

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



HEMOGLOBINA FETAL Y RELACION DE CADENAS
GAMMA G Y GAMMA A EN NIÑOS CON LEUCEMIA
LINFOBLASTICA AGUDA LI Y L2

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA

GUADALAJARA, JAL., 1990



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 1530/89

SRITA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA
 P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
 tema de Tesis "HEMOGLOBINA FETAL Y RELACION DE CADENAS GAMA G / GAMA A -
 EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA L1 Y L2" para obtener la Licen-
 ciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado -
 como Director de dicha Tesis el M.en C. Guillermo Pérez García.

A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara, Jal., Noviembre 30 de 1989
 EL DIRECTOR



ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El M.en C. Guillermo Pérez García, Director de Tesis.-Pte.
 c.c.p. El expediente de la alumna.

. 'mjsd

Guadalajara, Jal., Febrero 21 de 1990.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara,
P r e s e n t e .

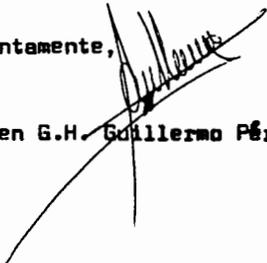
Estimado Ing. Espinoza de los Monteros:

Por este conducto hago constar que la Srta. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA, ha concluido la tesis titulada: "EVALUACION DE HEMOGLOBINAS FETAL Y RELACION DE CADENAS GAMMA G Y GAMMA A EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA L1 Y L2".

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 G.H. Guillermo Pérez García.

A Josué, por supuesto.

A mi Padre, en el otro mundo;
y en este mundo, a mi
Madre y Hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A Bety por su enorme ayuda, a María Eugenia de la -
Mora, Javier Perea, Eva Ochoa, Lupita Ramírez, María de -
Jesús Rivera Madrigal, Socorro de la Torre, Elía Solís, -
Leticia Pérez Solís, Eva Ruiz, Piedad Gutiérrez, Jesús --
Carlos Aguilar Luna, Amparo Esparza, Beatriz López Guido,
Rebeca de la Loza, Martha Galarza, Jorge Cuevas Pulido, -
José Sánchez Corona.

La presente tesis se realizó en la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría de la M. en G.H. Bertha Ibarra Cortés.

I N D I C E

	Pág.:
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES GENERALES	4
II.1 Proteínas respiratorias	5
II.2 Hemoglobinas humanas	12
A. Estructura y función	12
B. Tipos	16
C. Genes globínicos.	18
C.1 Localización y Organización - Cromosómica.	18
C.2 Ontogenia.	27
C.3 Estructura Interna	33
C.4 Expresión y Regulación	37
II.3 Hemoglobina Fetal.	41
A. Aspectos Generales.	41
B. Elevación	42
B.1 Estados no Neoplásicos	43
B.2 Estados Neoplásicos.	44
II.4 Leucemia Linfoblástica Aguda	45
A. Oncogenes	46
B. Hemoglobina Fetal y Relación de Ca- denas γ^E/γ^A	48

	Pág. :
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
IV. OBJETIVOS	52
V. HIPOTESIS.	54
VI. MATERIAL	56
VII. METODOS.	58
VIII. RESULTADOS	66
IX. DISCUSION.	81
X. CONCLUSIONES	86
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

I. INTRODUCCION

La elevación de la Hemoglobina Fetal después de que ha ocurrido la activación-inactivación de los genes globínicos beta y gamma durante la etapa perinatal es un fenómeno ampliamente descrito en enfermedades hereditarias como anemia de células faiciformes (Homocigoto para HbS), - Talasemia alfa, Talasemia beta, Talasemia delta-beta, Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal, y en condiciones no hereditarias como neoplasias; principalmente en Leucemia Mielógena Crónica Juvenil y Eritroleucemias.

La Hemoglobina Fetal formada por dos cadenas alfa y dos gamma ($\alpha_2\gamma_2^G - \alpha_2\gamma_2^A$) se produce predominantemente en un tipo de eritrocitos denominados Células F. Las cadenas globínicas gamma son codificadas por dos genes muy cercanos entre sí, localizados en el grupo de genes globínicos beta, uno denominado gamma G por codificar para Glicina en la posición 136 y el otro denominado gamma A por codificar para Alanina en la misma posición. La expresión de los genes globínicos gamma G y gamma A en el Recién Nacido es de 3:1, mientras que en el adulto la relación se invierte a 2:3.

Se desconocen aún los factores que intervienen en la regulación de los genes globínicos durante la ontogenia, por lo que estudios en neoplasias, que se caracterizan por una diferenciación y proliferación celular diferente, puedan quizás aportar características particulares que ayuden al entendimiento de la expresión de estos genes o-

o en su defecto, al conocimiento de los mecanismos de expresión génica en general.

II. ANTECEDENTES GENERALES

II.1 PROTEINAS RESPIRATORIAS.

Dentro del reino animal existe un amplio rango de diversidad en la estructura y función de proteínas transportadoras de oxígeno. Por tal motivo, aún cuando nuestro tema principal son las hemoglobinas humanas, se realizará - una breve revisión comparativa de las hemoglobinas animales, con el fin de facilitar el mejor entendimiento de - las hemoglobinas.

La variabilidad de las proteínas transportadoras de oxígeno está mediada por las condiciones ambientales y la etapa de desarrollo, como respuesta a los requerimientos fisiológicos y la adaptación ambiental.

Los invertebrados constituyen un grupo muy diverso - en cuanto a estructura y hábitat se refiere, por lo que - es lógico pensar que poseen varios tipos de proteínas respiratorias de acuerdo a su taxonomía.

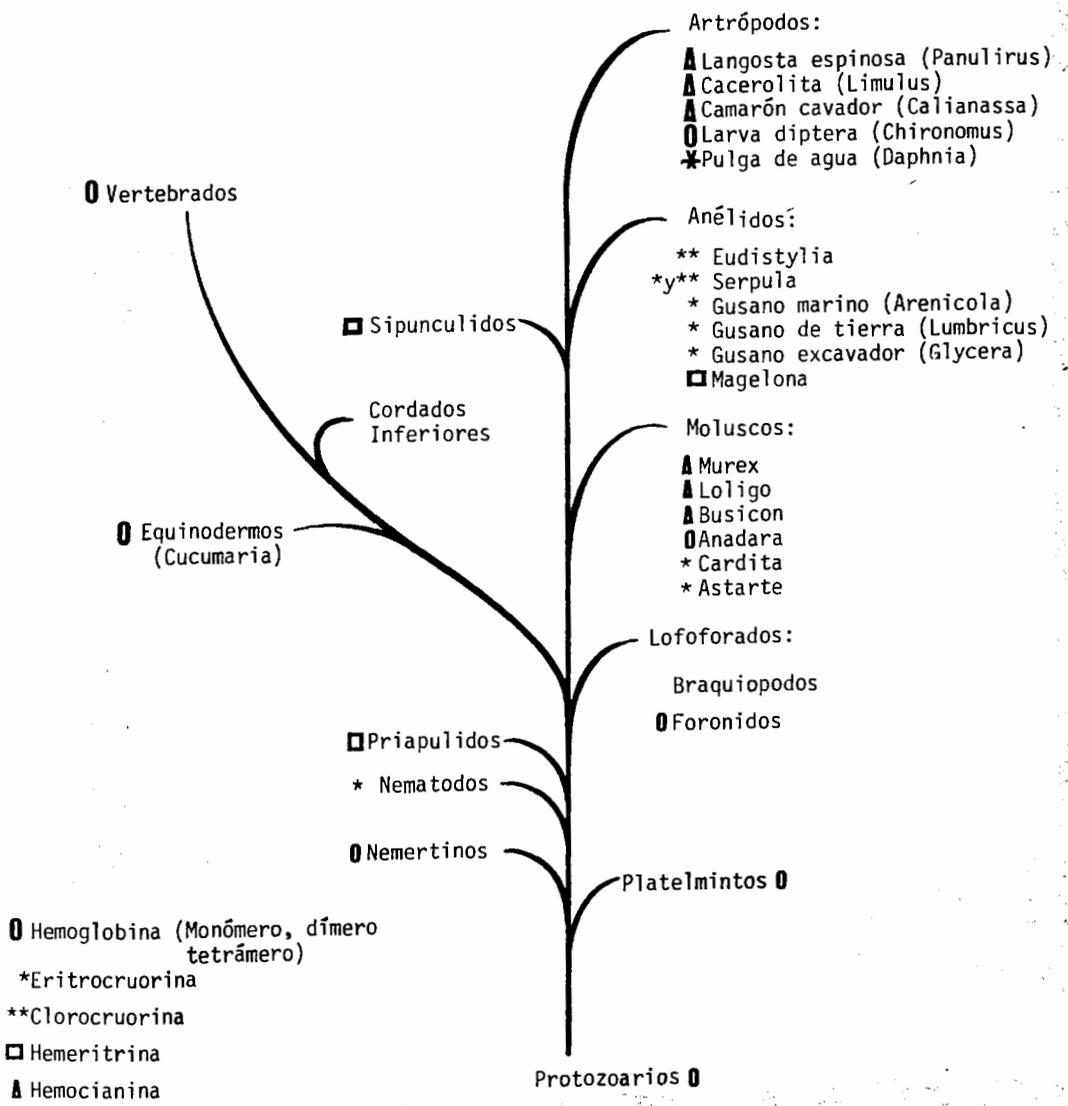
La estructura de las proteínas transportadoras de oxígeno de los invertebrados suele ser compleja y se divide en cuatro tipos de acuerdo al grupo prostético que poseen en: hemeritrina, hemocianina, eritrocruorina y clorocruorina. Todas estas proteínas presentan una marcada variabilidad en el número de subunidades y en el peso (Tabla 1). En general, las proteínas de alto peso molecular (polímeros) con un peso de 10^5 a 10^7 daltons se encuentran disueltas en tejidos líquidos como la hemolinfa o la cavidad celómica. Las proteínas pequeñas de aproximadamen

te 100 000 daltons se encuentran dentro de células rojas, células del celoma o en células de otros tejidos. Los polímeros contribuyen muy poco a la presión osmótica en comparación con las proteínas pequeñas que ayudan a prevenir el exceso de agua de la célula a los espacios intravasculares y sólo parte de ellos cooperan en la captación de oxígeno, ya que el resto participa en la captación de protones y cloruros.

TABLA I.- COMPARACION DE LAS PROTEINAS TRANSPORTADORAS DE OXIGENO.

	Hemoglobina	Eritrocruorina	Clorocruorina	Hemeritrina	Hemocianina
Peso molecular (Daltons)	65,000	16,000 - 4×10^6	3×10^6	10,000-110,000	400,000-9,000,000
Número de subunidades	4	1 - 200	180	3,4,8	6-48
Metal: O ₂	Fe: O ₂	Fe: O ₂	Fe: O ₂	2Fe: O ₂	2Cu: O ₂
Coordinación del metal:	Protoporfirina	Protoporfirina	Formilporfirina	Cadena proteica lateral	Cadena proteica lateral
Color:					
Oxigenada	Rojo	Rojo	Concentrado: rojo Diluído: verde	Morado	Azul
Desoxigenada	Púrpura	Púrpura	Concentrada: rojo Diluído: verde	Incolora	Incolora

Figura 1 - Distribución taxonómica de las proteínas transportadoras de oxígeno. (1,3,4)



La HEMERITRINA es una proteína respiratoria intracelular (Tabla 1) que se encuentra en invertebrados marinos - de 4 phyla diferentes (Fig. 1). Es un polímero de 100,000 daltons que contiene 8 subunidades idénticas, aunque algunos Sipunculidos poseen hemeritrina trimérica o tetramérica. El análisis con rayos X demostró que las 8 subunidades están arregladas en dos capas de cuatro subunidades. La estructura cuaternaria es estabilizada por numerosas - interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. La hemeritrina encontrada en células celómicas y musculares son funcional y estructuralmente diferentes a las proteínas vasculares. El octámero de las células rojas presenta una alta afinidad por el oxígeno a diferencia de la hemeritrina celómica que posee afinidad intermedia. Las diferencias funcionales entre estas proteínas facilita probablemente la extracción del oxígeno del agua circulante y su transporte de la superficie respiratoria a las células.

La HEMOCIANINA es una proteína cuyo metal captador - de oxígeno es el cobre responsable de la coloración azul de la proteína oxigenada, además es una proteína extracelular y circula en la hemolinfa de algunos artrópodos y - moluscos (Tabla 1 y Fig. 1). La cantidad de subunidades y la estructura cuaternaria de la hemocianina de artrópodos y moluscos presenta una gran diversidad. La hemocianina - de artrópodos contiene 6 subunidades (70-80 000 daltons), estos hexámeros pueden unirse y formar polímeros. La hemo

cianina de moluscos es una molécula gigante compuesta por polímeros de 450 000 daltons, y tiene una afinidad por el oxígeno menor que el resto de las proteínas respiratorias de los invertebrados.

La CLOROCRUORINA es un pigmento respiratorio polimérico. Su grupo prostético difiere del hemo debido a que a la porfirina está unido un grupo formil (Tabla 1 y Fig.1). Esta proteína posee baja afinidad por el oxígeno, sin embargo su alta concentración en la sangre de los gusanos - ayuda a mantener el transporte efectivo de oxígeno.

La ERITROCRUORINA es una proteína que contiene el -- grupo hemo que capta el oxígeno de las superficies respiratorias y lo transporta hasta los tejidos para ser utilizado en el metabolismo. La eritrocrurina se caracteriza por ser una proteína polimérica por lo que su número de - subunidades y por ende su tamaño, varía caprichosamente - en todos los grupos taxonómicos.

En contraste con la variabilidad en el grupo prostético y en el tamaño molecular de las proteínas transportadoras de oxígeno de los invertebrados, todos los vertebrados poseen hemoglobina en la que el grupo hemo (ferroprotoporfirina IX) está unido a cada subunidad globínica. - Las hemoglobinas de los vertebrados son hererotetrámeros - altamente cooperativos de 64 000 daltons localizados dentro de células rojas circulantes, las cuales en los vertebrados varían de tamaño y forma. Sólo los eritrocitos de-

los mamíferos carecen de núcleo. La función de la hemoglobina en los eritrocitos está determinada no solo por las propiedades intrínsecas de la hemoglobina per se sino por su interacción con cofactores intracelulares. La afinidad por el oxígeno de la hemoglobina de muchos vertebrados es altamente dependiente de un pH determinado, el cual es proporcionado por el efecto Bohr, este fenómeno es fisiológicamente importante en el intercambio de CO_2 a O_2 . La función intracelular de la hemoglobina es mediada por fosfatos orgánicos. En eritrocitos de Elasmobranquios, teleosteos, peces y reptiles, el Adenosín Trifosfato (ATP) es el fosfato orgánico más importante. El ATP y el 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) regula la función de la hemoglobina en anfibios y el principal efector en eritrocitos de aves es el inositol pentafosfato (IPP). El 2,3-DPG es el regulador en los eritrocitos de mamíferos.

