCIACION CELULAR.

La liberación de células rojas anucleadas de la médula ósea o de otros órganos eritroides, refleja la culminación de los procesos de la diferenciación celular, proliferación y maduración, que inicia con una célula multipotencial que pasa por los estadios de proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y termina en un eritrocito completamente hemoglobinizado. Este proceso analizado in vitro en medio semisólido, ha definido dos tipos de células progenitoras "tempranas" y "tardías" con potenciales proliferativos significativos de diferente capacidad que se clasifican como Unidades Multifomadoras Tempranas Eritroides (BFU-E) y Unidades Formadoras de Colonias Tardías Eritroides (CFU-E) respectivamente, basándose en el tamaño y morfología de las colonias eritroblastos producidos.

La síntesis de Hb se inicia aproximadamente en el estadio de proeritroblasto. Los progenitores eritroides de la etapa fetal, forman colonias que contienen predominantemente Hb F, mientras que los progenitores de la médula ósea de adulto forman colonias que contienen principalmente Hb A y también cantidades significativas de Hb F. Los progenitores presentes en sangre de cordón umbilical o tejidos hematopoyé

ticos durante el período perinatal, forman colonias que contienen Hb F y Hb A en proporciones variables, lo que aparenta que el control está bajo un "reloj del desarrollo" (8), aunque el contenido de Hbs de las colonias derivadas de progenitores adultos puede ser modulable por factores exógenos (23, 24, 25). En los progenitores adultos, la Hb A se encuentra en todos los eritroblastos, mientras que la Hb F se encuentra únicamente en una fracción de la población que se agrupa en algunos sectores de la colonia; así, un progenitor sencillo tiene la capacidad de originar eritroblastos que contienen ya sea Hb A (Células A) ó Hb A más Hb F (Células F) (28), aparentemente los eventos regulatorios ocurren durante la diferenciación de los progenitores eritroides (8).-

Fig. 8.

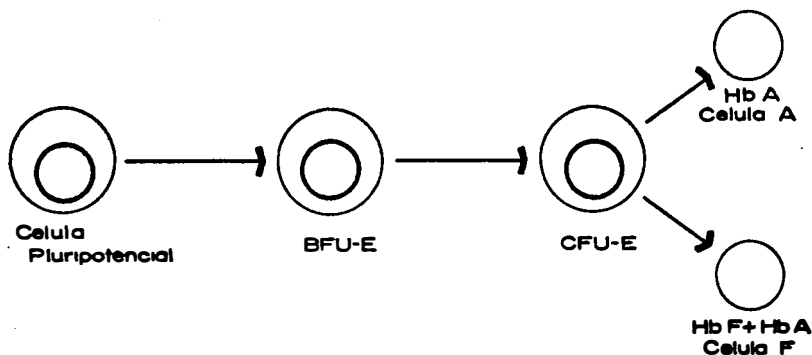


Figura 8. Diferenciación eritroide in vitro.

Se ha reportado que la cantidad de Hb F es mayor en co

lonias derivadas de progenitores tempranos, comparada con la de aquellos derivados de progenitores tardíos, aunque no todos los estudios apoyan estas observaciones. La propiedad de producir Hb F parece adquirirse con cierta probabilidad durante cada división celular en las etapas iniciales de la formación de la colonia (8).

Adicionalmente, los estudios realizados in vitro, han mostrado una síntesis asincrónica de Hb F y Hb A durante la maduración eritroide en cultivos clonales de médula ósea de adulto en la que se observó que la mayoría de las cadenas  $\gamma$  se sintetizan en proeritroblastos y eritroblastos basófilos, mientras que la síntesis de cadenas  $\beta$  puede iniciarse ligeramente más tarde (29).



### C. PRODUCCION DE HEMOGLOBINA FETAL EN ADULTOS.

#### C.1 DROGAS ASOCIADAS CON LA SINTESIS DE HEMOGLOBINA - FETAL.

En los pacientes con anemia de células falciformes y talasemia  $\beta$ , es muy deseable la estimulación de la síntesis - de cadenas  $\gamma$  como meta terapéutica, un incremento en la producción de globinas  $\gamma$  podría modular la severidad, o mejorar el equilibrio entre las cadenas alfas/no alfas.

Basándose en el hecho de que la 5-azacitidina (5-aza) - inducía la hipometilación del ADN de células mantenidas en - cultivo y activaba genes específicos, De Simone y cols (21) - administraron la droga en mandriles (Papio cynocephalus) ané- micos, resultando en una marcada elevación de la Hb F, y en algunos animales ocurrió una completa reversión a la síntesis de esta Hb. Los resultados de los experimentos promovie- ron su uso en humanos; la administración de la droga en un - paciente con anemia de células falciformes elevó en forma re- levante la síntesis de cadenas  $\gamma$ , y el número de reticuloci- tos; aunque el efecto sobre la biosíntesis de globina fué - transitorio, la concentración de Hb total permaneció estable por cerca de cuarenta días. Si bien el ADN cercano a los genes globínicos no  $\alpha$  de este paciente se hipometiló no es con- cluyente que este cambio ocasionara la producción elevada de cadenas  $\gamma$  (22). Posteriormente se propuso que la droga ade- más de hipometilar el ADN actuaba perturbando la maduración-

eritroide (30).

Otras drogas citotóxicas específicas de la fase S, como la Arabinosilcitosina (la cual inhibe la ADN polimerasa y la ribonucleótido reductasa)(31) y la Hidroxiurea (que inhibe la ribonucleótido reductasa)(11), han demostrado su capacidad para inducir la síntesis de Hb F en animales de experimentación y en humanos (32, 33, 34, 35). Algunos estudios sugieren que la cantidad de Hb F producida en respuesta a estos agentes es similar a la observada con 5-aza, mientras que otros trabajos muestran que la Hidroxiurea y la Arabinosilcitosina son menos potentes (33, 34, 21). Con la Hidroxiurea se ha notado una reducción de la metilación de los genes  $\gamma$  aunque la metilación total del ADN no sufre cambios (34).

Existe el reporte de incremento de Hb F en un paciente con anemia aplásica que fué tratado con una terapia combinada de prednisona y testosterona (36).

Finalmente, in vitro se observó la síntesis preferencial de Hb F bajo el estímulo de prostaglandinas  $E_2$ . Esto apoya que los factores ambientales pueden tener un papel significativo en el programa de los progenitores eritroides (37).

## C.2 HEMOGLOBINA FETAL EN PADECIMIENTOS NEOPLASICOS Y NO NEOPLASICOS.

En adultos normales, es posible encontrar pequeñas can-

tidades de Hb F en sus eritrocitos. La mayoría de los individuos tienen menos del 1% de Hb F, variando de 0.3% a 1.2%; esta Hb está distribuída heterogéneamente entre los hematíes, de aquí que la subpoblación reciba el nombre de Células F. - Existe una correlación lineal positiva entre Hb F y Células-F cuando los niveles de Hb F oscilan entre 1 y 3% (6).

El perfil de las Hbs puede encontrarse alterado durante la transformación neoplásica humana; en estos estados se han reportado incrementos en la Hb F, principalmente en la Leucemia Mieloide Juvenil Crónica, donde esta Hb alcanza hasta un 70%, no obstante, en otros tipos de leucemias como: Mieloblástica Aguda, Linfoblástica, Linfática Crónica, Mielomonocítica, Granulocítica Crónica, Linfocítica Crónica y Aguda, mielógena Crónica y Eritroleucemias también se eleva esta Hb - (38, 39, 40, 41, 42). Además está reportada la elevación de Hb F en pacientes con Carcinoma de testículo y prostático - (43).

Por otro lado, existen algunas condiciones no neoplásicas en las que se ha detectado aumento en la proporción de - Hb F, los mandriles sujetos a stress eritropoyético por hemólisis aguda, flebotomía e hipóxia hipobárica, mantuvieron elevada la Hb F durante el experimento (44, 45). En los humanos se han detectado incrementos de Hb F en: Hipertiroidismo no tratado, Anemias refractarias y durante la expansión - eritroide aguda (46, 47, 48).

La única condición no patológica en la que ocurre un aumento de Células F es el embarazo; la comparación del número de Células F con el porcentaje de Hb F determinado químicamente indicó que el incremento en la síntesis materna de Hb F resulta de un aumento de Células F, más que de un aumento en la síntesis de Hb F por las células F, o por el paso de eritrocitos fetales a través de la placenta (49, 50).

### C.3 ONCOGENES Y CANCER.

Los oncogenes son genes involucrados en la aparición del cáncer. Fueron identificados primero en virus cuyo genoma está constituido por ARN (retrovirus) aislados del Sarcoma de Rous (sarcoma de aves). Las secuencias de bases de los oncogenes parecen haberse conservado durante la evolución, pues se han encontrado en especies que van de levaduras a humanos, de esto se dedujo que los virus oncogénicos habían incorporado una porción de información génica del huésped. Estos genes son versiones alteradas de genes normales (llamados proto-oncogenes) que determinan proteínas con funciones importantes para la célula, así las proteínas oncogénicas parecen inducir el cáncer al imitar parcialmente la función de las normales (51, 52, 53).

Aparentemente existe cierta relación entre los oncogenes y los factores de crecimiento, ya que se ha demostrado la similitud estructural e inmunológica entre proteínas codificadas por oncogenes y algunos de estos factores v.gr; la

cadena B del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas - - (PDGF) y la proteína p28 codificada por el oncogene sis (54). Además algunos oncogenes determinan receptores de membrana - (ò parte de ellos), proteínas nucleares y tirosina quinasas, tanto citoplásmicas como de membrana (51, 53, 55).

El PDGF y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) estimulan la aparición de la proteína codificada por c-fos que antecede a la presencia de ARNm de c-myc (56, 57). Asimismo, la expresión de ciertos oncogenes induce la síntesis endógena de factores de crecimiento, lo cual puede estimular la - producción autócrina de la célula. Esto ayudaría a explicar la proliferación de células tumorales in vitro y probablemente in vivo con niveles mínimos o nulos de aporte externo de factores de crecimiento (55). Fig. 9.

Se ha descrito la expresión diferencial de algunos onco genes celulares (c-onc, para diferenciar de v-onc, oncogenes virales) como c-fos, c-abl y c-ras durante el desarrollo pre- y postnatal del ratón, la cual es además tejido-específica, - lo que sugiere la participación de estos genes (proto-oncogenes) en el proceso de desarrollo normal (58), asimismo, existe evidencia de la aparición de ARNm del proto-oncogen c-ras durante la regeneración del hígado de la rata después de ser dañado química o quirúrgicamente, de igual modo se detectó el ARNm para alfa-feto-proteína, 24 hrs. después de que el oncogen c-ras alcanzara la expresión máxima a 36 hrs. del daño - (59).

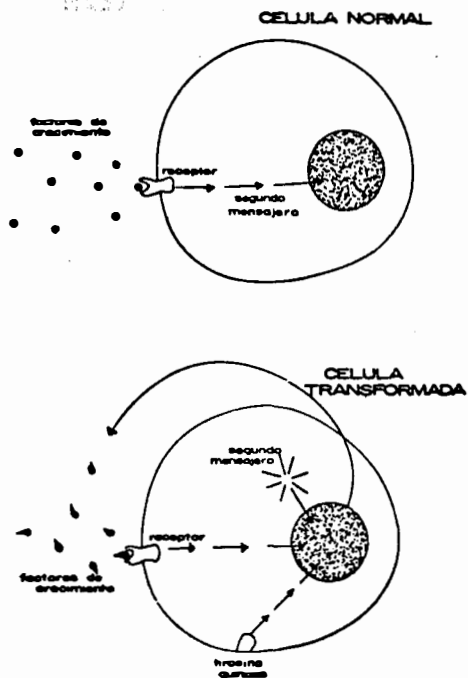


Figura 9. Mecanismo de la mitogénesis en células normales y transformadas.

Existen ciertos mecanismos moleculares que pueden convertir un proto-oncogen en un oncogen. En el caso de los genes tumorales de mamíferos, dentro de estos mecanismos se incluyen: las mutaciones puntuales, reorganizaciones cromosómicas y amplificación génica. En el caso de los genes asociados con retrovirus, el gen transducido puede sufrir una muta

ción o puede insertarse junto a una región reguladora vírica que incremente su nivel de expresión (60, 61, 62).

En células tumorales humanas, se ha demostrado la existencia de transcritos de ARN derivados de oncogenes (63, 64). La identificación y aislamiento de estos oncogenes, ha hecho posible investigar a nivel molecular, los procesos involucrados en el desarrollo de la neoplasia humana. La mayoría de los genes transformantes en humanos, son miembros de la familia génica ras; a la fecha se han caracterizado tres oncogenes ras: Ha-ras, Ki-ras y N-ras. A pesar de que muestran diferente estructura genética, codifican proteínas altamente relacionadas, con 189 aminoácidos, generalmente conocidas como p21. La comparación de los oncogenes ras con sus contrapartidas normales, ha permitido descubrir que estos oncogenes adquieren sus propiedades transformantes por mutaciones puntuales en los codones 12 ó 61 (65).

Sin embargo, se ha descrito la presencia de ARNm para otros oncogenes en diversas neoplasias. Más de un oncogen celular fue transcripcionalmente activo en todos los tumores examinados, además la actividad transcripcional de los oncogenes generalmente fue más alta en el tejido tumoral que en el sano del mismo órgano; si bien el patrón de expresión es regular, no es específico para cada tipo de tumor (66).

El estudio de los cromosomas humanos ha revelado que las células malignas de la mayoría de los tumores examinados tie-

nen defectos cromosómicos característicos, aunque no únicos - para un tipo de neoplasia. Las translocaciones del mismo segmento cromosómico con puntos de ruptura precisos ocurren en muchas leucemias y linfomas; en varios carcinomas una banda específica aparece delecionada. Las trisomías son poco observadas en las neoplasias. Los rearrreglos cromosómicos pueden tener algún papel en la neoplasia humana, puesto que una translocación podría colocar un oncogen junto a una secuencia activa de ADN; una deleción eliminaría un represor oncogénico y las trisomía proporcionarían una dosis génica extra (67).

BIODIVERSIDAD Y EVOLUCIÓN DE LA VIDA



**CAPITULO III**  
**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existe un grupo de alteraciones de la Hb entre las que se encuentran los estados homocigotos para la Talasemia y la Anemia de Células Falciformes, en las que el gen  $\beta$  se encuentra mutado. En las Talasemias  $\beta$ , los genes  $\gamma$  continúan expresándose aunque no en proporciones suficientes para mantener un equilibrio entre las cadenas globínicas  $\alpha/\gamma + \delta + \beta$  mientras que en la Anemia de Células Falciformes se ha notado que la presencia de Hb F inhibe la polimerización de la Hb S, por lo que es deseable la reactivación de los genes gamma o de las células que sintetizan estas cadenas (Células F) para mejorar el equilibrio  $\alpha/\text{no } \alpha$  en el caso de las Talasemias, e impedir la formación de polímeros de Hb S en la Anemia de Células Falciformes, haciendo más leves las manifestaciones clínicas.

Ciertas drogas como la 5-Azacitidina, Arabinosilcitosina y la Hidroxiurea, han mostrado un efecto favorable sobre la síntesis de Hb F, sin embargo, ya que son sustancias citotóxicas, su uso en estos padecimientos no ha sido completamente aceptado.

El fenómeno de elevación de Hb F en pacientes con Neoplasias presenta la oportunidad de investigar los mecanismos que controlan la expresión de Hb F; el conocimiento de estos mecanismos y de posibles factores implicados en ellos podría ofrecer alternativas en el tratamiento de estas patologías de la Hb.

**CAPITULO IV**

**HIPOTESIS**

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

#### HIPOTESIS

Además de las Leucemias y los Carcinomas Urogenitales, existen otras patologías neoplásicas que muestran incremento de Hb Fetal.

CAPITULO V  
OBJETIVOS

## OBJETIVOS

1. Cuantificar los diferentes tipos de Hemoglobinas y los parámetros hematológicos en pacientes con Neoplasias y en población normal.
2. Detectar niveles elevados de Hemoglobina Fetal y Células F, para inferir la activación de los genes globínicos gamma en pacientes con diferentes tipos de Neoplasias.
3. Estimar el efecto del tratamiento antineoplásico sobre los niveles de Hemoglobina Fetal.

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

CAPITULO VI

MATERIAL

## MATERIAL

El presente trabajo se realizó en dos poblaciones: pacientes con Neoplasias como grupo de estudio, e individuos sanos como grupo control.

La población con Neoplasias estuvo constituida por 100-pacientes de los servicios de Hematología y Oncología del Centro Médico de Occidente (CMO) IMSS, quienes tenían diagnóstico presunto o confirmado de algún tipo de neoplasia; los pacientes fueron captados en consulta o durante el control hematológico de quimioterapia y al momento de la obtención de la muestra, 74 estaban en tratamiento, 20 sin tratamiento y en 6 no fué posible obtener el dato, lo integraron 39 varones y 61 mujeres, cuyas edades oscilaron entre 15 y 86 años (con promedio de 47.94 y desviación estandar de 16.72). Debido a la gran diversidad de neoplasias y para un manejo estadístico adecuado, los pacientes se ubicaron en cinco subgrupos: Leucemias (n=18), Linfomas (n=24), Cáncer (CA) Mamario (n=27), CA Diversos (n=24) y Varios (n=3).