En resumen, todas las hemoglobinas de vertebrados, - excepto los ciclostomos, son tetraméros intracelulares - del tipo $\alpha_2\beta_2$. Poseen subunidades con alta cooperatividad y son regulados a la vez por protones (efecto Bohr) y fosfatos orgánicos intracelulares. A pesar de estas constantes existe entre la hemoglobina de los vertebrados una diversidad fascinante en estructura, función y adaptación - (1, 2).

II.2. HEMOGLOBINAS HUMANAS.

A. ESTRUCTURA Y FUNCION.

La hemoglobina humana es una proteína tetramérica formada por dos cadenas α y dos cadenas β . La estructura primaria demuestra que las cadenas α contienen 141 aminoácidos y las cadenas β las cuales son ligeramente más largas, contienen 146 aminoácidos. La estructura secundaria se refiere a la relación espacial entre residuos de aminoácidos de la cadena (1). Las cadenas polipeptídicas pueden ser estabilizadas por dos tipos de conformación: la helicoidal y el plegamiento (2). Las subunidades de la hemoglobina son un buen ejemplo de configuración helicoidal predominando la hélice α . La estructura de la hélice α fué establecida por Pauling y Corey (1). La hélice es establecida por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo de cada residuo de aminoácido y el grupo amino de los cuatro residuos siguientes. En estado nativo el 75% de la molécula de hemoglobina es hélice α . En sitios específicos de las subunidades, la hélice α se interrumpe en segmentos que carecen de configuración helicoidal. En estos sitios la cadena forma ángulos. Cada segmento se designa con una letra de la A a la H. En algunos segmentos de la cadena la interrupción de la hélice α se debe a la presencia de Prolina.

La estructura terciaria se refiere a la interacción entre los residuos de aminoácidos de las subunidades,

mientras que la estructura cuaternaria determina el empaquetamiento de las subunidades. Los cambios en la estructura cuaternaria durante la oxigenación, se explican por las diferencias físicas y químicas que existen entre la Oxihemoglobina (OHb) y la Deoxihemoglobina (DHb). Estos cambios estructurales involucran movimientos en las subunidades.

Las subunidades de la hemoglobina interaccionan unas con otras mediante enlaces no covalentes, fuerzas de Van Der Waals y puentes de hidrógeno. Las subunidades son designadas α_1 , β_1 , y α_2 β_2 la interacción entre ellas puede ser $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$. Tomando en cuenta la simetría, la interacción $\alpha_1\beta_1$ es estructuralmente idéntica a $\alpha_2\beta_2$ y la interacción $\alpha_1\beta_2$ es idéntica a $\alpha_2\beta_1$.

Las interacciones $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ son idénticas en OHb y DHb, éstas se realizan mediante 40 contactos entre residuos de aminoácidos, incluyendo 9 puentes de hidrógeno. En contraste, los movimientos de la interacción $\alpha_1\beta_2$ durante la oxigenación son completamente diferentes en OHb y DHb. En DHb ocurren 40 contactos incluyendo 19 puentes de hidrógeno y cuando la hemoglobina se encuentra oxigenada existen 22 contactos incluyendo 12 puentes de hidrógeno.

Los fosfatos orgánicos estabilizan la conformación de la DHb. En el humano el 2,3-DPG se encuentra unido al grupo amino del aminoácido 82 (Lis) de la subunidad β , la unión provoca pequeños cambios en la estructura terciaria

de la subunidad.

Cuando los cuatro grupos hemo son sucesivamente oxigenados, los puentes intra e intercatenarios son rotos y el 2,3-DPG, los iones cloruros y los protones son expulsados. Así, los cambios en la estructura terciaria y cuaternaria durante la oxigenación proporciona las bases para la cooperatividad de las subunidades.

El hemo está insertado entre las hélices E y F, el hierro está unido covalentemente al nitrógeno imidazólico de la histidina proximal F8. El hemo se encuentra asimétricamente orientado a un sitio no polar con interior hidrofóbico por supuesto, y otro sitio de la porfirina se encuentra orientado hacia la superficie hidrofílica de la subunidad. El grupo hemo es estabilizado por numerosos contactos interatómicos.

La presión parcial del oxígeno y el pH son los dos factores más importantes que regulan la función de la hemoglobina en el transporte de oxígeno. En los pulmones, donde la presión parcial de oxígeno (aproximadamente 100 mm Hg) y el pH son relativamente altos, la hemoglobina tiende a estar saturada al máximo con el oxígeno, alrededor del 96%. En cambio, en el interior de los tejidos periféricos, donde la tensión de oxígeno es baja (alrededor de 45 mm Hg) y el pH es menor la hemoglobina se une al oxígeno hasta una saturación de un 65% aproximadamente. Así es que la hemoglobina, en su función de transportado-

ra del oxígeno, obedece a un ciclo entre el 65 y 96% de saturación (1,5).

La representación gráfica del porcentaje de saturación de la hemoglobina frente a la presión parcial de oxígeno es sigmoideal, lo que significa que ésta posee una afinidad relativamente baja para captar a la primera o segunda molécula de oxígeno, pero una vez que éstas se han incorporado la unión de las siguientes moléculas de oxígeno no resulta muy aumentada. Inversamente, la pérdida de una molécula de oxígeno de la hemoglobina completamente oxigenada, provoca que el resto se disocie más fácilmente cuando desciende la presión de oxígeno (1,5). La curva sigmoideal de unión del oxígeno ha sido sujeto de intensa investigación, puesto que evidentemente refleja una adaptación biológica de la molécula de hemoglobina, que le permite funcionar con un máximo de eficiencia molecular.

Bohr, Hasselbalch y Krogh descubrieron que la afinidad por el oxígeno se reducía cuando se elevaban los niveles de CO_2 , sin embargo estudios posteriores demostraron que este efecto se debía a una reducción del pH. Así cuando la hemoglobina se oxigena, queda ionizada y deja libre un protón por cada molécula de oxígeno unida (OHb), la unión de protones a la hemoglobina (DHb) representa el sistema amortiguador intracelular más importante para mantener el pH neutro. Este fenómeno es directamente dependiente del efecto Bohr (1).

B. TIPOS DE HEMOGLOBINAS HUMANAS.

En el humano existen cambios en los requerimientos de oxígeno durante las diferentes etapas de desarrollo (embrionaria, fetal y adulta). Estos cambios fisiológicos son superados gracias a la variabilidad de las subunidades globínicas, que forman los diferentes tetrameros.

En las células rojas del embrión humano predominan tres tipos de hemoglobina (Hb): Hb Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) y Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). Las hemoglobinas embrionarias poseen alta afinidad por el oxígeno y son producidas en el saco vitelino durante la tercera y octava semana de gestación.

La Hemoglobina Fetal (HbF) está formada por 2 cadenas α y 2 cadenas γ . Las cadenas β y γ poseen alta analogía y sólo difieren en 39 aminoácidos, 22 de estos aminoácidos se localizan en la superficie externa de la cadena. Las sustituciones internas son altamente conservadas e involucran aminoácidos de polaridad similar. Sólo 4 sustituciones provocan cambios en la interacción $\alpha_1 \gamma_1$ que probablemente incrementa la estabilidad de la HbF. En contraste, no ocurren sustituciones en la interacción $\alpha_1 \gamma_2$ importante en la cooperatividad de las subunidades.

La HbF de células de recién nacidos (RN) contienen 75% de cadena γ^F que poseen Glicina en la posición 136 y 25% de γ^A con alanina en la misma posición. La proporción γ^F/γ^A es constante durante el desarrollo fetal. La HbF de

las células rojas de adultos contienen 40% de γ^b y 60% de γ^a . La transición de la relación γ^b/γ^a fetal a adulta, se lleva a cabo durante la etapa perinatal.

La interacción del 2,3-DPG con la HbF disminuye probablemente por la sustitución $\beta 143$ His a $\gamma 143$ Ser. El incremento a la resistencia a la desnaturalización alcalina puede ser explicado por diferencias estructurales en la interacción de las subunidades $\alpha\gamma$ versus el dímero $\alpha\beta$. En la subunidad β de la HbA existen dos residuos (112Cis y 130 Tir) que pueden ser ionizados y deshidratados por el alcali, favoreciendo la desnaturalización de la HbA. En contraste, la subunidad gamma posee 112 Tre y 130 Trp, residuos que no son alterados por el alcali y por supuesto contribuyen a la resistencia a la desnaturalización de la HbF.

Existen 2 tipos de hemoglobina adulta denominadas HbA ($\alpha_2\beta_2$) y HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). La estructura y función de la HbA se explicó detalladamente en la sección anterior. La cadena δ de la HbA₂ es homóloga a la cadena β y solo difieren en 10 aminoácidos de los 146. La HbA₂ posee afinidad por el oxígeno con cooperatividad, efecto Bohr y respuesta al 2,3-DPG similar a la HbA. La HbA₂ es más resistente a la desnaturalización térmica que la HbA, esto se explica por un contacto adicional en la interacción α,δ (116 Arg ... 114 Pro) (1,6).

C. GENES GLOBÍNICOS.

C.1 LOCALIZACION Y ORGANIZACION CROMOSOMICA.

Los 8 genes globínicos y los 4 pseudogenes que existen en el humano, se encuentran distribuidos en dos grupos de genes, el grupo de genes α y el grupo de genes β . (1,6,7).

El significado de la organización de los genes globínicos en relación al control de la activación-inactivación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario, fetal y adulto es desconocido. En cuanto a la distancia intergénica, un patrón general puede observarse en la organización del grupo de genes globínicos. En el grupo de genes β los genes β y δ se encuentran separados por aproximadamente 5000 a 6000 nucleótidos (5 ó 6 kilobases o Kb) al igual que los genes γ , sin embargo distancias de 15 a 18 Kb separan al par de genes β - δ del par de genes γ^b - γ^a y la misma distancia separa al gen ϵ del par de genes γ^b - γ^a . En el grupo de genes α , aproximadamente 4 Kb separan los dos genes funcionales α_1 y α_2 y más de 20 Kb de ADN separan el gen globínico ζ del par genes α . (1)

El grupo de genes α se encuentra localizado en el -- brazo corto del cromosoma 16 en la región p13.3 (Fig. 2) (1,6,7,8). Este grupo de genes cuyo tamaño es aproximadamente de 40 Kb (Fig. 3) incluye el gen duplicado (α_2 y α_1) el gen embrionario ζ , 3 pseudogenes ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$ y $\psi\alpha_1$) y un gen cuya función no ha sido determinada (θ_1), --

agrupados en el orden siguiente: 5' - ξ_2 - $\mu\xi_1$ - $\mu\alpha_2$ - $\mu\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ_1 - 3' (1,6,8). Recientemente fué identificado el pseudogen Ro localizado entre los genes α_1 y θ_1 . Además se encontró una copia del gen θ denominado $\mu\theta_2$ en el cromosoma 22 (7,8). En este grupo se han detectado 5 secuencias repetitivas ricas en Guanina y Citosina identificadas como regiones hipervariables (RHVs) localizadas en el extremo 3' del gen θ_1 (RHV 3'), entre el gen ξ_2 y $\mu\xi_1$ (RHV interzeta) en los intrones del gen ξ (RHVs de intrones ξ no mostrados en la figura) y a 70 Kb río arriba del gen -- (RHV 5') (7,8).

CROMOSOMA 16

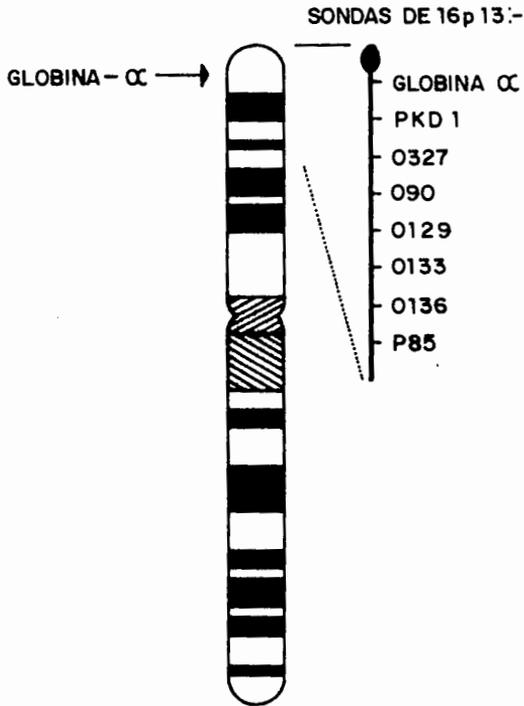


Figura 2.- Localización cromosómica de los genes globínicos α .

El análisis de los grupos de genes globínicos muestra secuencias repetitivas cortas de ADN con orientación variable, clasificados como Familias Kpn y Alu, las cuales se encuentran también en otros sitios del genoma humano. En el grupo de genes α se encuentran localizadas 11 familias Alu (1,6,8).

Grupo de Genes Globínicos α

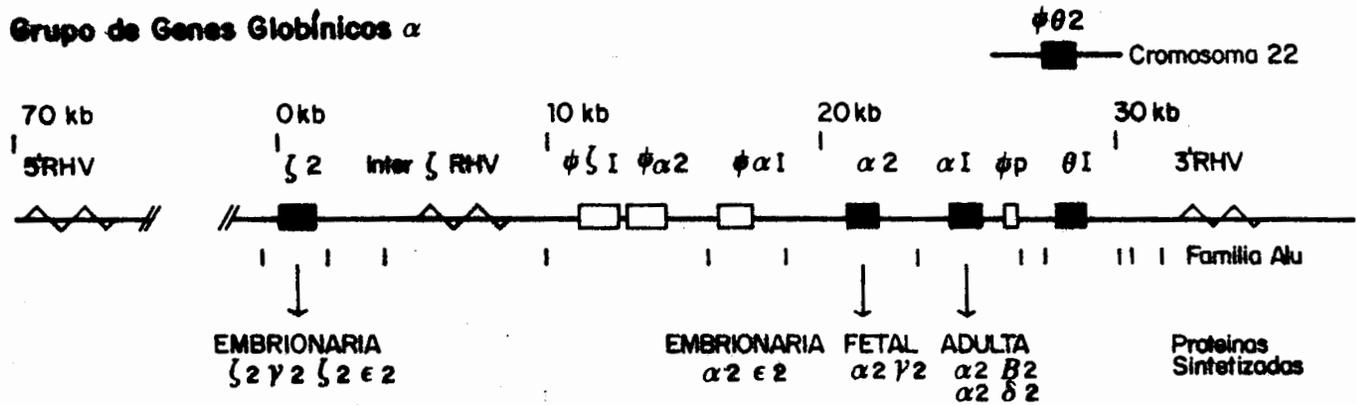


Figura 3.- Organización de los genes globínicos α . Se muestran también las 3 regiones hipervariables (5'RHV, interzeta RHV y 3'RHV), los pseudogenes, la familia-Alu y un $\phi 0 2$, localizado en el cromosoma 22.

El grupo de genes β se encuentra localizado en el -- brazo corto del cromosoma 11 en la región p15.5 al igual que los genes que codifican para la catalasa (CAT), la - ° Tirosina Hidroxilasa (TH), la Calcitonina (CAL), la Hormona Paratiroidea (HPT), el oncogen C-Ha-ras y el de la Inulina (INS) (Fig. 4) (1,9).