El subgrupo de las Leucemias lo constituyeron: 5 Granulocíticas Crónicas, 1 Granulocítica Aguda, 10 Linfoblásticas Agudas, 2 Linfoblásticas Crónicas (15 con tratamiento, 2 sin tratamiento y 1 sin establecer). Los Linfomas lo formaron: 8 Hodking, 7 no Hodking, 4 Linfocíticos, 1 de Burkitt, 1 Medular, 1 Linfadenopatía (benigna), 2 como tales (18 con tratamiento, 2 sin tratamiento y 4 sin establecer). Los CA Ma---



marios incluyen: 16 CA Mamarios, 7 Adenocarcinomas, 3 Metastásicos y 1 Escirro (21 con tratamiento, 5 sin tratamiento y 1 sin establecer). Los CA Diversos comprenden: 6 Cervico-Uterinos, 3 Sarcomas, 3 Broncogénicos, 2 Mielomas Múltiples, 2 - Epidermoides, 1 de Tiroides, 1 Adenocarcinoma de C6lon, 1 Ov6rico, 1 Pulmonar, 1 Rectosigmoides, 2 Tumoraciones (nasal y maxilar) y 1 CA poco diferenciado (16 con tratamiento y 8 sin tratamiento). Los Varios son: 1 Lupus Eritematoso Sist6mico, 1 Anemia Megalobl6stica y 1 Embarazo Molar. No fu6 posible - confirmar el diagn6stico en 4 pacientes, en 2 de los cuales - tampoco se tuvo conocimiento de si estaban o no en tratamiento.

Los pacientes en los que se desconocía su diagn6stico o tratamiento, así como los del grupo de Varios, no se tomaron en consideraci6n en las valoraciones parciales, no obstante - fueron incluídos en los cálculos de la poblaci6n total.

El tratamiento se verific6 en el expediente clínico y generalmente fu6 de tres tipos: Quirúrgico, Radioterapia y Quimioterapia, usados por separado o en combinaci6n; los fármacos administrados fueron: Vincristina, Adriamicina, Ciclofosfamida, Busulfan, Mercaptopurina, Rifampicina, Citarabina, Me<sub>2</sub>totrexate, Mustina, Vinblastina, Actinomicina D, Procarbaci<sub>2</sub>na, Clorambucil y Prednisona, con excepci6n de la última (inmunosupresor y antiinflamatorio), todas ellas son drogas citotóxicas, utilizadas por separado o en combinaci6n.

La población Normal la formaron 24 individuos sanos pertenecientes al personal de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente IMSS, siendo 11 mujeres y 13 varones, cuyas edades oscilaron entre 23 y 44 años (edad promedio de 31.26 y desviación estandar de 6.61), sin antecedentes neoplásicos, hemoglobinopatías o embarazo.

CAPITULO VII

METODOS

## MÉTODOS.

Las muestras sanguíneas (10 ml) se obtuvieron por punción venosa con anticoagulante (EDTA al 10%). La biometría hemática se realizó en un contador Coulter modelo S del laboratorio del Hospital de Especialidades del CMO.

En ambas poblaciones se determinó el porcentaje de Hb F por los métodos de Betke (68) y de Singer (69), Células F (5) y Hb A<sub>2</sub> (70). Además para descartar alguna alteración en la Hb, se realizaron electroforesis de Hbs en agarosa a pH 8.6 (71) y se aplicaron los factores discriminativos (72) en los datos hematológicos.

### A. Preparación del Hemolizado.

Para la preparación del hemolizado se lavaron los eritrocitos con solución salina 0.85% por tres ocasiones y se centrifugaron a 3000 rpm. Por cada ml de paquete de eritrocitos se agregó un ml de agua destilada y 0.4 ml de tetracloruro de carbono, agitándose vigorosamente para centrifugarse a 3000 rpm por cinco minutos, el sobrenadante se recuperó sin tocar los estromas.

### B. Cuantificación de Hb F. Método de Betke (68).

Para la técnica de Betke se ajusta la Hb del hemolizado a 5-8 g/dl, se colocan 0.4 ml del hemolizado en un tubo y se añaden 10 ml de solución de Drabkin, mezclar adecuadamente. -

Pipetear en tres tubos (un control y dos problemas) 3 ml de la mezcla anterior. Añadir a cada tubo problema 0.2 ml de NaOH 1.28 N, mezclar bien y dejar actuar durante dos minutos a 20°C. Agregar a los dos minutos exactos 2 ml de solución saturada de sulfato de amonio, mezclar adecuadamente y dejar en reposo diez minutos. Adicionar al tubo control 0.2 ml. de agua destilada y 2 ml de solución saturada de sulfato de amonio, mezclar bien y dejar en reposo por diez minutos. Filtrar con papel Whatman No. 2; diluir 1 ml del filtrado control con 4 ml de agua destilada, determinar la densidad óptica a 540 nanómetros contra blanco de Drabkin. El porcentaje de Hb F se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Hb F} = \frac{\text{D.O. Hb F}}{\text{D.O. Hb control} \times 5} \times 100$$

C. Cuantificación de Hb F. Método de Singer (69).

Para la técnica de Singer se colocan en dos tubos problemas 1.6 ml de NaOH 0.0833 N y se lleva a 20°C. Se adiciona 0.1 ml del hemolizado agitando continuamente durante 20 segundos y 40 segundos después se agregan 3.4 ml de solución saturada de sulfato de amonio al 50% (400 ml solución saturada de sulfato de amonio + 400 ml de agua destilada + 2 ml de HCl 10 N) agitar y a los 30 minutos de reposo se filtran con papel Whatman No. 42 ó 44. En otro tubo, a 5 ml de agua destilada se agregan 20 µl del hemolizado (tubo control). La den-

sidad óptica se mide a 540 nanómetros. El porcentaje de Hb F se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Hb F} = \frac{\text{D.O. Hb F}}{\text{D.O. Hb total}} \times 0.203 \times 100$$

#### D. Cuantificación de Hb A<sub>2</sub> (70)

La DEAE celulosa (DE-52) se lava por tres ocasiones con una solución amortiguadora pH 8.0 (7 ml de TRIS 1M + 25 ml de KCN 4 mg/ml + 700-800 ml de agua destilada, pH 8.0 ajustado con HCL 3 N y aforar a 1000 ml con agua destilada), la resina diluída en este amortiguador 1:10 v/v se empa en pipetas Pasteur hasta una altura de 4 cm, se pasan 5 ml del amortiguador para equilibrar la columna. Una gota del hemolizado se mezcla con 5 gotas del amortiguador pH 8.0 y se coloca en la parte superior de la resina; una vez que la Hb entró en la resina, se llena la parte superior de la pipeta con la solución tampon pH 8.0. La Hb A<sub>2</sub> se eluye con un amortiguador pH 7.4 (7 ml de TRIS 1 M + 25 ml de KCN 4 mg/ml + 700-800 ml de agua destilada, el pH se ajusta a 7.4 con HCL 3 N y se afora a 1000 ml con agua destilada). La Hb restante se eluye con un amortiguador pH 7.0 (50 ml de TRIS 1 M + 25 ml de KCN 4 mg/ml + 700-800 ml de agua destilada. El pH 7.0 se ajusta con HCL 3 N y se afora a 1000 ml con agua destilada). Los eluidos de la Hb A<sub>2</sub> y de la Hb restante se aforan a 5 ml y 25 ml respectivamente con sus soluciones amortiguadoras correspondientes.

La densidad óptica se mide a 415 nanómetros y el porcentaje de Hb A<sub>2</sub> se obtiene de la fórmula:

$$\text{Hb A}_2 = \frac{\text{D.O. Hb A}_2}{\text{D.O. Hb A}_2 + (5 \times \text{D.O. Hb R})} \times 100$$

Hb R = Hb restante

#### E. Elución Ácida para Eritrocitos con Hb F (5)

Los frotis sanguíneos delgados, se preparan diluyendo la sangre 1:3 con solución salina, se dejan secar al aire por 30 minutos y en seguida se fijan con etanol 80% por 5 minutos, se enjuagan y se permite que sequen al aire. Se mezclan 37.7 ml de ácido cítrico 0.1 M con 13.8 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M, el pH se ajusta a 3.3 con estas soluciones. La mezcla se lleva a 37°C y se sumergen las laminillas por 5 minutos, se lavan y se secan al aire, en seguida se tiñen con hematoxilina de Ehrlich por un minuto, lavar y teñir con Eosina B al 0.1% durante 2 minutos, lavar con agua destilada y secar al aire. Con esta técnica los estromas se ven pálidos y las células con Hb F se observan teñidas con Eosina. Las preparaciones se hicieron por duplicado y el conteo de las Células F se hizo tomando el promedio por campo de las células totales presentes en 5 campos por laminilla (al azar) con el objetivo de 40 X, después se aplicó una delgada capa de aceite de inmersión para hacer más evidentes las células teñidas (células F), y se contó el número de ellas en 30 campos, el porcentaje se-

calculó con la fórmula:

$$\text{Células F} = \frac{\text{Células teñidas X 100}}{30 \text{ X promedio de células totales por campo}}$$

F. Electroforesis de Hemoglobinas a pH 8.6 (71).

Se preparó una solución madre consistente en: TRIS 54.5 g, EDTA 2.92 g, ácido bórico 15.44 g, agregar agua destilada hasta 400 ml, ajustar el pH a 8.6 con ácido cítrico 10% y añadir a 500 ml con agua destilada. El gel se preparó con agarosa (Tipo I low EEO, Sigma Chemical Co.) al 1% en solución madre diluida 1:30 con agua destilada, y calentando en baño en ebullición hasta disolverse la agarosa. Los amortiguadores de corrimiento fueron: para el cátodo solución madre diluida 1:7 y para el ánodo solución madre diluida 1:3.5; la electroforesis se efectuó a 300 V (40 mA) por 120 minutos. El gel se tiñó con una solución de orto-tolidina (orto-tolidina 2% en ácido acético glacial) diluida 1:5 con agua destilada, más 2 gotas de peróxido de hidrógeno y se lava con agua corriente.

G. Factores Discriminativos (72).

Estos factores relacionan eritrocitos, Hb, hematocrito y volumen globular medio; con estos datos y los de Hb A<sub>2</sub> es posible detectar un portador de talasemia. Las fórmulas son las siguientes:



$$CE > 5 \times 10^6 = +$$

$$VGM - (Hb \times 5) - CE \ 8.4 < 1 = +$$

$$VGM/CE < 13.2 = +$$

$$HCM/CE < 3.8 = +$$

$$(VGM)^2 \times HCM \times 0.01 < 1540 = +$$

CE = Cuenta Eritrocitaria

VGM = Volumen Globular Medio

HCM = Hb Corpuscular Media

Si algún individuo presenta todos estos datos positivos y además valores de Hb A<sub>2</sub> por encima de 3.5%, es probable que este sujeto sea portador de un gen talasémico.

#### H. Análisis Estadístico.

Los resultados encontrados en ambos grupos fueron sometidos a los siguientes estudios estadísticos: se determinó la media ( $\bar{X}$ ), la desviación estandar (s), y se utilizó la prueba "t" de Student para determinar las diferencias y la significancia estadística entre los grupos. Además se efectuó la correlación entre Células F y Hb F.

**CAPITULO VIII**  
**RESULTADOS Y DISCUSION**

## RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de detectar alguna alteración de la Hb (variante estructural o portadores de genes talasémicos), que pudiera interferir en los resultados, se realizaron corrimientos electroforéticos en agarosa a pH 8.6 de todos los hemolizados y se aplicaron los factores discriminativos, que relacionan eritrocitos, Hb, volumen globular medio y hematocrito, para descartar la presencia de portadores talasémicos. Con estas metodologías no se encontraron formas alternas ni patologías de las globinas en los individuos estudiados.

Los resultados obtenidos del grupo de los pacientes con Neoplasias (I) y de la población normal (II) para Hb F, Células F, Hb A<sub>2</sub>, Eritrocitos, Hb Total, Hematocrito, Volumen Globular Medio, Hb Corpuscular Media y Concentración Media de Hb, se muestran en la Tabla I, en la que quedan incluidas las comparaciones estadísticas entre ambas poblaciones; como puede observarse entre las poblaciones I y II, existen diferencias significativas para todos los valores analizados, excepto para Hb A<sub>2</sub>, VGM y HCM.

En la Figura 1 se encuentran representados los valores individuales para Hb F por los métodos de Singer y de Betke, y los porcentajes de Células F. En el grupo I se obtuvieron valores de Hb F por el método de Singer que variaron entre 0.14 y 3.64%, la media ( $\bar{X}$ ) fue de 1.32% y la desviación estándar

dar (s) de 0.60%. Por el método de Betke la  $\bar{X}$  fue de 0.88% - con una s de 0.70%, oscilando los porcentajes entre 0.05 y - 3.38%. La  $\bar{X}$  de las Células F fue de 0.35% y la s de 0.38. La  $\bar{X}$  para Hb A<sub>2</sub> fue de 2.48% y la s de 0.64%. En el grupo II - los valores de Hb F por el método de Singer variaron entre - 0.30 y 1.51% con una  $\bar{X}$  de 0.68% y una s de 0.25%, mientras - que por el método de Betke los valores oscilaron entre 0.21 y 0.85%, siendo la  $\bar{X}$  de 0.51% con una s de 0.17%. Las Células-F presentaron una  $\bar{X}$  de 0.11% siendo la s de 0.06%, los valo-- res oscilaron de 0.09 a 0.18%. La  $\bar{X}$  de la Hb A<sub>2</sub> fue de 2.75% con una s de 0.52%.

Cuando se compararon las poblaciones I y II con el 95% de confianza ( $\bar{X} + 2s$ ) por el método de Betke, el 37.37% de la población I mostró Hb F elevada; por el método de Singer fue del 52% y para las Células F el 47.36%. Estos valores difieren de los reportados por Olivares-Esquer y cols. (73), quienes encontraron que el 86.7% de los pacientes con Neoplasias presentaron niveles de Hb F por encima de 2s de su población normal, si bien su población Neoplásica no estaba en tratamiento, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con o sin tratamiento, aún al compararlos por separado contra la población normal, excepto por el método de Betke para el grupo IB (Tabla II), lo - - cual pudiese ser interpretado como: una menor capacidad discriminativa del método; que la muestra sin tratamiento es pequeña; que diez de los pacientes sin tratamiento pertenecen a

los subgrupos de valores más bajos (Linfomas y CA Diversos), o bien a que estén implicadas las tres causas.

Para saber si el incremento de Hb F en el grupo I corresponde al incremento de las Células F, se buscó la correlación entre ambos parámetros por los dos métodos estudiados y se encontró que existe una correlación positiva y significativa - - (Betke,  $n=95$ ,  $r=0.4680$ ,  $p<0.001$ ; Singer,  $n=93$ ,  $r=0.4190$ , - -  $p<0.001$ ), mientras que en la población II no existe correlación, de acuerdo con lo reportado en la literatura (6), la ausencia de correlación se explica porque hay una muy pequeña proporción de Hb A que no se desnaturaliza y puede ser considerada como Hb F, este hecho justifica la utilización de dos métodos para determinar el porcentaje de Hb F.

Por otra parte el grupo I fue dividido en cinco subgrupos (Leucemias, Linfomas, CA Diversos, CA Mamarios y Varios), para investigar si alguno de ellos en particular mostraba los niveles más elevados de Hb F. El quinto subgrupo no fué considerado por tratarse solo de tres casos que ingresaron con diagnóstico presunto de una Neoplasia y cuyo diagnóstico final no correspondió a tal. En la Tabla III y en la Fig. 2 puede observarse que los niveles de Hb F son más elevados por ambos métodos en los subgrupos de Leucemias y CA Mamarios, esta elevación en Leucemias ya ha sido descrita en la literatura (38, 39, 40, 41, 42), sin embargo, a nuestro conocimiento es la primera vez que se reporta Hb F incrementada en pacientes con CA-

Mamario. En estos subgrupos se encontró que por el método de Betke se establecen diferencias significativas únicamente con Leucemias y CA Mamarios, y la población Normal, a diferencia de los métodos de Singer y Células F por los cuales los cuatro subgrupos son diferentes estadísticamente de la población II. Esto supone por un lado la mayor sensibilidad del método de Singer para diferenciar las poblaciones I y II, y por otro la capacidad del método de Betke para detectar pequeños incrementos.

Por el método de Betke, el 55.55% y el 48.14% de los pacientes con Leucemias y CA Mamarios respectivamente, mostraron incremento de la Hb F mientras que por el método de Singer en los pacientes con Leucemias se observó incremento de esta Hb en el 83.33%, con CA Mamario en el 55.55%, con Linfomas en el 41.66%, con CA Diversos en el 37.5%, lo que apoya la mayor capacidad del segundo método para detectar niveles elevados de Hb F en estos pacientes; estos porcentajes indican además que en los dos primeros subgrupos, el incremento global observado es representativo de estas subpoblaciones.