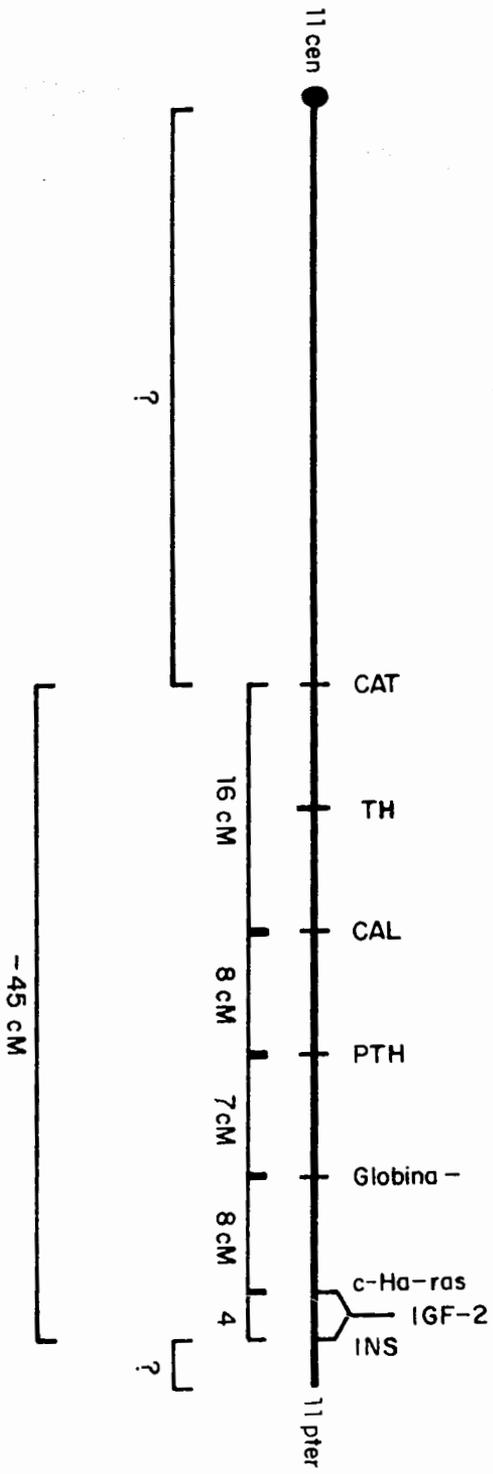


Figura 4.- Localización cromosómica de los genes globínicos No- α .

El grupo de genes ρ incluye los genes ϵ , γ^e , γ^a , δ y β y el pseudogen $\rho\beta$ localizado entre los genes γ^a y δ (Fig. 5) (1,6,7). En este grupo se encuentran también --- tres familias Alu (1,6). En contraste con las secuencias cortas de la familia Alu, en el grupo de genes globínicos ρ se localizan dos regiones de secuencias repetitivas largas que forman parte de la familia Kpn (1,6). La función que desempeñan estas secuencias al igual que las secuencias de la familia Alu es desconocida.

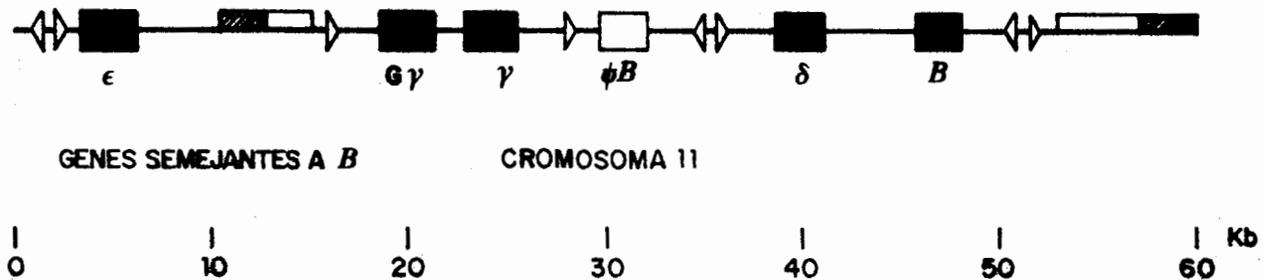


Figura 5.- Organización de los genes globínicos No- α . Los rectángulos sobre la línea muestran las familias Kpn, mientras que los triángulos las familias Alu - con sus respectivas orientaciones.

C.2 ONTOGENIA.

Los diferentes tipos de hemoglobina en el humano han surgido por un proceso adaptativo, el cual se asocia a -- las diferentes necesidades de oxígeno durante las etapas del desarrollo.

La expresión de los genes globínicos sigue un patrón determinado (fig. 6). Los genes globínicos que codifican para las cadenas ζ y ϵ se expresan exclusivamente en las primeras semanas de gestación. Los genes α son completamente activos al final de la etapa embrionaria para continuar así durante la etapa adulta. Los genes β inician su activación en muy pequeña proporción en la etapa embrionaria y son completamente activos alrededor de los 12 meses de vida. Los genes γ tienen su máxima expresión en la etapa fetal predominando γ^{ϵ} sobre γ^{α} y disminuyen su actividad en la etapa perinatal conforme aumenta la de los genes β para quedar en su mínima expresión alrededor de los 12 meses de vida, teniendo como característica que la actividad de γ^{α} es ahora mayor que γ^{ϵ} . Los genes globínicos δ se activan poco antes del nacimiento y permanecen -- así durante la etapa adulta (1,6,10).

Durante el desarrollo humano existen dos períodos de activación-inactivación de genes globínicos (1,2,11). El primero ocurre durante la gestación con el cambio de hemoglobina embrionaria a hemoglobina fetal y el segundo durante la etapa perinatal cuando la hemoglobina fetal es -

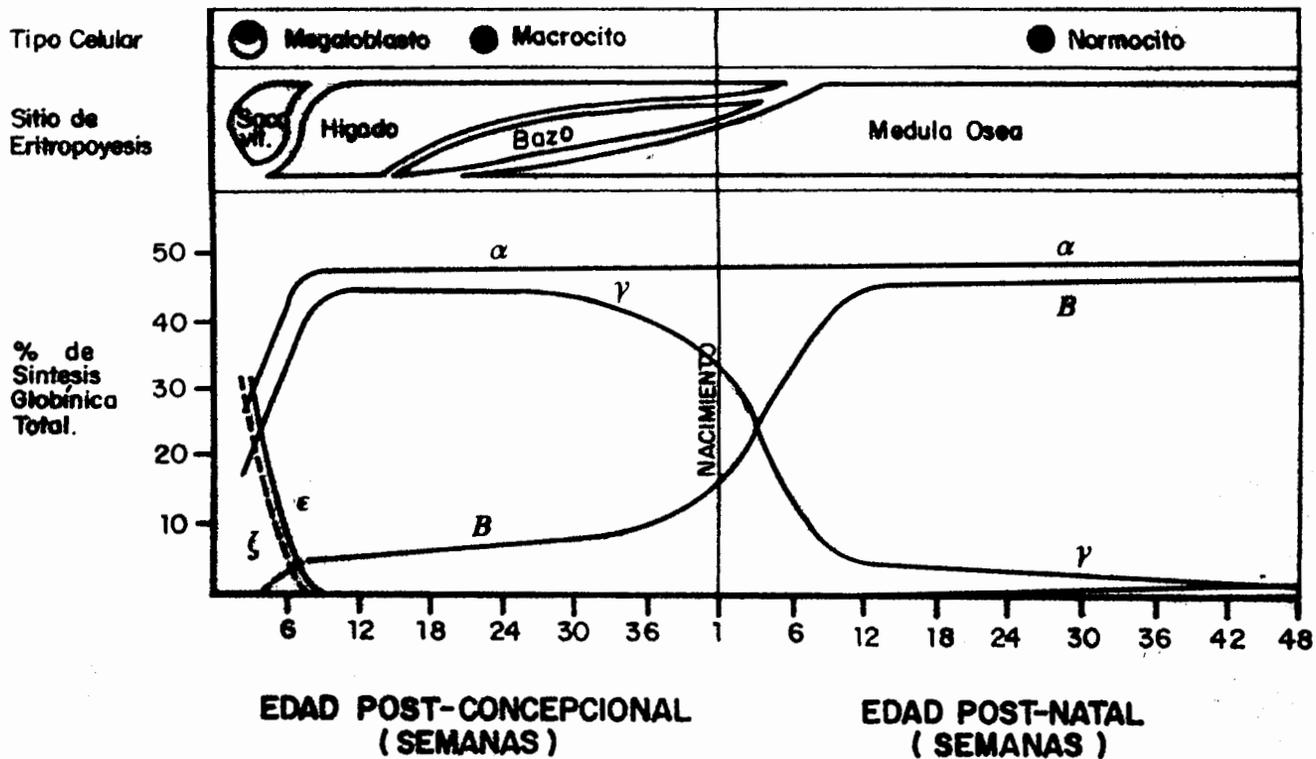


Figura 6.- Diagrama de la expresión de los genes globínicos.

reemplazada por hemoglobina adulta. Estos fenómenos que ocurren durante el desarrollo son dependientes de la expresión del grupo de genes β durante la ontogenia y se acompañan de cambios en los sitios de eritropoyesis (1,6,10,11). Finalmente, la activación-inactivación de la hemoglobina constituye un excelente modelo para el estudio del control de las actividades génicas durante el desarrollo humano y la diferenciación celular.

ACTIVACION-INACTIVACION DE HEMOGLOBINA EMBRIONARIA A FETAL.

El embrión humano produce hemoglobinas embrionarias: Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2 \epsilon_1$) y Portland ($\zeta_2 \gamma_1$). Conforme avanza el desarrollo, la producción de globinas embrionarias baja hasta que no es detectable en el segundo trimestre de vida, esto se debe al reemplazo de cadenas ζ por α y ϵ por γ , (1,6,10,11).

El estudio de las bases celulares de la activación-inactivación de la expresión génica embrionaria a la adulta se ha realizado en algunas especies de vertebrados, antes que en el humano. Por experimento realizado en ratones, pollos y anfibios, se llegó a la conclusión de que la activación-inactivación génica ocurre de acuerdo a un lineaje celular (Ingram, 1972). Según este modelo, la línea celular primitiva se encuentra programada sólo para la expresión de genes globínicos embrionarios y la línea

definitiva sólo expresa genes adultos (1,6,11). En el humano, este fenómeno se ha investigado en cultivos eritroides y los resultados obtenidos son incompatibles con el modelo del lineaje, ya que éste sólo puede ser explicado si se asume la existencia de una línea intermedia programada para la coexpresión de genes embrionarios y adultos. En este caso, debe existir un mecanismo tiempo dependiente que determine la inactivación de los genes embrionarios conforme avanza el desarrollo. Otra alternativa, sugiere que los cambios tiempo dependientes de los programas ocurren en líneas celulares bajo condiciones de activación - inactivación génica (11).

Así, aún cuando el cambio de hemoglobinas embrionarias a hemoglobina fetal no coincide con la transición de la eritropoyesis del saco vitelino al hígado y médula ósea (6,10), en general podemos asumir que la activación-inactivación de hemoglobina embrionaria a fetal ocurre en un tiempo específico durante la gestación y se relaciona hasta cierto punto con la eritropoyesis.

ACTIVACION-INACTIVACION DE HEMOGLOBINA FETAL A ADULTA.

El mecanismo de activación-inactivación de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta en la célula eritroide durante la etapa perinatal, ha sido sujeto a numerosos estudios y especulaciones. El gran interés de este mecanismo de activación-inactivación génica radica en que constitu-

ye un excelente modelo para el estudio de la activación, reactivación, inactivación y regulación génica.

Mediante estudios en la síntesis de HbF en colonias eritroides derivadas de sangre de recién nacido se ha propuesto un cambio en la población progenitora durante el período perinatal. Por el análisis de las cadenas globínicas en las colonias individuales fué posible identificar dos poblaciones diferentes, una en la que existe correlación negativa en la síntesis de cadenas γ y β (colonias fetales) y otra colonia análoga sin correlación entre las cadenas (colonias adultas). En resumen, este modelo clonal para la activación-inactivación de hemoglobina se debe a un reemplazo gradual de los progenitores fetales durante la ontogenia por progenitores adultos (1, 12).

Se ha considerado también la posible influencia de factores humorales u hormonales en la regulación de la activación-inactivación de la hemoglobina, esta idea se concibió a raíz de la observación del aumento en la síntesis de HbF en mujeres embarazadas poco después de alcanzado el pico en la secreción de gonadotropina coriónica (HGC) y la elevación de la HbF en pacientes con tumores que producen HGC o con tirotoxicosis. Sin embargo, la elevación de HbF se debe al incremento en la producción y/o acumulación de células F, debido quizás al estrés eritropoyético. El aumento en la producción de células F durante la fase de estrés eritropoyético es mediada probablemente

por el incremento en los niveles de eritropoyetina pero - esto no significa que en la etapa perinatal la activación -inactivación de HbF a HbA sea inducida por cambios en el tipo o cantidad de eritropoyetina producida (1).

Otra posibilidad para explicar la activación-inactivación de HbF a HbA se basa en la estructura de la cromatina y en la metilación del ADN (1,13).

Finalmente, se ha propuesto la existencia de un reloj biológico que regula la activación-inactivación de HbF a HbA (14).

De acuerdo con la información precedente, los factores responsables de la activación-inactivación de los genes globínicos fetales a adultos durante la etapa perinatal continúa siendo un misterio.

C.3 ESTRUCTURA INTERNA.

Las regiones codificadoras (exones) de los genes globínicos humanos son interrumpidas en dos posiciones por regiones de ADN no codificadoras llamadas secuencias interventoras o intrones. En el grupo de genes β los intrones interrumpen la secuencia codificadora entre los codones 30 y 31, lo mismo que entre los codones 104 y 105. En la familia de genes α , las secuencias interventoras interrumpen las secuencias codificadoras entre los codones 31 y 32 y entre los codones 99 y 100. Como muestra la Fig. 7 el primer intrón del gen α (I-1) es tan corto como el segundo intrón (I-2), no así el segundo intrón del gen β -- que es más largo que el intrón del gen α (1,2,15). En los extremos 5' del primer exon y 3' del tercer exón, se encuentran regiones de ADN no codificadoras denominadas -- flanqueadoras (1,2,15).