Ya que se demostró que no existen diferencias significativas en el grupo I entre los pacientes con y sin tratamiento en los valores de Hb F el incremento puede ser explicado por lo menos por dos causas: a) Por la Neoplasia en sí o b) porque estos pacientes están sometidos a un estres eritropoyético que se refleja en los valores de los parámetros hematológicos

cos, (Tabla I). En la Fig. 3, se encuentran representados por subgrupos tres de los parámetros hematológicos que fueron estadísticamente significativos entre los grupos I y II. Al comparar las Fig. 2 y 3 se aprecia que los valores de E, Hb y Hto son más bajos en los subgrupos de Leucemias y Linfomas, mientras que los valores de Hb F son más altos en los subgrupos de Leucemias y CA Mamarios, adicionalmente estos subgrupos difieren significativamente en cuanto a E, Hb y Hto, lo que sugiere que no existe una relación entre el incremento en la Hb F y los bajos valores de estos parámetros. En apoyo a esto, al analizar al grupo total se encontró que no existe correlación significativa entre Hb, Hto, CMHb y Hb F; en cuanto a los eritrocitos los resultados no son claros ya que cuando se analiza el grupo total se observa una r negativa y significativa, mientras que si se excluye al subgrupo de Leucemias desaparece dicha correlación, este subgrupo individualmente no muestra correlación significativa. Es posible explicar la disminución del número de eritrocitos en las Leucemias, porque esta enfermedad involucra la médula ósea y por consiguiente a la producción de hematíes, no obstante no se encontraron reportes en los que se asocie anemia per se con Hb F elevada. A este respecto compárense en la Tabla IV, los porcentajes de Hb F, Células F y los datos hematológicos de los 5 pacientes que presentaron niveles de Hb F (por los 2 métodos) 2s por arriba de la  $\bar{X}$  de la población I. Es interesante notar que 2 de los 5 casos correspon

den a CA Mamario y 2 a Leucemias en quienes, a diferencia de los primeros, presentan un bajo nivel de E, Hb y Hto, y sin embargo sus niveles de Hb F son similares; además el caso de Linfoma Medular muestra valores hematológicos normales y no obstante su porcentaje de Hb F es elevado.

Estos datos en conjunto sugieren que la elevación de Hb F en estos pacientes con Neoplasias se debe a la presencia de componentes de las células neoplásicas muy probablemente difusibles ya que por lo menos en el subgrupo de los CA Mamarios están involucrados tumores sólidos, sin relación aparente con la eritropoyesis y la síntesis de Hbs. La interacción de estos componentes o factores con los mecanismos de activación de los genes gamma se desconoce, sin embargo podrían considerarse algunas posibilidades, como una activación directa o indirecta sobre la región promotora de los genes, un efecto modulador en la diferenciación eritroide que permita un incremento en las Células F o bien una acción - - inhibitoria selectiva de las enzimas proteolíticas para Hb F que incrementen la sobrevida de esta Hb.

Se ha reportado que las células neoplásicas muestran alteraciones en la secreción y la permeabilidad (16), así como en la síntesis y liberación de proteínas y hormonas que la célula normal no produce, algunas de las sustancias mejor conocidas incluyen alfa-1-fetoproteína, gonadotropina coriónica y algunos antígenos (de Gold y Gamma FP) (11, 74, 75), de



ellas los niveles de gonadotropina coriónica se han encontrado correlacionados con el nivel de Hb F durante el embarazo (50), sin embargo la administración de esta hormona en el adulto no induce un aumento en la Hb F (76), lo que permite suponer la participación de factores fetales en la reactivación de los genes gamma en el embarazo. Las células de los tejidos fetales y las células neoplásicas comparten algunas características, como la alta tasa de reproducción celular, la relativa indiferenciación y la expresión de proto-oncogenes, este último fenómeno reportado en ratones (58), así los factores que cruzan la barrera placentaria e incrementan los niveles de Hb F materna y los factores difusibles producidos por algunas células neoplásicas, probablemente son similares.

T A B L A I

VALORES PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR ( $\bar{X}$ , s) DE LAS HEMOGLOBINAS Y DE LOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS DE LAS POBLACIONES CON NEOPLASIA (I) Y NORMAL (II).

Grupo	Hb F % Betke	Hb F % Singer	CF %	Hb A <sub>2</sub> %	E $\times 10^6 / \mu l$	Hb g/dl	Hto %	VGM $\mu^3$	HCM pg	CMHb %	
	$\bar{X}$	0.88	1.32	0.35	2.48	4.08	12.12	37.13	90.78	29.82	32.68
I	s	0.70	0.60	0.38	0.64	0.75	2.07	8.00	8.00	2.86	1.21
	n	99	100	95	97	84	91	83	83	82	91
	$\bar{X}$	0.51	0.68	0.11	2.75	5.06	13.46	46.14	91.66	30.5	33.55
II	s	0.17	0.25	0.06	0.52	0.44	1.54	3.80	3.80	1.36	1.04
	n	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
	Vp	<0.02	<0.001	<0.01	N S	<0.001	<0.001	<0.001	N S	N S	<0.01

C.F. = Células F; E = Eritrocitos; Hb = Hb total; Hto = Hematocrito; VGM = Volumen globular medio; HCM = Hb corpuscular media; CMHb = Concentración media de Hb; Vp = Valores de p para las diferencias entre los promedios (t-Student) y N S = No Significativo.

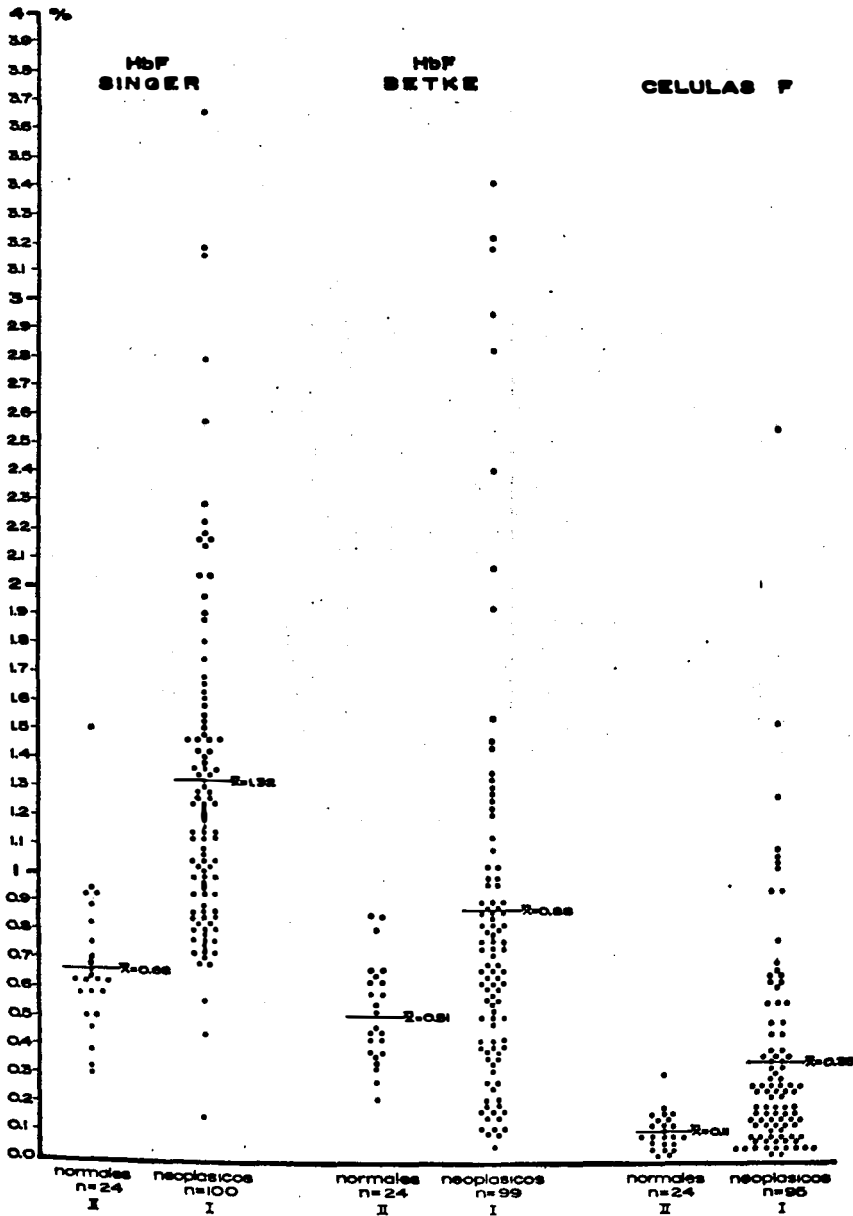


Figura 1. Hb F y Células F en las poblaciones normal y neoplásica.