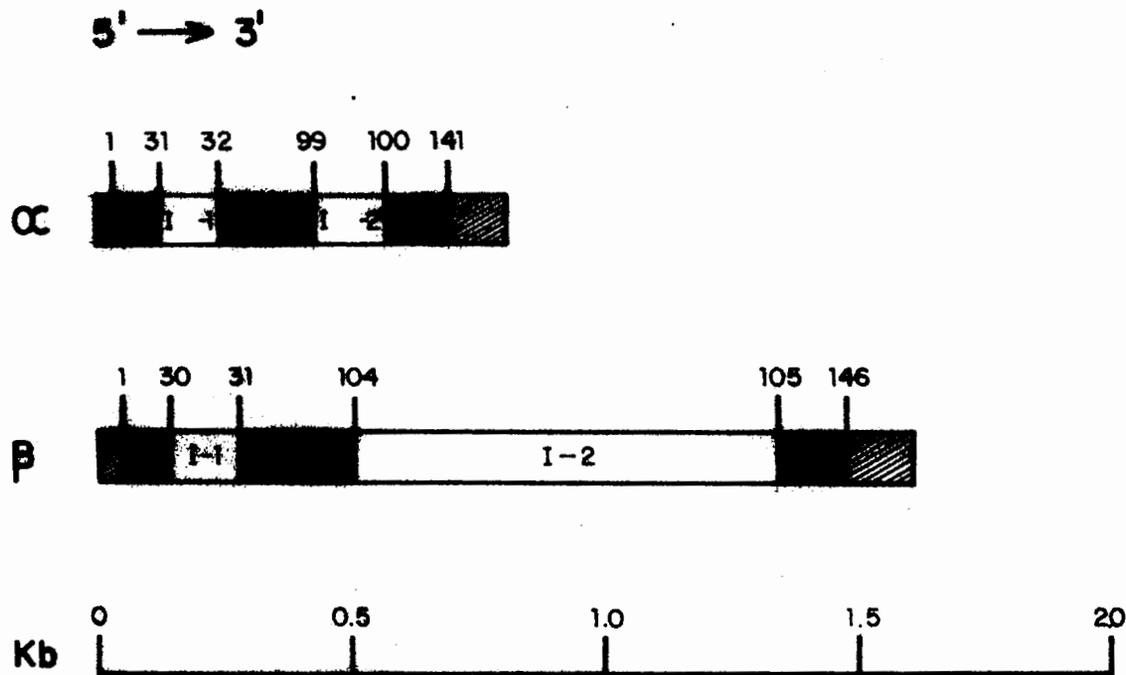


Figura 7.- Estructura interna de los genes globínicos α y β . La sección con diagonales representa las regiones flanqueadoras, la obscura los exones y la clara los intrones.

La longitud del I-1 es muy similar en todos los genes globínicos 117-130 pares de bases (pb) excepto en los genes ξ y $\psi\xi$ en los que la longitud es de 886-1264 pb. La secuencia nucleotídica del I-1 es muy conservada en el grupo de genes β , no así en los genes α y ξ cuyas secuencias son pobremente homólogas. La longitud de los I-2 del grupo de genes globínicos β son muy similares (850-889 pb) a diferencia de la secuencia nucleotídica la cual es muy divergente, por lo que la homología es pequeña a excepción de los genes γ^p y γ^a cuya secuencia intrónica es altamente homóloga. En cuanto al grupo de genes α las secuencias de los intrones son homólogas en los genes α y $\psi\alpha$ pero existe poca homología entre la secuencia de los intrones de estos genes y la de los genes ξ y $\psi\xi$ (1,15).

Los intrones son transcritos en el ARN mensajero (ARNm) o heterogeneonuclear para ser más tarde eliminados por autoempalme durante el proceso de maduración del ARNm; para que se lleve a cabo el autoempalme se requiere la presencia de secuencias consenso específicas entre los exones y los intrones localizadas en los extremos 3' y 5' de los intrones denominadas 5' ó donador (GT) y 3' ó aceptor (AG) (1,15).

La región promotora contiene 3 secuencias consenso necesarias para la expresión de los genes globínicos (1,6 15). La primera, es la caja ATA localizada a -30 pb del sitio cap, esta región influye en los niveles de trans---

cripción. La segunda secuencia consenso es la caja CCAAT- que se encuentra a -70-80 pb del sitio cap (en los genes δ la secuencia es CCAAC y en los genes γ se encuentra duplicada) mutaciones en esta caja reducen los niveles de transcripción. Aproximadamente de -80-100 pb del sitio cap se encuentra la tercera secuencia conservadora rica en GC y cuya estructura es $\text{GGGG}^{\text{T}}_{\text{G}}$ ó $\text{C}^{\text{A}}_{\text{G}}\text{CCCC}$ la cual puede estar invertida o duplicada (1,6,15).

C.4 EXPRESION Y REGULACION.

La información genética que codifica para la estructura de las proteínas se encuentra en la secuencia nucleotídica del ADN de los genes, localizados a su vez en cromosomas en el núcleo celular. Cada triplete de bases o codón codifica para un aminoácido. Un aminoácido puede ser codificado por diferentes codones, pero cada triplete es específico para solo un aminoácido y un ARN de transferencia (ARNt). La síntesis de proteínas sólo puede ocurrir mediante la formación de una cadena de ARNm el cual es imagen en espejo de la secuencia nucleotídica del ADN y es formado por la ARN-polimerasa en un proceso llamado transcripción. El transcrito inicial de ARNm es rápidamente procesado después de su síntesis. Los primeros eventos -encapuchamiento en 5' y poliadenilación en 3'- estabilizan el transcrito y lo previenen contra posible ataque de la exonucleasas. El encapuchamiento incluye la formación de un enlace 5'ppp5', usualmente en A usando una molécula de GTP. La poliadenilación involucra como su nombre lo indica, la adición de residuos de A (~50) en el extremo 3'- y la escisión del precursor inicial de 10-20 pb río abajo de la señal AATAAA (1,15). Subsecuentemente los intrones son removidos durante el proceso de autoempalme y producen el ARNm maduro, éste es transportado del núcleo al citoplasma donde la traducción ribosomal del ARNm tiene lugar (Fig. 8) (1,6,15).

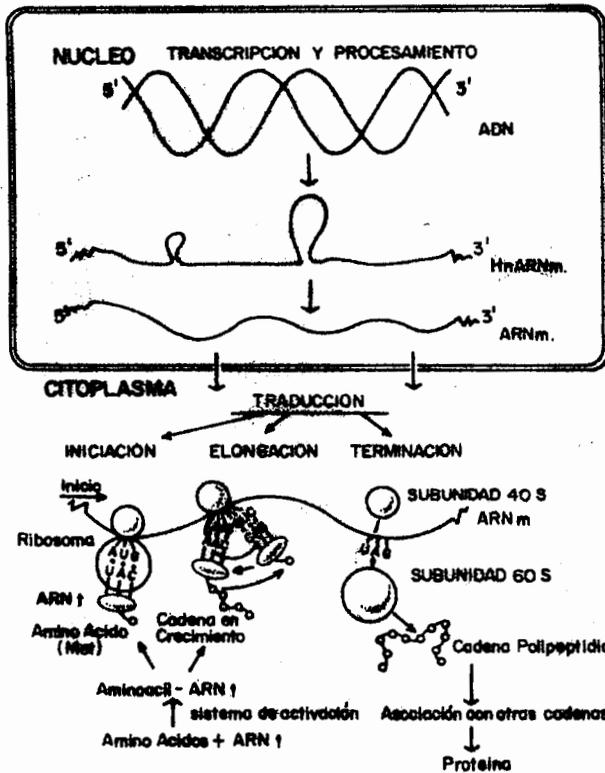


Figura 8.- Esquema de la regulación de la síntesis de las cadenas globínicas.

En realidad se conoce poco acerca de los mecanismos-responsables de la regulación génica globínica y de su patrón de expresión durante la ontogenia. Las investigaciones hasta el momento demuestran que la metilación y la estructura cromatínica influyen en la expresión de los genes globínicos.

El estado de METILACION de un gen es una influencia importante para la expresión génica, en general los genes activos se encuentran hipometilados y los genes inactivos hipermetilados. La metilación ocurre en los residuos C y en los dinucleotidos CG, al grado que las tres cuartas partes de todas las secuencias CG humanas se encuentran metiladas. En tejidos no eritroides humanos y de otros animales los genes globínicos se encuentran hipermetilados, mientras que en tejidos eritroides los genes globínicos poseen una relativa hipometilación. Por ejemplo, en la región flanqueadora 5' de los genes globínicos γ , los sitios CG de la región CCAAT-ATA son hipometilados en células eritroides fetales derivadas del hígado y metilados en células adultas de médula osea, donde la expresión de los genes γ es mínima. Experimentos *in vitro* indican que el estado de metilación de la región flanqueadora 5' de los genes γ puede efectivamente prevenir su expresión. La hipometilación de la región flanqueadora 5' parece ser un requisito necesario para la expresión de los genes globínicos, así como una señal primaria para la activación gé-

nica (1,6,15).

Los genes en las células de mamíferos no se presentan como simples cadenas de ADN, sino en complejos unidos con histonas y otras proteínas en la CROMATINA. Una de las consecuencias de este arreglo es la limitación de la actividad transcripcional, en las células eritroides por ejemplo, sólo un pequeño porcentaje del total de la secuencia del ADN que corresponde a los genes globínicos se expresa. Estos sitios presentan alteraciones en la estructura de la cromatina y muestran incremento en la sensibilidad de digestión por nucleasas como la DNAasa I. Así, la actividad de los genes globínicos se asocian con cambios en la configuración de la cromatina que precede a la expresión génica. Finalmente, la metilación y los cambios de cromatina son situaciones paralelas que ocurren en respuesta a otras influencias necesarias en la iniciación de la expresión (1,6,15).

II.3 HEMOGLOBINA FETAL.

A. ASPECTOS GENERALES.

La HbF formada por dos cadenas α y dos γ ($\alpha_2\gamma_2^G + \alpha_2\gamma_2^A$) se produce predominantemente en un tipo de eritrocitos denominados Células F (1). La HbF de las células individuales puede ser cuantificada mediante el uso de anticuerpos monoespecíficos anti-HbF. El porcentaje de HbF en hemolizado puede determinarse mediante métodos cromatográficos, electroforéticos e inmunológicos, así como por el método clásico por desnaturalización alcalina. En general, el método inmunológico se recomienda en casos que contienen menos del 2% de HbF, la desnaturalización alcalina en casos que poseen del 2-40% de HbF y la cromatografía se recomienda en ejemplos que exceden del 40% de HbF (1).

Las células rojas de los recién nacidos contienen 80-10% de HbF la cual es reemplazada lenta y gradualmente por HbA (1,6,10-13). Una vez completo el cambio de HbF a HbA el porcentaje de HbF es del 1% y la cantidad de cadenas γ^F constituyen el 40% del total de cadenas (1).

La HbF de las células rojas de los RN poseen una relación de cadenas γ^G/γ^A de 3:1 y la HbF de las células F de adultos es de 2:3 (1). La transición de la relación de cadenas γ^G/γ^A ocurre durante la etapa perinatal (1,6,10-13).

Los genes que codifican para las cadenas globínicas-

γ^b y γ^A se encuentran ubicados muy cerca entre sí en el grupo de genes β localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (1,6,9). Hill et al en 1986, identificaron rearrreglos de los genes γ específicamente variaciones en el número de genes. Así, mientras que el genotipo normal es $\gamma^b\gamma^A$ en algunos individuos se han encontrado los genes triplicados ($\gamma^b\gamma^b\gamma^A$) o cuadruplicados ($\gamma^b\gamma^b\gamma^b\gamma^A$) o sólo un gen (γ^A) (7).

La declinación de HbF se retarda en niños prematuros y en niños de madres diabéticas (1,14) en contraste con niños con Síndrome de Down que tienen síntesis precoz de HbA y por tanto, una rápida declinación de la cantidad de HbF (1).

B. ELEVACION DE HEMOGLOBINA FETAL.

La HbF es rápidamente reemplazada por HbA después del nacimiento, sin embargo pequeñas cantidades de HbF se continúan sintetizando durante la etapa adulta (1,6,10-13). La producción de HbF se eleva en varias enfermedades hematópoyéticas y en hemoglobinopatías, así como en condiciones neoplásicas (1,16-20). Las razones por las que continúa la producción de HbF durante la vida adulta y los mecanismos de control son aún desconocidos. Recientemente se ha propuesto que la expresión de los genes globínicos-fetales en adultos es controlada por los niveles de progenitores eritroides (12).

B.1 ESTADOS NO NEOPLASICOS.

El porcentaje de HbF se incrementa modesta pero significativamente durante el embarazo. Esta elevación se debe al incremento en la producción de células F maternas - (1).

El incremento en la síntesis de HbF ha sido bien caracterizado en diferentes hemoglobinopatías como: anemias de células falciformes (1,6,16,17,19,20,21), Persistencia Hereditaria de HbF (PHHF) (1,6,16,19), Talasemias β^0 y $\delta\beta$ - (1,6,16,17,19,20,21), así como en individuos con anemias-hemolíticas congénitas (1).

Individuos con anemia de células falciformes presentan valores altos de HbF (1,6,16,17,19,20,21). Este incremento de HbF facilita el estudio de variaciones genéticas de los valores de γ^F que en la mayoría de los individuos - corresponde al 40%; sin embargo, algunos individuos con esta hemoglobinopatía presentan valores del 60 al 70% -- (16). La posibilidad de expresar los genes globínicos fetales en células eritroides adultas puede considerarse como terapia génica para anemia drepanocítica (16).

Ciertas condiciones talasémicas están asociadas con amplificación en la síntesis de los genes globínicos γ resultando un incremento en la producción de HbF. Los niveles de HbF en talasemia β son muy variables, desde porcentajes normales (<1%) hasta cerca del 100% en individuos - homocigotos para talasemia β^0 y $\delta\beta$ (1,6,16,17,19,20).

Se han identificado mutaciones puntuales en individuos con PHHF, relacionados con el incremento en la producción de HbF, parece ser que estas mutaciones puntuales en PHHF determinan la incapacidad de unión de las proteínas nucleares a la región promotora de los genes γ , como ocurre en genes normales (18).

B.2 ESTADOS NEOPLASICOS.

La producción de HbF puede ser reactivada en un gran número de enfermedades neoplásicas.

Algunos estudios sugieren que la elevación de la HbF en tumores sólidos, como carcinomas, se debe a la liberación de ciertas sustancias del tumor que inducen la producción de HbF en médula ósea, ya que estas enfermedades neoplásicas no involucran células eritropoyéticas (19).

Existen en las enfermedades neoplásicas que involucran la hematopoyesis, elevación de los niveles de HbF - (19-23). De acuerdo con la literatura, los niveles de HbF se incrementan en diversas formas de leucemias (1,20,23)- y Linfomas (1,21,22).

La HbF se encuentra particularmente elevada de un 20 a 80% en Leucemia Mielógena crónica Juvenil (20-23) y en eritroleucemias (21-23) a diferencia de la LLA y leucemias mielógenas crónicas adultas cuyos incrementos de HbF no son tan elevados (20,22,23). La HbF particularmente en LLA, se discutirá ampliamente en el capítulo siguiente.

II.4 LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se caracteriza por la acumulación excesiva de linfoblastos y sus progenitores, es una enfermedad heterogénea ya que las células malignas expresan diversos fenotipos y respuesta variable a la quimioterapia, la LLA es además la enfermedad neoplásica más frecuente en niños (24,25).

La LLA puede ser clasificada por criterios morfológicos e inmunológicos. De acuerdo con la French American - British (FAB) el criterio morfológico reconoce tres subtipos: L1, L2 y L3. El subtipo L1 se caracteriza por linfoblastos pequeños y uniformes, es el tipo más común en niños, mientras que en el subtipo L2 se observan linfoblastos pleomórficos y es un subtipo común en adultos. Las células leucémicas del subtipo L3 recuerdan a las del Linfoma de Burkitt y es común tanto en niños como en adultos (24). Desde el punto de vista inmunológico los linfoblastos leucémicos expresan antígenos típicos de las células T y B en diferentes estados de desarrollo (pre-B, B y T). Existe un antígeno común en LLA llamado CALLA, el cual se encuentra en la mayoría de los casos de LLA tipo B y sólo en una minoría de los casos de LLA tipo T (24).