T A B L A I I

VALORES PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR DE HbF (METODOS DE BETKE Y SINGER) Y CELULAS F DE LAS POBLACIONES CON NEOPLASIA Y NORMAL: VALORES DE  $p$  PARA LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PROMEDIOS POR GRUPOS (t-Student).

Grupo	Betke			Singer			Células F		
	$\bar{X}$	s	n	$\bar{X}$	s	n	$\bar{X}$	s	n
I	0.88	0.70	99	1.32	0.60	100	0.35	0.38	95
II	0.51	0.17	24	0.68	0.25	24	0.11	0.06	24
IA	0.98	0.77	73	1.38	0.64	74	0.39	0.42	72
IB	0.64	0.33	20	1.14	0.32	20	0.22	0.18	18
I vs II	<0.02			<0.001			<0.01		
IA vs IB	NS			NS			NS		
IA vs II	<0.01			<0.001			<0.01		
IB vs II	NS			<0.001			<0.02		

IA = Pacientes en tratamiento; IB = Pacientes sin tratamiento y NS = No Significativo.

T A B L A I I I

VALORES PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR PARA Hb F POR LOS METODOS DE BETKE Y SINGER, Y CELULAS F EN LOS GRUPOS DE NEOPLASIAS ESTUDIADOS.

		LEUCEMIAS	LINFOMAS	CA DIVERSOS	CA MAMARIOS
Hb F Betke %	$\bar{X}$	1.26	0.63	0.70	1.04
	s	0.84	0.46	0.57	0.81
	n	18	23	24	27
Hb F Singer %	$\bar{X}$	1.65	1.23	1.09	1.37
	s	0.68	0.56	0.32	0.65
	n	18	23	25	27
Células F %	$\bar{X}$	0.66	0.26	0.25	0.33
	s	0.62	0.18	0.23	0.38
	n	17	19	27	25

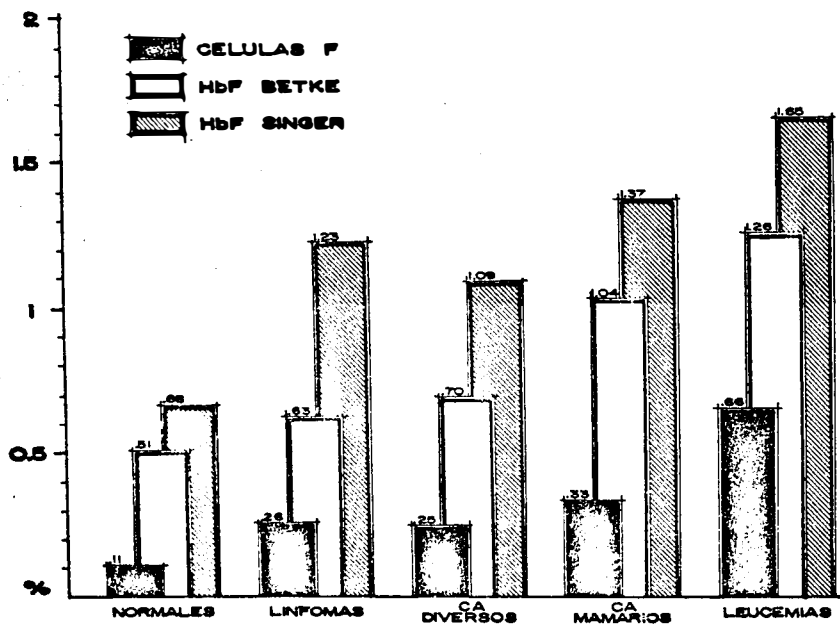


Figura 2. Histogramas de los promedios de Hb F y Células F en -- los subgrupos de neoplasias y en la población normal.

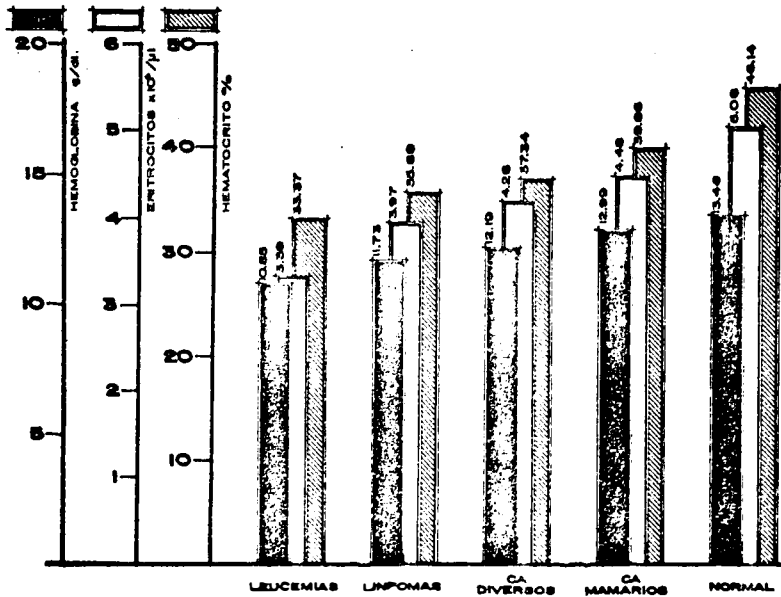


Figura 3. Histogramas de los promedios de Hemoglobina Total, Eritrocitos y Hematocrito de los subgrupos de neoplasias estudiadas y de la poblacion normal.

T A B L A I V

VALORES HEMATOLOGICOS DE LOS PACIENTES CON HbF POR ARRIBA DE 2s DE LA  $\bar{x}$  DE LA POBLACION I

C A S O	1	2	3	4	5
DIAGNOSTICO	LCG	LAL	LM	CAM	CAM
Hb F (8) %	2.70	3.52	2.40	3.23	2.81
Hb F (S) %	3.28	2.84	2.78	3.64	2.76
CF %	2.54	1.32	----	0.60	1.52
E x10 <sup>6</sup> /μl	3.21	2.72	4.21	4.12	3.88
Hb g/dl	10.50	10.00	14.40	12.60	12.8 :
Hto %	32.1	30.4	42.3	38.8	38.1
GMHG %	32.8	32.8	34.3	32.0	33.5

LGC= Leucemia Granulocítica Crónica, LAL= Leucemia Aguda Linfocítica,  
LM= Linfoma Medular, CAM= CA Mamario.



**CAPITULO IX**  
**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. A nuestro conocimiento, es el primer reporte de Hb F elevada en pacientes con CA Mamario.
2. La población I es diferente de la población II para Hb F ( $I > II$ ; por los métodos de Betke y Singer), Células F ( $I > II$ ), eritrocitos, Hb, Hto, y CMHb ( $I < II$ ), pero no en cuanto a Hb A<sub>2</sub>, VGM y HCM.
3. La elevación de Hb F en la población I es independiente del tratamiento.
4. La disminución de eritrocitos, Hb, Hto y CMHb es independiente del tratamiento.
5. No se encontró correlación entre Hb, Hto, CMHb y Hb F en el grupo I.
6. Existe una correlación positiva y significativa entre Hb F por los dos métodos, y Células F para la población I, mientras que en la población II no existe correlación, de acuerdo con lo reportado.
7. El método de Singer discrimina significativamente la población normal de la población neoplásica, aún por subgrupos. El método de Betke discrimina significativamente la población I total de la población Normal, pero en subgrupos solo discrimina Leucemias y CA Mamarios de la Normal.
8. El nivel de Hb F podría usarse como elemento de sospecha de una neoplasia, una vez que se descarte algún trastor-

no de la Hb.

9. Los resultados de este trabajo apoyan la existencia de factores derivados de las células neoplásicas que inducen la elevación de Hb F en los pacientes con estos padecimientos.

**CAPITULO X**  
**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA.

1. Bunn HF, Forget BG, Ranney HM.  
HUMAN HEMOGLOBINS.  
W.B. Saunders Company, Ontario Canada. 1977.
2. Dickerson RE, Geis I.  
HEMOGLOBIN, Structure, Function, Evolution, and Pathology.  
The Benjamin/Cummings Publishing Company, California, USA. 1983.
3. White AP, Handler P, Smith EL, Stetten D Jr.  
PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA 2da. Edición.  
Mc Graw-Hill, Madrid España. 1964. pp 683-689.
4. Barnes RD.  
ZOOLOGIA DE LOS INVERTEBRADOS. 3ra. Edición.  
Editorial Interamericana, México. 1977.
5. Kleihauer E, Braun H, Betke K.  
Demonstration von fetalem Hämoglobin den Erythrocyten eines Blutausschritchs.  
Klin Wschr. 35 (12): 637. 1957.  
En: Huisman, Jonxis. The Hemoglobinopaties Techniques of identification. Marcell Dekker Inc. New York. 1977.
6. Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE.  
F-Cells in the Adult: Normal Values and Levels in Individuals With Hereditary and Acquired Elevations of Hb F.  
Blood 46 (5): 671. 1975.
7. Mc Kusik VA.  
Human Gene Map 1986.  
Comunicación Personal.
8. Karlsson S, Nienhuis AW.  
Developmental Regulation of Human Globin Genes.  
Ann. Rev. Biochem. 54: 1071. 1985.
9. Efstratiadis A, et. al.  
The Structure and Evolution of the Human  $\beta$ -Globin Gene Family.  
Cell. 21: 653. 1980.
10. Hardison RC, Swada I, Cheng JF, James Shen CK, Schmid CW.  
A Previously Undetected Pseudogene in the Human Alpha Globin Gene Cluster.  
Nucl. Acid. Res. 14 (4): 1986.

11. Bowman WC, Rand MJ.  
FARMACOLOGIA. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. 2da. Edición.  
Editorial Interamericana. México. 1984.
12. Peschle C, Mavilio F, Care A, et. al.  
Haemoglobin Switching in Human Embryos: Asynchrony of  $\zeta \rightarrow \alpha$  and  $\epsilon \rightarrow \gamma$ -Globin Switches in Primitive and Definitive Erythropoietic Lineage.  
Nature. 313: 235.1985.
13. Gehring JW.  
Base Molecular del Desarrollo.  
Investigación y Ciencia. 111: 124. 1985.
14. Lewis B.  
GENES  
John Wiley & Sons Inc. New York. USA. 1983.
15. Jacob F. Monod J,  
Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins.  
J. Mol. Biol. 3: 318. 1961.
16. De Robertis. De Robertis (h)  
BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR. 10ma. Edición.  
Editorial El Ateneo. Buenos Aires Argentina. 1982.
17. Browder LW.  
DEVELOPMENTAL BIOLOGY.  
Saunders College. Philadelphia. USA. 1980.
18. Wood WG, Weatherall DJ.  
Developmental Genetics of the Human Hemoglobins.  
Biochem J. 215: 1. 1983.
19. Breatnach R. Chambon P.  
Organization and Expression of Eucariotic Split Genes Coding for Proteins.  
Ann. Rev. Biochem. 50: 349. 1981.
20. Orkin SH, Haig HK Jr.  
The Mutation and Polymorphism of the Human  $\beta$  Globin Gene and its Surrounding DNA.  
Ann. Rev. Biochem. 18: 131. 1984.
21. De Simone J, Heller P, Hall L, Zwiers D.  
5-Azacitidine Stimulates Fetal Hemoglobin Synthesis in Anemic Babies.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:4428. 1982.

22. Charache S, Dover G, Conover-Talbot C, Moyer M, Boyer S. Treatment of Sickle Cell Anemia with 5-Azacitidine Results in Increased Fetal Hemoglobin Production and is Associated with Non Random Hypomethylation of DNA Around the  $\gamma$ - $\delta$ - $\beta$  Gene Complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4842. 1983.
23. Papayannopoulou Th, Kurachi S, Nakamoto B, Zanjani ED, Stamatoyannopoulos G. Hemoglobin Switch in Culture: Evidence for a Humoral Factor that Induces Switching in Adult and Neonatal but not Fetal Erythroid Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6579. 1982.
24. Stamatoyannopoulos G, Nakamoto B, Kurachi S, Papayannopoulou Th. Direct Evidence for Interaction Between Human Erythroid Progenitor Cells and a Hemoglobin Switching Activity Present in Fetal Sheep Serum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5650. 1983.
25. Papayannopoulou Th, Tatsis B, Kurachi S, Nakamoto B, Stamatoyannopoulos G. A Hemoglobin Switching Activity Modulates Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin. Nature 309 (3): 71. 1984.
26. Vainchenker W, Testa U, Dubart A, Benzard J, Breton-G, Rosa J. Acceleration of the Hemoglobin Switch in Cultures of Neonate Erythroid Precursors by Adult Cells. Blood 56 (3): 541. 1980.
27. Zanjani ED, McGlobe PB, Bhakthavasthsalan A, Stamatoyannopoulos G. Sheep Fetal Hematopoietic Cells Produce Adult Hemoglobin when Transplanted in the Adult Animal. Nature 280: 495. 1979.
28. Stamatoyannopoulos G, Kurnit DM, Papayannopoulou Th. Stochastic Expression of Fetal Hemoglobin in Adult Erythroid Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 (11): 7005. 1981.
29. Dover GJ, Boyer SH. Quantitation of Hemoglobins Within Individuals Red Cells: Asynchronous Biosynthesis of Fetal and Adult Hemoglobin During Erythroid Maturation in Normal Subjects. Blood 56 (6): 1082. 1980.

30. Torrealba de Ron AT, Papayannopoulou Th, Knapp MS, Feng-Ruen Fu M, Knitter G, Stamatoyannopoulos G. Perturbations in the Erythroid Marrow Progenitor Cell Pools May Play a Role in the Augmentation of Hb F by 5-Azacitidine. *Blood* 63 (1): 201. 1984.
31. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HJ. MICROBIOLOGY 3rd Edition  
Harper & Row USA 1980. Cap. 51 pp 1013.
32. Letvin NL, Linch DC, Beardsley GP, McIntyre KW, Natham DG. Augmentation of Fetal Hemoglobin Production in Anemic Monkeys by Hydroxyurea. *New Engl. J. Med* 310 (14): 869. 1984.
33. Papayannopoulou Th, Torrealba de Ron A, Veith R. Arabinocylcytosine Induces Fetal Hemoglobin in Baboons by Perturbing Erythroid Cell Differentiation Kinetics. *Science* 224: 617. 1984.
34. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea Enhances Fetal Hemoglobin Production in Sickle Cell Anemia, *J. Clin Invest.* 74: 652. 1984.
35. Veith R, Galanello R, Papayannopoulou Th, Stamatoyannopoulos G. Stimulation of F-Cell Production in Patients with Sickle Cell Anemia Treated with Cytarabine or Hydroxyurea. *New Engl. J. Med.* 313 (25): 1571. 1985.
36. Raghavendra RA, Brown AK, Rieder RF, Clegg JB, Marsh WL. Aplastic Anemia with Fetallike Erythropoiesis Following Androgen Therapy. *Blood* 51 (4): 711. 1978.
37. Datta MC  
Prostaglandin E<sub>2</sub> Mediated Effects on the Synthesis of Fetal and Adult Hemoglobin in Blood Erythroid Bursts. *Prostaglandins* 29 (4): 561. 1985.
38. Weatherall DJ, Clegg JB, Wood WG, Callender ST. Foetal Erythropoiesis in Human Leukemia. *Nature* 257: 710. 1975.



39. Pagnier J, Lopez M, Mathiot C, Habibi B, Zamet P, Varet B, Labie D.  
An Unusual Case of Leukemia with High Fetal Hemoglobin: Demonstration of Abnormal Hemoglobin Synthesis Localized in a Red Cell Clone.  
Blood 50 (2): 249. 1977.
40. Maurer SH, Vida LN, Hoing GR.  
Similarities of the Erythrocytes in Juvenile Chronic Myelogenous Leukemia to Fetal Erythrocytes.  
Blood 39 (6): 778. 1972.
41. Horton BF, Chernoff AI, Meadows RW.  
The Hemoglobin Profile and Erythroleukemia.  
Cancer 26: 904. 1970.
42. Krauss JS, Rodriguez AR, Milner PF  
Erythroleukemia with High Fetal Hemoglobin After Therapy for Ovarian Carcinoma.  
Am. J. Clin. Path 75 (5): 721. 1981.
43. Müderrisoglu C, Kansu E, Akdas A, Laleli Y, Pirat D.  
Haemoglobin-F Levels in Urogenital Cancers.  
Br. J. Urol. 55: 264. 1983.
44. De Simone J, Biel M, Heller P.  
Maintenance of Fetal Hemoglobin (HB F) Elevations in the Baboon by Prolonged Erythropoietic Stress.  
Blood 60 (2): 519. 1982.
45. De Simone J, Heller P, Adams JG.  
Hemopoietic Stress and Fetal Hemoglobin Synthesis: Comparative Studies in Vivo and in Vitro.  
Blood 54 (5): 1176. 1979.
46. Davidson RJ, How J, Bewsher PD, Wood WG.  
Foetal Haemoglobin in Patients with Thyroid Disorders.  
Scand. J. Haemtol. 27: 130. 1981.
47. Rochant H, Dreyfus B, Bouguerra M, Tont-Hat H.  
Refractory Anemias, Preleukemic Conditions and Fetal Erythropoiesis.  
Blood 39 (5): 721. 1972.
48. Papayannopoulou Th, Vichinsky E, Stamatoyannopoulos G.  
Fetal Hb Production During Acute Erythroid Expansion. I Observations in Patients with transient Erythroblastopenia and Post-Phlebotomy.  
Br. J. Haemtol. 44: 535. 1980.