El pronóstico de la enfermedad depende de la edad, sexo, subtipo de neoplasia y de los niveles iniciales de leucocitos (24,25). El análisis de la edad como factor de riesgo ha mostrado que los niños de 2 a 10 años tienen un

excelente pronóstico a diferencia de los adultos en los que el incremento en la edad se asocia con remisión baja ó períodos de remisión muy cortos. En cuanto al factor se xo, los hombres presentan peor pronóstico que las muje--- res, lo cual puede estar asociado al riesgo de infiltra--- ción testicular (24,25). El subtipo morfológico es tam--- bién importante, los niños con LLA-L1 cursan con mejor -- pronóstico, aunque esta distinción no es significativa en adultos (24).

Las anomalías citogenéticas más comunes en LLA -- son las translocaciones; en LLA tipo B: $t(1;19)$, $t(4;11)$ -- y $t(9;22)$ y en LLA tipo T, las translocaciones más fre--- cuentes ocurren cerca del gen α que codifica para un re--- ceptor de la célula T en el cromosoma 14 (24).

A. ONCOGENES EN LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.

Los efectos de los rearrreglos cromosómicos están ín--- timamente ligados a rearrreglos y alteración en la regula--- ción de oncogenes celulares. Estos genes, identificados -- primero en retrovirus (24,26-30), juegan un papel impor--- tante en el crecimiento de la célula normal (protooncoge--- nes) (24,26-30,40), así como en la regulación de la proli--- feración y diferenciación celular (22-28-30). La expre--- sión anormal de estos genes se refleja en el crecimiento--- irregular y por ende, en la transformación maligna. Los me--- canismos de activación de oncogenes son diversos e inclu---

yen transducción viral, mutaciones puntuales, mutagenesis insercional y otros mecanismos genéticos (24-32). Algunos productos de oncogenes pueden funcionar como factores de crecimiento celular o pueden regular la replicación del ADN y la división celular (24,26-33).

Los oncogenes celulares desempeñan un papel muy importante en el establecimiento, maduración y progresión del crecimiento neoplásico (32), la expresión de algunos de ellos se ha observado en LLA y se atribuye a mecanismos que incluyen mutaciones puntuales, traslocación y amplificación (25,31,32,38).

La expresión de c-myc y c-myb ocurre con cierto patrón de acuerdo al subtipo de neoplasia (31,40), mientras que la expresión de los oncogenes c-abl y c-fes es muy baja (31). Los protooncogenes c-erb, c-src y c-sis, que codifican para proteínas no relacionadas con la diferenciación hematopoyética no se expresan en células leucémicas (31,32). Los niveles en la expresión de los oncogenes c-Ha-ras, c-Kis-ras y N-ras en LLA fué similar a los detectados en células normales humanas (31,32,39).

Mutaciones del oncogen N-ras debido a sustitución de aminoácidos en los codones 12,13 ó 61 ocurren en el 10% de los casos de LLA en los que se observa activación de este oncogen (34). Las mutaciones pueden ocurrir en ciertos momentos de la transformación neoplásica (24,33,37).- Es probable que el desarrollo de leucemias involucre la -

activación de más de un protooncogen y que el N-ras pueda ser uno de ellos, lo que aún no es claro, es el significado de las sustituciones de los aminoácidos (36,40).

La información precedente provee bases firmes para el análisis de oncogenes celulares en células leucémicas, ya que pueden reflejar actividad en la proliferación (c-myc, c-myb y c-ras) diferenciación (c-fos y c-ras) ó en la expresión de receptores de factores de crecimiento (c-abl y c-fes) (31,33).

B. HEMOGLOBINA FETAL Y RELACION DE CADENAS γ^G/γ^A EN LLA.

La literatura respecto a la evaluación de la HbF en LLA es muy escasa. Becerra y Cols. (41) evaluaron la actividad de los genes globínicos γ en pacientes adultos con neoplasia y reportaron incremento de la HbF (\bar{x} 1.26%) en el grupo de leucemias; Montes y Cols. (42) estudiaron un grupo de niños con LLA y reportaron elevación de la HbF (\bar{x} 2.61%). En 7 niños cuyo incremento de HbF fué de 2.85- al 13.70%, realizaron la determinación de cadenas γ^F/γ^A y observaron heterogeneidad en la relación de cadenas (0.76 a 2.31, γ^F/γ^A).

Durante la etapa final de esta tesis, se captó un resumen de Achille y Cols. (43) en el cual se describe el efecto de la quimioterapia en la síntesis de HbF y en la relación de cadenas γ^F/γ^A en 32 niños con LLA. Las determinaciones del porcentaje de HbF se realizaron al momento

del diagnóstico de la enfermedad ($\bar{x}1.5 \pm 0.59\%$), al final de la terapia de inducción ($\bar{x}2.95 \pm 0.85\%$) y en remisión ($\bar{x}0.88 \pm 0.34\%$). El análisis de las cadenas γ^b/γ^a al diagnóstico - mostró porcentajes de γ^g del 25 al 80% ($\bar{x}46.46 \pm 13.6\%$). No - observaron cambios significativos del porcentaje de γ^b durante la terapia de mantenimiento y la etapa de remisión.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los mecanismos que favorecen la reactivación de los genes γ en estados neoplásicos, ofrece perspectivas importantes respecto a los fenómenos biológicos implicados en la activación-inactivación génica.

Estudios realizados demuestran que las leucemias infantiles cursan con niveles más elevados de HbF que las leucemias en adultos (41,42); además, de acuerdo con la literatura, tanto en Leucemia Mielógena Crónica adulta y juvenil (20) como en LLA(43) existe heterogeneidad en la expresión de los genes γ , lo que nos motivó a investigar si la elevación de la HbF y la relación de cadenas γ^G/γ^A depende de la edad del paciente o del subtipo de neoplasia.

IV. OBJETIVOS

1. Investigar si existen diferencias en los niveles de HbF en niños con LLA-L1 y LLA-L2.
2. Analizar el porcentaje de HbF en niños con LLA-L1 y LLA-L2 de acuerdo a la edad.
3. Conocer la relación de cadenas γ^F/γ^A de la HbF en niños con LLA-L1 y LLA-L2.
4. Analizar la relación de cadenas γ^F/γ^A de la HbF en niños con LLA-L1 y LLA-L2 según la edad.
5. Comparar las características hematológicas por grupo y subgrupo de los niños estudiados.

V. HIPOTESIS

El grado de elevación de HbF y la relación de cadenas γ^F/γ^A en LLA es dependiente de la edad o del subtipo de neoplasia.

VI. M A T E R I A L

La investigación se llevó a cabo en 60 niños con LLA (24 femeninos y 36 masculinos) de 1 a 17 años de edad que acuden a la consulta de hematología del Hospital de Pediatría del CMO y en 25 niños sanos (12 femeninos y 13 masculinos) de 2 a 18 años de edad como grupo control.

Los niños con LLA fueron distribuidos en dos grupos: LLA-L1 y LLA-L2 según el subtipo de neoplasia obtenido de acuerdo a la clasificación morfológica, realizada por los hematólogos del Hospital de Pediatría: Jesús Carlos Aguilar Luna, Amparo Esparza y Beatriz López Guido.

Con los grupos LLA-L1, LLA-L2 y control se formaron subgrupos por edades: a) de 0 - 5 años; b) de 6 a 10 años y c) de 11 a 18 años, como se muestra en la siguiente tabla:

GRUPO	LLA-L1 n=29			LLA-L2 n=31			CONTROL n=25		
	F	M	T	F	M	T	F	M	T
0 - 5	2	9	11	0	4	4	2	2	4
6 - 10	3	7	10	10	5	15	5	6	11
11 - 18	4	4	8	5	7	12	5	5	10
Total:	9	20	29	15	16	31	12	13	25

VII. M E T O D O S

En los dos grupos de niños estudiados LLA y Control, se determinó el porcentaje de HbF por los métodos de Betke (44) y Singer (45) y HbA₂ (46). Para descartar alguna hemoglobinopatía se realizó electroforesis de Hemoglobinas a pH 8.4 (47). Además se realizó Biometría Hemática y se determinó la relación de cadenas γ^F/γ^A en geles de poli-acrilamida (48) a partir de eluatos de HbF obtenidos -- por el método de Singer, precipitados con ácido sulfosalicílico y lavados con agua destilada.

A). OBTENCION DE LA MUESTRA.

Se tomaron de 3-5 ml. de sangre por punción venosa - con anticoagulante EDTA al 10%.

B). BIOMETRIA HEMATICA.

La biometría hemática se realizó en contador electrónico Coulter modelo S del laboratorio del Hospital de Especialidades del CMO, que analiza los siguientes parámetros: Glóbulos Blancos (GB), Glóbulos Rojos (GR), Hemoglobina (Hb), Hematocrito (Hto), Volumen Globular Medio (VGM) Concentración Media de Hb (HCM) y Hemoglobina Corpuscular Media (CHMB).

C). PREPARACION DEL HEMOLIZADO.

Se lavaron los eritrocitos tres veces con solución - salina al 0.85%. A cada mililitro del paquete de eritrocitos se agregó 1 ml. de agua y 0.4 ml. de tetracloruro de carbono, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3,000 - rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se recuperó sin --

tocar los estromas.

D). CUANTIFICACION DE HbF. METODO DE BETKE (44).

El método consiste en desnaturalizar la HbA y la HbA₂ durante 2 minutos con un alcalí deteniendo la reacción con una sal de amonio.

Agregar de 200-300 ml. de hemolizado a un tubo que contiene 10 l. de solución de Drabkin pH 7.2 (200 mg. de K₃Fe(CN)₆, 50 mg. de KCN, 140 mg. de KH₂PO₄ para 1000 ml. de agua), mezclar, llevar a 20°C. y pipetear en tres tubos (dos problemas y un control) 3 ml. de la mezcla. Añadir a cada tubo problema 0.2 ml. (200 µl) de NaOH 1.28N que ha sido guardado en congelación, 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 a pH 7.0, mezclar vigorosamente y dejar en reposo diez minutos. Adicionar al tubo control 0.2 ml. (200 µl) de agua destilada y 2 ml. de solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0, mezclar bien y dejar en reposo diez minutos. Filtrar con papel filtro Schleicher & Schuell 589³; diluir 1 ml. del filtrado control con 4 ml. de agua destilada. Determinar la densidad óptica a 540 nm. El porcentaje se obtiene como sigue:

$$\% \text{ HbF} = \frac{\text{D.O. HbF}}{\text{D.O. Hb Control} \times 5} \times 100$$

E). CUANTIFICACION DE HbF. METODO DE SINGER (45).

El método se fundamenta en la desnaturalización de -

la HbA y HbA₂ mediante un alcalí durante 1 minuto dete--
niendo la reacción con una sal de amonio.

En dos tubos problema se colocan 1.6 ml. de NaOH ó -
KOH 0.0833 N y se llevan a 20°C. Se adiciona 0.1 ml. --
(100 μl) del hemolizado agitando continuamente durante 20
segundos y 40 segundos después agregar 3.4 ml. de solu--
ción saturada de sulfato de amonio al 50% (400 ml. de so-
lución saturada de sulfato de amonio + 400 ml. de agua --
destilada + 2 ml. de HCl 10 N) pH 3.6, agitar vigorosamen
te y a los 30 minutos de reposo filtrar con papel filtro-
Schleicher & Schuell 589³. Al tubo control se le agregan
5 ml. de agua destilada y 20 μl de hemolizado. Las mues-
tras se leen en espectrofotómetro a 540 manómetros (nm) y
se calcula el porcentaje de HbF mediante la fórmula:

$$\% \text{ HbF} = \frac{\text{D.O. HbF}}{\text{D.O. Hb Total}} \times 0.203 \times 100$$

F). CUANTIFICACION DE Hb A₂ (46).

La técnica consiste en separar por micromatografía -
de intercambio aniónico la HbA₂ de la Hb Total mediante -
un gradiente de pH.

La DEAE celulosa (DE-52) se lava 3 veces con una so-
lución amortiguadora pH 8.0 (7 ml. de TRIS 1 M + 25 ml. -
de KCN 4 mg/ml + 700-800 ml. de agua destilada, ajustar -
pH con HCl 3 N y aforar a 1000 ml. con agua destilada). -
La resina diluída en este amortiguador 1:10 v/v se empa
ca en pipetas Pasteur hasta una altura aproximada de 4 cm.,-

se pasan 5 ml. de amortiguador pH 8.0 para equilibrar la resina. En seguida se mezcla una gota de hemolizado con 5 gotas de solución amortiguadora pH 8.0 y se coloca en la parte superior de la resina; una vez que la hemoglobina entra en la resina, se llena la parte superior con la solución TRIS/KCN pH 8.0. La Hb A₂ se eluye con solución amortiguadora pH 7.4 (preparada de igual forma que la anterior, ajustando a pH 7.4). La hemoglobina restante se eluye con solución amortiguadora pH 7.0 (50 ml. de TRIS 1 M + 25 ml. de KCN 4mg/ml + 700-800 ml. de agua destilada, ajustar pH 7.0 con HCl 3 N y se afora a 1000 ml. con agua destilada). Los eluatos de Hb A₂ y de la Hb restante se aforan a 5 ml. y 25 ml. respectivamente con agua o con las soluciones amortiguadoras correspondientes.

Se mide la densidad óptica a 415 nm y se obtiene el porcentaje por la fórmula:

$$\% \text{ HbA}_2 = \frac{\text{D.O. HbA}_2 \times 100}{\text{D.O. HbA}_2 + (5) (\text{D.O. HbR})}$$

HbR - Hb Restante

G). ELECTROFORESIS DE Hbs. EN ACETATO DE CELULOSA pH 8.4.

(47).

Las hemoglobinas normales tienen una carga neta que permite diferenciarlas perfectamente a pH 8.4, un cambio de un aminoácido en cualquiera de las cadenas que modifique la carga neta de la molécula cambia el patrón electroforético correspondiente.

Se prepara una solución buffer con Tris-EDTA-Borato (10.2 gr. Tris + 0.60 gr. EDTA disódica + 3.2 gr. ácido bórico para 1000 ml. de agua destilada) a pH 8.4 en la cual se sumerge una membrana de acetato de celulosa durante 15 minutos, se seca con papel absorbente y se coloca en el soporte de la cámara (equipo microzona). Se aplica la muestra previamente hemolizada en posición catódica, se realiza el corrimiento a 200-400 V por 30 minutos, el voltaje o el tiempo pueden ser modificados según se requiera, pero el amperaje debe ser entre 2-4 MA. Una vez concluido el corrimiento, la membrana se sumerge en colorante Ponceau durante 5 minutos para revelar y se lava con ácido acético al 5% según el método de Schneider.

H). PRECIPITACION DE HbF.