49. Popat N, Weatherall DJ, Wood WG, Turnbull AC.  
Patterns of Maternal F-Cell Production During  
Pregnancy.  
The Lancet 2: 377. 1977.
50. Lee JC, Hayashi RH, Shepard MK.  
Fetal Hemoglobin in Women with normal and with Hidatiform  
Molar Pregnancy.  
Am. J. Hematol. 13: 131. 1982.
51. Bishop JM.  
Oncogenes  
Investigación y Ciencia 68: 52. 1982.
52. Weinberg RA.  
Base Molecular del Cáncer  
Investigación y Ciencia 97: 48. 1984.
53. Hunter T.  
Proteínas de Oncogenes  
Investigación y Ciencia 88: 48. 1984.
54. Robbins KC, Antoniades HN, Devare SG, Hunkapiller MW,  
Haronson SA.  
Structural and Immunological Similarities Between Simian  
Sarcoma Virus Gene Product and Human Platelet-Derived  
Growth Factor.  
Nature 305: 605. 1983.
55. Henrik-Heldin C, Westermark B.  
Growth Factors: Mechanism of Action and Relation to  
Oncogenes  
Cell 37: 9. 1984.
56. Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Verma IM.  
Platelet-Derived Growth Factor Induces Rapid but  
Transient Expression of the c-fos gene and Protein.  
Nature 312: 711. 1984.
57. Müller R, Bravo R, Burckardt J, Curran T.  
Induction of c-fos Gene and Protein by Growth Factors  
Precedes Activation of c-myc.  
Nature 312: 716. 1984.
58. Müller R, Salmon DJ, Tremblay JM, Cline MJ, Verma IM.  
Differential Expression of Cellular Oncogenes During  
Pre and Postnatal Development of the Mouse.  
Nature 299: 640. 1982.

59. Goyette M, Petropoulos CJ, Shank PR, Fausto N.  
Expression of a Cellular Oncogene During Liver Regeneration.  
Science 219: 510. 1983.
60. Tabin CJ, Bradley SM, Bargman CI, Weinberg RA, et al.  
Mechanism of Activation of a Human Oncogene.  
Nature 300: 143. 1982.
61. Premkumar RE, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M.  
A Point Mutation is Responsible for the Acquisition of Transforming Properties by the t24 Bladder Carcinoma Oncogene.  
Nature 300: 149. 1982.
62. Land H, Parada LF, Weinberg RA.  
Cellular Oncogenes and Multistep Carcinogenesis.  
Science 222: 771. 1983.
63. Eva A, Robbins KC, Andersen PR, et al.  
Cellular Genes Analogous to Retroviral Onc-Genes are Transcribed in Human Tumour Cells.  
Nature 295: 116. 1982.
64. McClain KL.  
Expression of Oncogenes in Human Leukemias.  
Cancer Res. 44: 5382. 1984.
65. Barbacid M.  
Oncogenesis y Biopoyesis. En BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR,  
Temas de Actualidad para Graduados. Ochoa S,  
Leloir LF, Oró J, Sols A. Editores.  
Salvat Editores SA, Barcelona España 1986. pp 537.
66. Slamon DJ, de Kernion JB, Verma IM,  
Expression of Cellular Oncogenes in Human Malignancies.  
Science 224: 256. 1984.
67. Yunis JJ.  
The Chromosomal Basis of Human Neoplasia.  
Science 221: 227. 1983.
68. Betke K, Marti HR, Schlicht I.  
Estimation of Small Percentages of Foetal Haemoglobin.  
Nature 184: 1877. 1959.  
En: Villegas A, Alvarez-Salas JL, Martínez R.  
Método Recomendado por el ICSH para la Determinación de la Hemoglobina Fetal.  
Sangre 28 (6) 796. 1983.

69. Singer K, Chernoff AI, Singer L.  
Studies on Abnormal Hemoglobins. Their Demonstration in Sickle Cell Anemia and Other Hematological Disorders by Means of Alkali Denaturation.  
Blood 6: 413. 1951.  
En: Basic Laboratory Methods of Hemoglobinopathy Detection. US Department of Health, Education and Welfare, 6th Edition.  
Public Health Service, Center for Diseases Control, Atlanta, Georgia. 1976.
70. Efremov GD, Huisman THJ, Bowman K, Wrightstone RN, Schoeder NA.  
Microchromatography of Hemoglobins. II A Rapid Microchromatographic Method for the Determination of Hemoglobin A<sub>2</sub>.  
J. Lab. Clin. Med. 83: 657. 1974.  
En: Basic Laboratory Methods of Hemoglobinopathy Detection. US Department of Health, Education and Welfare, 6th Edition.  
Public Health Service, Center for Diseases Control, Atlanta, Georgia, 1976.
71. Vaca G, Ibarra B, Hernández A, et. al.  
Glucose 6-Phosphate dehydrogenase deficiency and abnormal hemoglobins in mexican newborns with jaundice.  
Rev. Invest. Clin. (Mex) 33: 259, 1981.
72. Johnson CS, Tegos C, Beutler E.  
Thalassemia Minor: Routine Erythrocyte Measurements and Differentiation from Iron Deficiency.  
Am. J. Pathol. 80: 31. 1983.
73. Olivares-Esquer JJ, Ortiz-Lazcano S, Aguirre-Gas H, Cervantes-Osorio LF, González-Llaven J.  
Elevación de la Hemoglobina Fetal en Padecimientos Neoplásicos.  
Arch. Invest. Med. 6 (2): 413. 1975.
74. Perez Tamayo Ruy.  
INTRODUCCION A LA PATOLOGIA.  
Instituto Nal. de la Nutrición  
Ed. Melo. México D.F. 1983. Cap. 11 pp 335.
75. Currie GA.  
EL CANCER Y LA RESPUESTA INMUNE  
Editorial El Manual Moderno. México D.F., 1975. Cap. 8  
pp 155-162.

76. Sutnick JI, London WT, Gerstley BJS, Zavatine VE,  
Woodside AM.  
Fetal Hemoglobin and Female Sex Hormones.  
JAMA 206: 1795. 1968.  
Citado en: Ref. 50



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Facultad de Ciencias

Expediente .....

Número ..... 546/85

Sr. Juan Carlos Becerra Figueroa  
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -  
aprobado el tema de tesis "Detección de factores humorales-  
que favorezcan el cambio de hemoglobina adulta a hemoglobi-  
na fetal en pacientes con Neoplasias" para obtener la Licen-  
ciatura en Biología, con Orientación Biomédica.


Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---  
aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora  
Galindo.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Septiembre 19 de 1985

El Director

  
Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd .

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
Facultad de Ciencias

Expediente .....

Número 1176/86 .....

Sr. Juan Carlos Becerra Figueroa  
P r e s e n t e . -

Por este conducto nos dirigimos a usted para informarle -  
que es aceptado de conformidad el cambio al anteproyecto de tesis ti-  
tulada "Evaluación de la actividad de los genes globínicos gamma en pa-  
cientes con neoplasias" siendo su Director de Tesis el M.en C. Juan Mo-  
ra Galindo.

Sin otro particular, nos es grato reiterar a usted la expresión  
de nuestra consideración más distinguida.



ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Diciembre 2 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

José Manuel Copeland Gurdíel. -

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA, S. R.,  
GUADALAJARA, JAL.

TELEFONOS 17-58-28 Y 17-09-71

Guadalajara, Jal., Diciembre 4 de 1986..

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA  
Director de la Facultad de Ciencias  
Universidad de Guadalajara,  
P r e s e n t e.

Estimado doctor Astengo Osuna:

Por este conducto hago constar que el señor JUAN CARLOS BECERRA FIGUEROA, ha concluido la tesis titulada: EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS GENES GLOBINICOS GAMMA EN PACIENTES CON NEOPLASIAS.

Al mismo tiempo, informo a usted que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad para que se imprima.

Sin otro particular, quedo de usted

Atentamente,

M. EN C. JUAN MORA GALINDO