La precipitación de HbF se lleva a cabo a partir de 25 ml. de eluato de HbF obtenido por el método de Singer y 0.15 mg. de ácido Sulfosalicílico. Una vez precipitada la proteína, se centrifuga a 3,500 rpm durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante el cual contiene las sales (Sulfato de Amonio e Hidróxido de Sodio) el botón de proteínas se lava con agua destilada y se centrifuga nuevamente a los mismos tiempo y velocidad hasta eliminar completamente las sales (de 3 a 4 veces). El botón de proteína ya lavada se somete a tratamiento para la separación de las cadenas globínicas en geles de poliacrilamida.

I). DETERMINACION DE CADENAS γ^B/γ^A (48).

El Triton x 100 (detergente no iónico) secuestra la cadena que porta el aminoácido hidrofóbico Alanina permitiendo de esta manera su separación de la cadena que contiene el aminoácido hidrofílico Glicina.

Este método consta de 2 geles, un gel de condensación y otro de separación; gel de separación: 9.13 ml. de Urea 8 M son mezclados con 0.25 ml. de Triton x 100, una vez disuelto, se agregan 2.5 ml. de acrilamida-bisacrilamida (3.5 gr/ 40 mg/ 7 ml. de agua destilada), se añaden 0.625 ml. de ácido acético glacial, mezclar. Posteriormente agregar 0.37 ml. de Persulfato de amonio (60 mgr/2 ml. de agua destilada) y 75 μ l de Temed (N-N'-N'-N'-tetrametilendiamino), mezclar y colocar en la placa y esperar a que gelifique. El gel de condensación consta de: 3.51 ml. de Urea 8 M y 0.10 ml. de Triton x 100, una vez disuelto, se agregan 0.95 ml. de acrilamida-bisacrilamida, enseguida agregar 0.25 ml. de ácido acético glacial y después 0.15 ml. de Persulfato de amonio y 50 μ l de Temed, mezclar y colocar en la placa sobre el gel de separación y esperar a que gelifique, dejar el gel a temperatura ambiente en cámara húmeda para ser utilizado al día siguiente. Se realizan 3 corrimientos electroforéticos hacia el cátodo: el primero se efectúa colocando en el punto de aplicación de la muestra ácido acético al 5% y se corre durante 25 minutos a 250 Volts, el segundo se realiza con 10 μ l de Cistamina 1 M (113.6 mg /ml. o 11.3 mg /100 μ l)-

se corre a 150 Volts por 25 minutos y se remueve el buffer del ánodo. Para el tercer corrimiento se aplican 20 μ l de la muestra previamente precipitada y lavada, a la que se le añaden 200 μ l de buffer (0.5 ml. de Urea 8 M - 50 μ l de β - Mercaptoetanol + 50 μ l de ácido acético + 20 μ l de Pironina Y) después de haber removido la Cistamina y renovado el buffer del ánodo, el corrimiento se realiza a 90 Volts durante 5 horas. Terminado el corrimiento se tiñe el gel con Azul de Commassie R al 0.5% en ácido acético al 7% y metanol al 30% durante 30 minutos. El gel se destiñe con una solución de ácido acético al 7% y metanol al 30% hasta decolorar. Las bandas se grafican en un Densitómetro Beckman modelo R-112 a 600 nm.

El porcentaje de cadenas γ^B y γ^A y la relación de cadenas se calcula a partir del área de cadenas γ en el densitograma del gel de poliacrilamida usando las siguientes fórmulas:

$$\% \gamma^B = \left(\frac{\text{Area } \gamma^B}{\text{Area } \gamma^{B+A}} \right) \times 100.$$

$$\% \gamma^A = 100 - \% \gamma^B.$$

$$\gamma^B / \gamma^A = \frac{\% \gamma^B}{\% \gamma^A}.$$

VIII. RESULTADOS

Se analizó un grupo similar de niños con LLA-L1 y LLA-2 (29 y 31 respectivamente) obtenidos al azar, sin embargo es interesante señalar que en el grupo de LLA-L1 se observó una predominancia de niños (20 masculinos y 9 femeninos versus 16 masculinos y 15 femeninos para LLA-L2).

Como se observa en la Tabla III, los resultados de HbF fueron similares en ambos grupos por los dos métodos (\bar{x} HbF B: 2.19% y 2.04% y \bar{x} HbF S: 2.01% y 2.10% para LLA-L1 y LLA-L2 respectivamente); sin embargo ambos grupos mostraron ser estadísticamente diferentes del grupo Control (\bar{x} HbF B: 0.89% y HbF S: 0.95%). El porcentaje promedio de cadenas γ^f para LLA-L1 fue de 50.96% y para LLA-L2 de 37.53%; el análisis estadístico (t de student) mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre ambos grupos; en el grupo Control el porcentaje promedio fue de 42.69%, la t de student del grupo Control contra LLA-L1 mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) mientras que contra LLA-L2 no se observó significancia (Tabla III). La relación de cadenas γ^f / γ^a fue de 1.23 para LLA-L1, 0.66 para LLA-L2 y 0.76 para el grupo Control, los resultados de las pruebas estadísticas fueron concordantes con los observados en los porcentajes de γ^f es decir diferencias significativas entre LLA-L1 y LLA-L2 ($p < 0.01$) y entre LLA-L1 y Control ($p < 0.01$) pero no entre LLA-L2 y Control. La HbA₂ mostró valores muy similares en LLA-L1, LLA-L2 y Control.

Los parámetros hematológicos GB, GR, Hb, Hto, VGM, HCM y CMHB mostraron valores muy similares en LLA-L1 y LLA-L2 (Tabla IV) sin embargo al compararlos contra el grupo control sólo GB, GR, Hb y Hto en LLA-L1 mostraron valores significativamente menores ($p < 0.05$, < 0.01 , < 0.01 y < 0.01 respectivamente). En el análisis del grupo LLA-L2 contra el grupo Control sólo GR, VGM y HCM mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$, < 0.05 y < 0.01 respectivamente) GR con valores más bajos y VGM y HCM más altos. Estos resultados indican que no existen diferencias hematológicas significativas entre los dos subtipos de LLA; sin embargo el grupo LLA-L1 presenta un menor número de GR, lo que da lugar a un paquete de eritrocitos menor que en el grupo LLA-L2 en el que se observa que los GR son de menor tamaño (VGM) y menor contenido de Hb(HCM) lo que hace un mayor paquete de eritrocitos.

La HbF por ambos métodos en los tres subgrupos analizados por subgrupo de edad (Tabla V) se observa lo esperado entre LLA-L1 y LLA-L2, es decir no hay diferencias para ninguno de los subgrupos (p_1); por otra parte al analizar LLA-L1 y LLA-L2 contra el grupo Control (p_2 y p_3 respectivamente) los subgrupos de 6-10 años y 11-18 años mostraron las diferencias esperadas, mientras que el análisis con el subgrupo de 0-5 años no mostró diferencias significativas a pesar de observarse valores más elevados tanto en LLA-L1 como en LLA-L2; estos resultados pueden -

ser debidos a que en este subgrupo la n para los grupos - LLA-L2 y Control es pequeña.

En cuanto a la relación de las cadenas γ^F/γ^A de la - HbF (Tabla VI) puede observarse que es muy similar en los grupos LLA-L2 y Control con una menor síntesis de γ^F que - γ^A en los tres subgrupos, mientras que en el grupo LLA-L1, en el subgrupo de 6-10 años predomina la expresión de γ^F - sobre γ^A y los subgrupos restantes muestran un comporta- - miento similar a los grupos LLA-L2 y Control, lo que im- - plica que en este subtipo de Leucemia existan factores -- edad dependientes que modifican la expresión de los genes γ^F que ameritan investigaciones posteriores.

El análisis de los parámetros hematológicos por sub- grupo (Tablas VII, VIII y IX) no mostró diferencias signi- ficativas entre LLA-L1 y LLA-L2 excepto en el subgrupo de 0-5 años para Hb ($p < 0.02$) con valores más bajos en LLA- - L2. Al comparar LLA-L1 contra el grupo Control se obser- varon las siguientes diferencias: en el subgrupo de 0-5 - años para GR ($p < 0.01$) en el subgrupo de 6-10 años para - GB y VGM ($p < 0.02$ y < 0.01 respectivamente) y en el subgru- po de 11-18 años para GB y Hb ($p < 0.02$ y 0.05 respectiva- mente); mientras que LLA-L2 contra el grupo Control mos- tró: para el subgrupo de 0-5 años diferencias en GB y Hb- ($p < 0.05$ y < 0.02 respectivamente) para el subgrupo de -- 6-10 años diferencias para HCM ($p < 0.01$), finalmente para el subgrupo de 11-17 años sólo se observaron diferencias-

en GB ($p < 0.02$).

Los patrones electroforéticos de los niños estudiados fueron normales excepto en un niño con LLA-L1 y Síndrome de Down cuyo patrón electroforético mostró una banda de Hb rápida.

La distribución de los valores de γ^F de acuerdo al porcentaje de casos observados fue heterogénea (Fig. 9, 10, 11). Así, mientras que en el grupo LLA-L1 se observa una marcada distribución hacia la derecha, lo que significa valores más altos de γ^F (Fig. 9) en LLA-L2 la distribución de la mayoría de los casos tiende a la izquierda y por supuesto a valores menores de γ^F (Fig. 10). En el grupo Control la distribución es más homogénea con valores de γ^F entre 30 y 50% (Fig. 11).

TABLA III. Valores de HbF por los métodos de Betke y Singer, porcentaje de γ^F y relación de cadenas γ^F/γ^A y de HbA₂ en los grupos LLA-L1, LLA-L2 y Control. Los valores de p se obtuvieron de acuerdo a la prueba t de student.

GRUPO TOTAL		HbF B %	HbF S %	γ^F %	γ^F/γ^A	HbA ₂ %
LLA-L1	\bar{x}	2.19	2.01	50.96	1.23	2.52
	s	1.5	1.24	11.57	0.71	0.94
	n	29	29	24	24	26
LLA-L2	\bar{x}	2.04	2.10	37.53	0.66	2.37
	s	1.19	1.48	12.67	0.35	0.71
	n	31	31	24	24	31
Control	\bar{x}	0.89	0.95	42.69	0.76	2.30
	s	0.35	0.57	6.48	0.19	0.69
	n	23	25	22	22	24
Valores de p	p ₁	NS	NS	< 0.001	< 0.01	NS
	p ₂	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.01	NS
	p ₃	< 0.001	< 0.001	NS	NS	NS
<p>p₁ = LLA-L1 versus LLA-L2. p₂ = LLA-L1 versus Control. p₃ = LLA-L2 versus Control.</p>						

TABLA IV. Valores hematológicos obtenidos en el contador electrónico Coulter de los grupos LLA-L1, LLA-L2 y Control. Los valores de p se obtuvieron de acuerdo a la prueba t de student.

GRUPO TOTAL	GB $\times 10^3$	GR $\times 10^6$	Hb g/dl	Hto %	VGM fl	HCM pg	CHMB %
\bar{x}	6.78	4.24	12.53	38.52	89.72	29.42	32.67
LLA-L1 s	4.17	0.63	1.82	6.15	9.65	2.43	1.62
n	20	18	24	24	21	17	23
\bar{x}	7.65	4.45	12.76	40.42	93.57	30.87	32.74
LLA-L2 s	12.91	0.83	2.41	6.4	7.48	1.84	1.49
n	22	18	25	22	21	14	24
\bar{x}	9.81	4.90	13.80	42.70	89.00	28.60	32.0
Control s	2.94	0.10	1.1	3.3	5.4	2.2	1.2
n	24	20	25	23	20	20	23
Valores de p	P ₁	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	P ₂	< 0.05	< 0.001	< 0.01	< 0.01	NS	NS
	P ₃	NS	< 0.05	NS	NS	< 0.05	< 0.01
<p>P₁ = LLA-L1 versus LLA-L2. P₂ = LLA-L1 versus Control. P₃ = LLA-L2 versus Control.</p>							

TABLA V. Valores de HbF por los métodos de Betke y Singer, de los grupos LLA-L1, LLA-L2 y Control. Los valores de p se obtuvieron de acuerdo a la prueba t de student.

GRUPO EDAD (años)	LLA-L1		LLA-L2		Control				
	HbFB %	HbFS %	HbFB %	HbFS %	HbFB %	HbFS %			
0-5	\bar{x}	2.02	2.03	\bar{x}	1.95	2.01	x	0.85	1.52
	s	1.33	1.55	s	1.47	1.39	s	0.40	1.0
	n	11	11	n	4	4	n	3	4
	p ₁	NS	NS	p ₃	NS	NS	-	-	-
	p ₂	NS	NS				-	-	-
6-10	\bar{x}	2.47	1.83	\bar{x}	1.88	1.67	x	0.90	0.81
	s	1.94	0.93	s	0.82	0.75	s	0.40	0.29
	n	10	10	n	15	15	n	11	11
	p ₁	NS	NS	p ₃	<0.01	<0.01	-	-	-
	p ₂	<0.02	<0.01				-	-	-
11-18	\bar{x}	2.02	2.19	\bar{x}	2.34	2.68	x	0.89	0.86
	s	1.24	1.30	s	1.49	2.03	s	0.32	0.51
	n	8	8	n	12	12	n	9	10
	p ₁	NS	NS	p ₃	<0.02	<0.02	-	-	-
	p ₂	<0.02	<0.01				-	-	-
<p>p₁ = LLA-L1 versus LLA-L2. p₂ = LLA-L1 versus Control. p₃ = LLA-L2 versus Control.</p>									

TABLA VI. Valores de γ^b y relación de cadenas γ^b/γ^a en los grupos LLA-L1, LLA-L2 y Control. Los valores de p se obtuvieron de acuerdo a la prueba t de student.

GRUPO EDAD (años)	LLA-L1		LLA-L2		Control				
	γ^b %	γ^b/γ^a	γ^b %	γ^b/γ^a	γ^b %	γ^b/γ^a			
0-5	\bar{x}	47.91	1.02	x	22.8	0.29	x	45.56	0.84
	s	12.49	0.50	s	1.69	0.028	s	6.5	0.21
	n	10	10	n	2	2	n	3	3
	p_1	< 0.05	< NS	p_3	< 0.02	NS	-	-	-
	p_2	NS	NS	-	-	-	-	-	
6-10	\bar{x}	57.48	1.62	x	39.7	0.70	x	40.60	0.70
	s	16.42	0.84	s	11.17	0.29	s	6.94	0.20
	n	8	8	n	12	12	n	10	10
	p_1	< 0.01	< 0.01	p_3	NS	NS	-	-	-
	p_2	< 0.01	< 0.01	-	-	-	-	-	
11-18	\bar{x}	46.68	1.03	x	37.88	0.68	x	43.95	0.84
	s	15.44	0.71	s	14.24	0.42	s	5.97	0.28
	n	6	6	n	10	10	n	9	9
	p_1	NS	NS	p_3	NS	NS	-	-	-
	p_2	NS	NS	-	-	-	-	-	
p_1 = LLA-L1 versus LLA-L2. p_2 = LLA-L1 versus Control. p_3 = LLA-L2 versus Control.									

TABLA VII. Valores hematológicos de los niños con LLA-L1.
Los valores de p se obtuvieron de acuerdo a -
la prueba t de student.

EDAD (años)		GB $\times 10^3$	GR $\times 10^6$	Hb g/dl	Hto %	VGM fl	HCM pg	CMHG %
0-5	x	8.64	4.21	12.28	38.11	85.44	28.42	32.4
	s	6.61	0.56	1.28	5.92	5.24	2.16	2.1
	n	7	9	9	9	9	7	9
	p ₁	NS	-	< 0.02	-	NS	-	NS
	p ₂	NS	< 0.01	NS	NS	NS	NS	NS
6-10	x	6.0	4.35	12.71	38.71	92.12	29.93	33.55
	s	1.75	0.78	2.49	7.86	1.88	2.06	1.37
	n	8	6	9	9	8	6	8
	p ₁	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	p ₂	< 0.02	NS	NS	NS	< 0.01	NS	NS
11-15	x	5.42	4.12	12.65	38.85	94.75	30.4	32.46
	s	1.43	0.72	1.56	4.31	10.68	3.32	1.15
	n	5	3	6	6	4	4	6
	p ₁	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	p ₂	< 0.02	NS	< 0.05	NS	NS	NS	NS
<p>p₁ = LLA-L1 versus LLA-L2.</p> <p>p₂ = LLA-L1 versus grupo Control.</p>								

TABLA VIII. Valores hematológicos de los niños con LLA-L2.

Los valores de p se obtuvieron de acuerdo a la prueba t de student.

EDAD (años)		GB ₃ x10 ³	GR ₆ x10 ⁶	Hb g/dl	Hto %	VGM fl	HCM pg	CHCM %
0-5	x	4.65	-	9.35	-	84.5	-	33.0
	s	1.34	-	0.49	-	9.19	-	0
	n	2	-	2	-	2	-	2
	P ₁	NS	-	< 0.02	-	NS	-	NS
	P ₂	< 0.05	-	< 0.02	-	NS	-	NS
6-10	x	10.52	4.6	12.81	40.39	93.44	31.11	32.9
	s	19.18	1.05	2.51	6.95	61.78	1.97	1.58
	n	10	9	12	11	9	6	11
	P ₁	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	P ₂	NS	NS	NS	NS	NS	< 0.01	NS
11-17	x	5.41	4.29	13.24	36.73	87.4	30.78	32.54
	s	2.11	0.57	2.08	12.3	28.71	1.98	1.58
	n	10	9	11	11	10	7	14
	P ₁	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	P ₂	< 0.02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P ₁ = LLA-L2 versus LLA-L1.								
P ₂ = LLA-L2 versus grupo Control.								

TABLA IX. Valores hematológicos de los niños del grupo - Control. Los valores de p se obtuvieron de -- acuerdo a la prueba t de student.

EDAD (años)		GB $\times 10^3$	GR $\times 10^6$	Hb gm	Hto %	VGM fl	HCM pg	CHCM %
0-5	x	9.3	5.38	13.2	42.2	82	26	31.6
	s	1.6	0.35	1.2	2.3	5.4	2.8	2.1
	n	4	4	4	4	4	4	4
	p ₁	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	p ₂	< 0.05	-	< 0.02	< NS	< NS	-	NS
6-10	x	10.4	4.82	13.5	42.2	89	28.4	31.9
	s	3.8	0.32	0.91	2.4	2.1	1.0	1.1
	n	10	7	11	9	7	7	9
	p ₁	< 0.01	< NS	NS	NS	< 0.01	NS	NS
	p ₂	NS	NS	NS	NS	NS	< 0.01	NS
11-17	x	7.7	4.76	14.3	43.4	92	29.9	32.2
	s	1.6	0.36	1.1	4.3	4.1	1.7	0.9
	n	10	9	10	10	9	9	9
	p ₁	< 0.02	NS	< 0.05	NS	NS	NS	NS
	p ₂	< 0.02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<p>p₁ = Grupo Control versus LLA-L1.</p> <p>p₂ = Grupo Control versus LLA-L2.</p>								

FIGURA 9
DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE GAMMA-G
DE ACUERDO AL PORCENTAJE DE CASOS
OBSERVADOS EN EL GRUPO LLA-L1

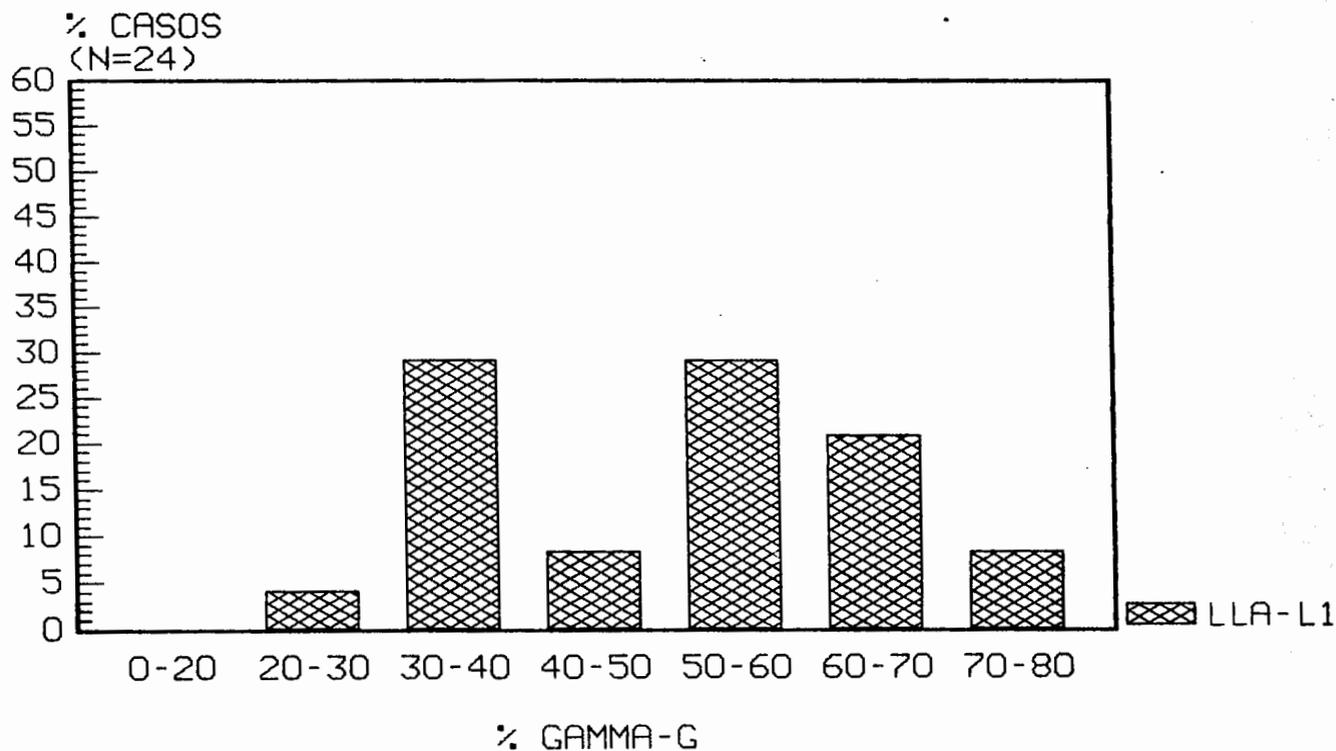


FIGURA 10
DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE GAMMA-G
DE ACUERDO AL PORCENTAJE DE CASOS
OBSERVADOS EN EL GRUPO LLA-L2

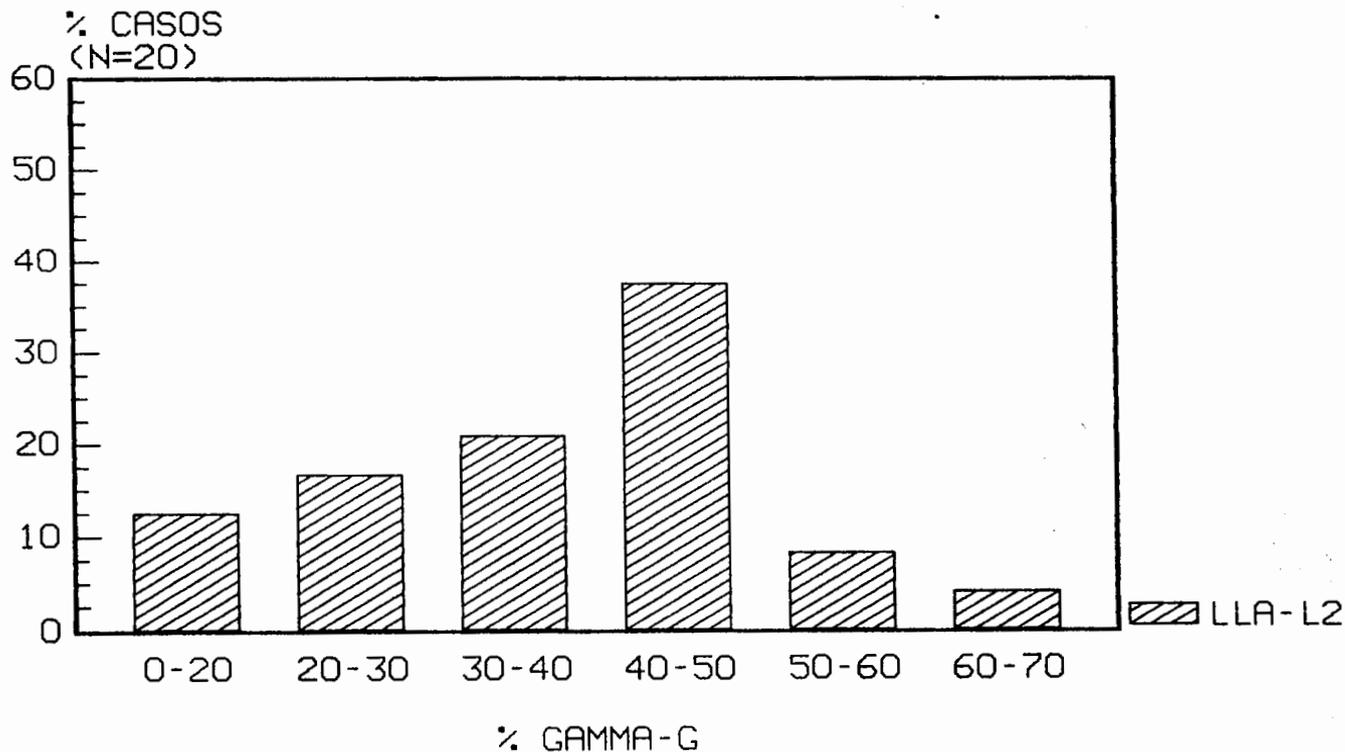
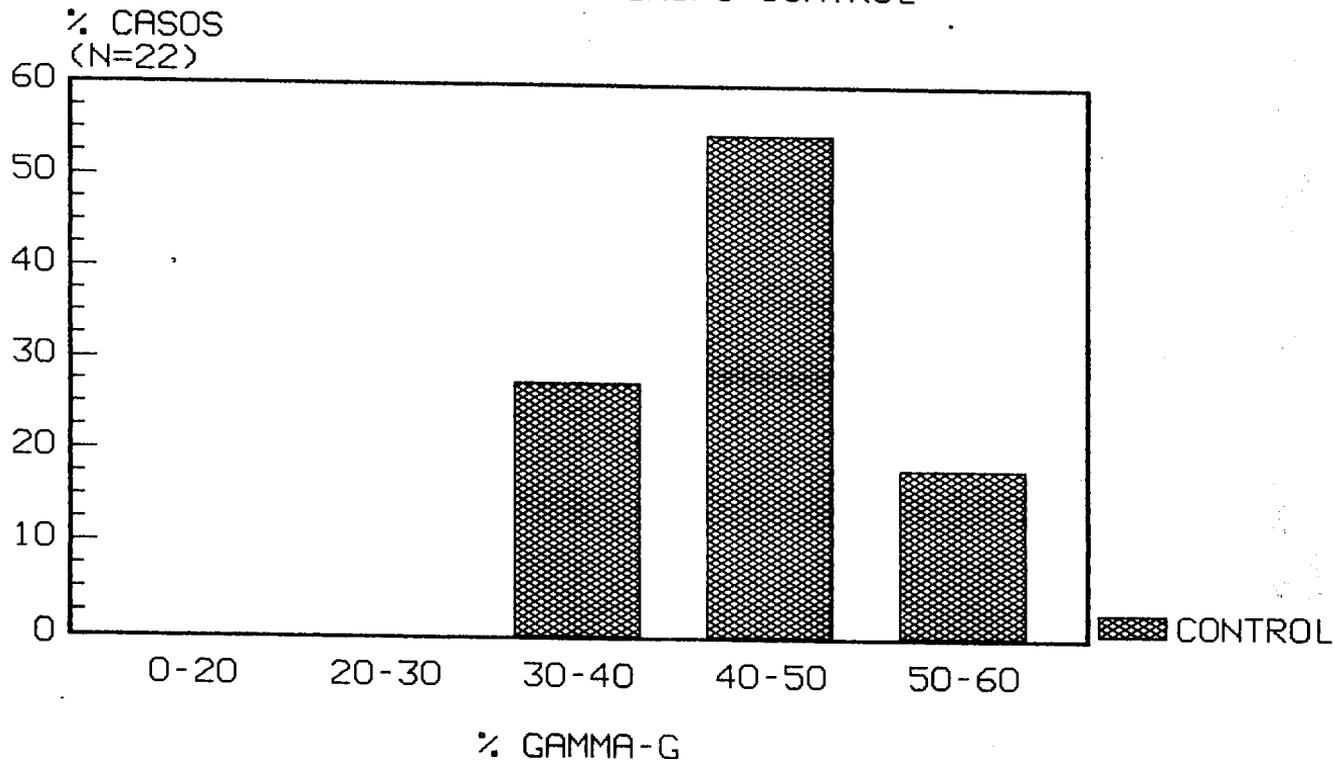


FIGURA 11
DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE GAMMA-G
DE ACUERDO AL PORCENTAJE DE CASOS
OBSERVADOS EN EL GRUPO CONTROL



IX. DISCUSSION

No existen antecedentes en la literatura de estudios de HbF en LLA, según el subtipo morfológico o inmunológico de neoplasia por lo que la importancia del presente -- trabajo radica en el análisis de esta hemoglobina en LLA-L1 y LLA-L2 enriquecida además con el conocimiento de la expresión diferencial de los genes γ^F y γ^A . La HbF mostró valores muy similares en LLA-L1 y LLA-L2 aún analizados - por subgrupos de edad (Tablas III y V) lo que nos conduce a pensar, que en los dos subtipos de neoplasia existan -- factores similares que influyen en el incremento de esta hemoglobina.

Estudios anteriores han mostrado que la HbF se en-- cuenta elevada en leucemias (20-23). Becerra y Cols estu-- diaron un grupo de adultos con leucemias (41) y Montes y Cols (42) un grupo de niños con LLA y otro con LNL (Leuce-- mia no Linfoblástica) y encontraron que en los niños el - incremento de HbF es mayor que en adultos (\bar{x} HbF B 3.07%- LLA, 2.54% LNL, y 1.26% en adultos. HbF S 2.61% LLA, --- 3.67% LNL y 1.65% en adultos). La evaluación estadística- (t de student) de los niveles de HbF encontrados en la - presente tesis y los niños estudiados por Montes y Cols - (42) no mostró diferencias significativas.

La determinación de las cadenas δ^F y δ^A de la HbF se - ha realizado principalmente en muestras con alto contenido de HbF ($\geq 10\%$) por cromatografía líquida de alta presión- (47) por cromatografía en DEAE celulosa de los péptidos -

específicos de δ^F y δ^A (49) y por separación electroforética de las cadenas globínicas en geles de poliacrilamida - con Tritón x 100 (48), por esta razón no existen reportes de la composición de la HbF en individuos que presentan cantidades pequeñas (<5%) de esta proteína. En el presente trabajo se implementó una metodología nueva de fácil aplicación que permite la determinación de las cadenas γ^F y δ^A utilizando los eluatos obtenidos de las mediciones de esta hemoglobina por los métodos de Betke y Singer, de los cuales se puede obtener suficiente proteína para ser analizada en geles de poliacrilamida.

La expresión de los genes γ^F y δ^A en LLA-L1 y LLA-L2 fue diferente ($p < 0.001$) con predominio de γ^F en LLA-L1 (50.96%) y de δ^A en LLA-L2 (62.47%); al comparar estos resultados con el grupo Control (42.69% de γ^F), LLA-L1 mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) y LLA-L2 no. Estas diferencias en la expresión de γ^F y δ^A no guardan relación con el contenido total de HbF ya que LLA-L1 y LLA-L2 mostraron valores muy similares (Tabla III) y pudiesen ser el resultado de un efecto diferente de los oncogenes sobre las células hematopoyéticas ya que se ha descrito un patrón particular en LLA-L1 y LLA-L2 principalmente de c-myc y c-myb (31) lo que implicaría que este efecto repercutiese en el proceso de diferenciación de la célula eritroide activando preferencialmente clonas específicas de células F con diferente contenido de γ^F/δ^A o bien en -

el proceso de proliferación incrementando el número de células F de una clona particular, lo que en cada caso significaría que existen subclonas de células F, un fenómeno que no se ha conceptualizado anteriormente ya que en la literatura se describen sólo dos tipos celulares eritroides; células F como únicas productoras de HbF (además de HbA y HbA₂) y células A que no sintetizan HbF. Por lo tanto los datos del presente trabajo sugieren que existen además subclonas de células F diferenciables por su expresión de los genes δ^s y δ^a con predominio de unas en LLA-L1 y de otras en LLA-L2; si bien no se puede descartar el hecho de que los factores neoplásicos de LLA-L1 y LLA-L2 actúen sobre las mismas células F activando in situ los genes δ^s ó δ^a preferencialmente.

De acuerdo con la literatura, el porcentaje de cadenas en el RN se observa con un promedio de 70-75% (1,50) mientras que en los adultos el promedio es de 40% (1,50); en el presente trabajo el grupo Control presentó una media de 42.69%, valor muy similar al del adulto debido a que en los niños estudiados el reemplazo de HbF por HbA ya se completó, su curva de distribución es muy homogénea (Fig. 11) con valores de 30 a 60%. Al analizar la distribución de los valores en LLA-L1 (Fig. 9) y LLA-L2 (Fig. 10), se observó que en ambos grupos el 66.6% de los casos (16/24) caen dentro de los valores del grupo Control, pero que el 29.2% de los pacientes con LLA-L1 (7/24) mostra

ron valores más elevados de γ^6 que en el Control (similares a RN) y el mismo porcentaje de pacientes con LLA-L2 - mostraron valores abajo de los observados en el grupo Control, lo que sugiere que en ambos subtipos de LLA existe heterogeneidad en la expresión de estos genes lo que amerita nuevas investigaciones utilizando una clasificación-inmunológica considerando además los niveles de los oncogenes que se expresan en esta neoplasia. Es interesante señalar que en el grupo total del presente trabajo el rango de γ^6 fue de 17 a 73%; mientras que el análisis de las cadenas γ^6 en LLA descrito por Achille y Cols (43) refiere un rango de 25 a 80% si bien en este reporte no se analizó el subtipo de LLA y los resultados no pueden ser comparados con los de nuestro estudio, estos datos apoyan la idea de que existe una heterogeneidad en la expresión de los genes γ^6 en LLA.

X. CONCLUSIONES

- 1.- Los niños con LLA presentan valores de HbF más elevados que los niños sanos.
- 2.- El incremento de la HbF en niños con LLA es independiente de la edad y del subtipo de neoplasia.
- 3.- Los niños con LLA-L1 mostraron niveles más elevados de δ^F que los niños con LLA-L2, con relación de cadenas similar al RN para LLA-L1 y al adulto para LLA-L2, lo que demuestra que existe heterogeneidad en la expresión de los genes globínicos γ .
- 4.- Los parámetros hematológicos analizados son similares en los niños con LLA-L1 y LLA-L2 e independientes de la edad.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Bunn H.F., Forget B.G.: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. W.B. Saunders Company, -- 1986.
- 2.- Dickerson R.E., Geis I.: Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC., 1983.
- 3.- Vázquez-García L.: Zoología del phylum Arthropoda.- Edit. Interamericana; 6a. edición. México, D.F., -- 1987.
- 4.- Barnes R.D.: Zoología de los invertebrados. Edit. Interamericana; 4a. edición. México, D.F., 1987.
- 5.- Lenhinger A.L.: Bioquímica. Ediciones Omega; 2a. edición. Barcelona, 1985.
- 6.- Karlsson S., Nienhuis A.W.: Developmental regulation of human globin genes. Ann. Rev. Biochem. 54: 1071 - 1107, 1985.
- 7.- Hill A.V.S., Wainscoat J.S.: The evolution of the α - and β globin cluster in human populations. Hum Genet- 74: 16-24, 1986.
- 8.- Higgs D.R., Vickers M.A., Wilkie A.O.M., Petrouris - I.M., Jorman A.P., Weatherall D.J.: A review of the molecular genetic of the human α globin Gene Cluster. Blood 73:1081-1104, 1989.
- 9.- Kittur S.D., Hoppener J.W.M., Antonarakis S.E., Daniëls J.D.J., Meyers D.A., Maestri N.E., Jansen M., Korneluk R.G., Nelkin B.D., Kazazian H.H.: Linkage -

map of the short arm of human chromosome 11:location of the genes for catalase, calcitonin and insuline - like growth factor II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :5064-5067, 1985.

- 10.- Enver T., Ebens A.J., Forrester W.C., Stamatoyannopoulos G.: The human β - globin locus activation regions alters the developmental fate of a human fetal globin gene in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7033-7037, 1989.
- 11.- Stamatoyannopoulos G., Constantoulakis P., Brice M.-B., Kurachi S., Papayannopoulou T.: Coexpression of-embryonic, Fetal and Adult Globins in Erythroid --- Cells of Human Embryos: Relevance to the cell-linea_ ge Models of globin Switching. Developmental Biology 123:191-197,1987.
- 12.- Umemura T., Al-Khatti A., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G.: Fetal hemoglobin synthesis in vivo: Diret evidence for control at the level of erythoid-progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9278-9282, 1988.
- 13.- Groudine M., Peretz M., Nakamoto B., Papayannopoulou T.: The modulation of HbF synthesis in adult eryth--roid progenitor (burst-forming unit) cultures refle-cts changes in ζ -gene transcription and chromatin --structure. Proc. Natl. Acda. Sci. USA 83:6887-6891,-1986.

- 14.- Perrine S.P., Rudolph A., Faller D.V., Roman C., Cohen R.A., Chen S.J., Kan Y.W.: Butyrate infusions in the ovine fetus delay the biologic clock for globin-gene switchig. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8540 -- 8542, 1988.
- 15.- Weatherall D.V., Clegg J.B., Higgs D.R., Wood W.G.: - The hemoglobinopathies. In: the metabolic basis of - inherited disease. Scriver C.R., Beaudet A.L., Valle W.S.. Edit. Mc Graw-Hill 93:2281-2290, 1989.
- 16.- Gilman J.G., Huisman T.H.J.: DNA Sequence Variation - Associated with Elevated Fetal γ Globin Production. - Blood 66:783-787, 1985.
- 17.- Gilman J.G., Huisman T.H.J., Abels J.: Dutch β^0 -thalassaemia: a 10 kilobases DNA deletion with significant chain productions. Br. J. Haematol 56:339-348, - 1984.
- 18.- Gumucio D.L. et al.: Nuclear protein that bind human γ globin gene promoter: Alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary -- persistance of fetal hemoglobins. MOL CELL BIOL 8(12) :5310-5322, 1988.
- 19.- Wlok M., Kieselstein M., Brufman G.: Evaluation of - fetal hemoglobin in varios malignancies with referen - ce to the patients' Age. Tumor Biol 9:95-100, 1988.
- 20.- Shimizu K., Keino H., Terasawa T., Shichishima T., - Ikuta K., Hayashi Y.: Elevated Haemoglobin F in Juve

- nile and Adult Chronic Myelogenous Leukaemia. Acta -
Haematol 8:2833-2844, 1988.
- 21.- Maurer H.S., Vida L.N., Honiig G.R.: Similarities of
the erythrocytes in juvenile chronic myelogenous leu-
kaemia to fetal erythrocytes. Blood 39:778-784, 1972.
- 22.- Newman D.R., Pierre R.V., Linman J.W.: Studies on --
the Diagnostic Significance of Hemoglobins F Levels.
Mayo Clin Proc 48:199-202, 1973.
- 23.- Weatherall D.J., Clegg J.B., Wood W.G., Callender S.
T.: Foetal erythropoiesis in human leukaemia. Nature
257:710-712, 1975.
- 24.- Champlin R., Gale R.P.: Acute lymphoblastic leukemia:
Recent Advances in Biology and Therapy. Blood 73(8):
2051-2066, 1989.
- 25.- Silva Sosa M., Sedas T., Berumen G.: Leucemia aguda-
en el niño. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 28(4): 381-392,
1971.
- 26.- Bishop J.M. Oncogenes. Investigación y Ciencia. 68 :
52, 1982.
- 27.- Weinberg R.A.: A molecular Bases of cancer. Sci.Amer.
249(5): 126-142, 1983.
- 28.- Bishop J.M.: The Molecular Genetics of Cancer. Scien-
ce 235: 305-311, 1987.
- 29.- Chan V.T.W., McGee J.O.D.: Celular oncogenes in neo-
plasia. J.Clin. Pathol. 40:1055-1063, 1987.
- 30.- Park M. and Vande-woude G.F.: Oncogenes: Genes asso-

- ciated with neoplastic disease. In: The metabolic basis of inherited disease. Scriver C.R., Beudet A.L., Sly W.S. and Valle. Edit. Mc Graw-Hill. 5:251-276, 1989.
- 31.- Mavilio F., Sposi N.M., Petrini M., Bottero L., Marinucci M., De Rossi G., Amadori S., Mandelli F., Peschele C.: Expression of cellular oncogenes in primary cells from human acute leukemias. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4394-4398, 1986.
- 32.- Yokota J., Yokota Y.T., Battifora H., Le Fevre C., Cline M.J.: Alterations of myc, myb, and ras. Proto-oncogenes in cancers are frequent and Show Clinical-Correlation. Science 231:261-264, 1986.
- 33.- Boss J.L., Toksoz D., Marshall C.J., Verlaan de Vries M., Veeneman G.H., Van der Eb A.J., Van Boom J.H., Janssen J.W.G., Steenvoorden A.C.M.: Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute Myeloid leukemia. Nature 315:726-730, 1985.
- 34.- Eli M.B., Ahuya H., Foti A., Cline M.J.: N-RAS mutations in T-cell acute lymphocytic leukaemia: analysis by direct sequencing detects a novel mutation. British Journal of Haematology 72:36-39, 1989.
- 35.- Farr C.J., Saiki R.K., Erlich H.A., McCormick F., Marshall C.J.: Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and -

- oligonucleotide probes. Proc. Nat. Aca. Sci. USA 85: 1629-1633, 1988.
- 36.- Tokoz D., Farr C.J., Marshall C.J.: RAS genes and acute myeloid leukaemia. British Journal of Haematology 71: 1-6, 1989.
- 37.- Gambke C., Signer E., Moroni C.: Activation of N-ras gene in bone marrow cells from a patient with acute-myeloblastic leukaemia. Nature 307: 476-478, 1984.
- 38.- Eva A., Tronick S.R., Gol R.A., Pierce J.H., Aranson S.A.: Transforming genes of human hematopoietic-tumors: Frequent detection of ras-related oncogenes-whose activation appears to be independent of tumor-phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4926,1983.
- 39.- Liu E., Hjelle B., Morgan R., Hecht F., Bishop J.M.: Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia. Nature 330:186-188, 1987.
- 40.- Amson R., Sigaux F., Przedborski S., Flandrin G., Givol D., Tellerman A.: The human protooncogen product p 33 pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8857-8861, 1989.
- 41.- Becerra J.C.: Evaluación de la actividad de los genes globínicos gamma en pacientes con neoplasia. Tesis Reg. No. 80361807. Facultad de Ciencias (Biología). Universidad de Guadalajara, 1986.
- 42.- Montes J.: Evaluación de la HbF en niños con diferen

tes tipos de neoplasias. Tesis s/Reg., Facultad de -
Ciencias Químicas (Químico Farmaco Biólogo). Univer-
sidad de Guadalajara, 1988.

- 43.- Achille I. Pinto L., Di-Tullio M.T., Cutillo S.: -
Analysis of gamma globin chain composition in child-
hood acute lymphocytic leukemia (ALL). Haematologica
73 (6):445-448, 1988 (Resumen).
- 44.- Betke K., Marti H.R., Schicht I.: Estimation of ---
small percentage of foetal haemoglobin. Nature 184:-
1877-1878, 1959.
- 45.- Singer K., Chernoff A.I., Singer L.: Studies on ab--
normal hemoglobins. Their demonstration in sickle ---
cell anemia and other hematological disorders by --
means of alkali denaturation. Blood 6: 413, 1951.
- 46.- Efremov G.D., Huisman T.H.J., Bowman K., Wrightstone
R.N., Schoeder N.A.: Microchromatography by hemoglo
bins. II a rapid microchromatography method for the
determination of hemoglobin A₂. J.Lab. Clin. Med. --
83:657-664, 1974.
- 47.- Schneider R.G.: Differentiation of electrophoretic -
similar hemoglobins such as S.D.G. and P or A₂, C, E
and O by electrophoresis of the globin chains. Clin.
Chem. 20: 1111, 1974.
- 48.- Alter B.P., Goff S.C. et al.: Globin chain electro--
phoresis: A neq aproach to the determination of the-
 γ^F/γ^A ratio in the fetal haemoglobin and to studies

of globin synthesis. Br. J. Haematol 44: 527-534, -
1980.

- 49.- Huisman T.H.J., Jonxis J.H.P.: The hemoglobinopathies. Techniques of Identification. New York: Marcel Dekker, 1977.
- 50.- Ibarra B., Torres-Oliva A., Romero F., García Cruz-D., Hernández de Alba M., Galarza M., Martínez Orozco L.C., Franco-Gamboa E., Cantu J.M.: Hemoglobina fetal y relación de cadenas γ^v/γ^a en la detección de alteraciones de cadenas en el recién nacido. Sangre-31(6): 693-697, 1986.