

Año 1991-A Cod. 083479094  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACION DE VARIANTES DE LA  
HEMOGLOBINA MEDIANTE  
ISOELECTROENFOQUE EN PACIENTES CON  
ANEMIA HEMOLITICA Y EN POBLACION  
HOSPITALARIA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Licenciado en Biología

PRESENTA:

Juan Carlos Sánchez Ramírez

GUADALAJARA, JAL., MAYO DE 1994.

TESIS DE GRADO

**"IDENTIFICACION DE VARIANTES DE  
LA HEMOGLOBINA MEDIANTE  
ISOELECTROENFOQUE EN  
PACIENTES CON ANEMIA HEMOLITICA Y  
EN POBLACION HOSPITALARIA"**

PRESENTADA POR

**JUAN CARLOS SANCHEZ RAMIREZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE

L I C E N C I A D O   E N   B I O L O G I A

U N I V E R S I D A D   D E   G U A D A L A J A R A

Guadalajara, Jal. Mayo de 1994

**D E D I C A T O R I A S**

**A TI MADRE...**

**Por tu Cariño y Apoyo Incondicionado para Lograr esta  
Meta.**

**A PILI...**

**Por tu Amor y Apoyo.**

**A TI PEQUEÑO...**

**Que Eres la Ilusión de Nuestra Vida**

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

**A DIOS:**

**Por Darne la Oportunidad de Vivir.**

**A MIS HERMANOS:**

**Antonio, Bertha, Yolanda, Gabino, Alfonso, Mary y Alejandro.**

**Por su Apoyo Incondicional.**

**BETY IBARRA:**

**Por su Paciencia y Amistad.**

**JAVIER PEREA DIAZ:**

**Por su Enorme Ayuda Y Confianza.**

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:**

**Por su Amistad y Apoyo que de un Modo u Otro me  
Brindaron.**

**I N D I C E**

## I N D I C E

I INTRODUCCION .....	2
II ANTECEDENTES.....	3
II.I LA HEMOGLOBINA	
A. ESTRUCTURA Y FUNCION.	
A.1 ESTRUCTURA PRIMARIA, SECUNDARIA, TERCIARIA Y CUATERNARIA DE LA HEMOGLOBINA	
A.2 ESTRUCTURA DEL GRUPO HEMO.	
A.3 FUNCION DE LA HEMOGLOBINA.	
B. HEMOGLOBINAS HUMANAS NORMALES	
B.1 UBICACION CROMOSOMAL DE LOS GENES GLOBINICOS	
B.2 TIPOS DE HEMOGLOBINAS	
B.3 ONTOGENESIS DEL HUMANO.	
C. ALTERACIONES DE LA HEMOGLOBIN	
C.1 DEFECTOS EN SINTESIS (TALASEMIAS)	
C.2 DEFECTOS ESTRUCTURALES.	
D. METODOS ELECTROFORETICOS UTILIZADOS PARA DETECTAR VARIANTES DE LA Hb.	
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
IV HIPOTESIS.....	27
V OBJETIVOS.....	28
VI MATERIAL Y METODOS.....	29
VII RESULTADOS.....	34
VIII DISCUSION.....	36
IX CONCLUSIONES.....	39
X BIBLIOGRAFIA.....	40



**I   I N T R O D U C C I O N**

## I. INTRODUCCION

El estudio de la Hemoglobina (Hb) se ha convertido en un modelo importante para conocer la acción génica normal y anormal a nivel molecular, gracias a la facilidad con que se puede obtener y purificarse (1). La función principal de esta proteína es el transporte de oxígeno a los tejidos y facilitar su regreso en forma de bióxido de carbono a los pulmones (2).

Las hemoglobinopatías son el resultado de eventos mutacionales que originan: a) Alteraciones en síntesis (ej. las talasemias); b) Alteraciones en estructura (ej. la Hb S). Hasta 1992 se han descrito 780 variantes estructurales de la Hb (4). Un tercio de estas variantes muestran alteraciones en la función o estabilidad de la molécula que conducen a manifestaciones clínicas como: anemia hemolítica (AH), cianosis, policitemia, etc.

De acuerdo a su patología clínica las variantes estructurales, se han dividido en 4 grupos: a) Hb S, b) Hbs Inestables, c) Hbs con alta o baja afinidad al oxígeno, d) Metahemoglobinas (3).

De las variantes estructurales que no tienen manifestaciones clínicas, el 95% son debidas a sustitución de un aminoácido (aa) por otro que involucran un cambio de carga, lo que permite su identificación por electroforesis de rutina. Por otro lado, una proporción significativa,

aproximadamente el 45% de las variantes estructurales con manifestaciones clínicas tienen sustituciones de aa que no alteran la carga de la Hb, y no son detectadas por métodos electroforéticos convencionales (1).

**II    A N T E C E D E N T E S**

## II ANTECEDENTES

### II.I La Hemoglobina.

La Hemoglobina es una proteína conjugada con un peso molecular de 68,000 daltons, de forma elíptica y dimensiones aproximadas de 64 X 55 X 50 Å. Esta proteína se encuentra en el eritrocito y está formada por un grupo prostético (heme) y un grupo protéico (globina). La parte globínica está formada por cuatro cadenas polipeptídicas (tetramero) de dos tipos, alfa y no alfa. Existen 2 clases de cadenas ALFA; ZETA ( $\zeta$ ) y ALFA ( $\alpha$ ); y 5 clases de cadenas NO ALFA: EPSILON ( $\epsilon$ ), GAMMA "G" ( $\gamma^g$ ) Y GAMMA "A" ( $\gamma^a$ ), DELTA ( $\delta$ ) Y BETA ( $\beta$ ), las cuales forman de 6 hemoglobinas normales diferentes (Fig. 1) (1).

### A) Estructura y Función de la Hemoglobina

#### A.1 Estructura de la Hemoglobina

**ESTRUCTURA PRIMARIA.** Se le denomina así a la secuencia de aminoácidos (aa.) en la cadena polipeptídica, ésta determinada genéticamente y favorece la formación de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria que permitirá a la Hb cumplir su función. Las cadenas globínicas ALFA constan de 141 aa., al comparar la secuencia de ambas clases, las zetas difieren de las  $\alpha$  en solo 30 aa. Las cadenas no-ALFA, constan de 146 aa., las cadenas B difieren de las  $\epsilon$  en 36 aa, de las cadenas  $\gamma$  en 39 aa y de las  $\delta$  en solo 10 aa.

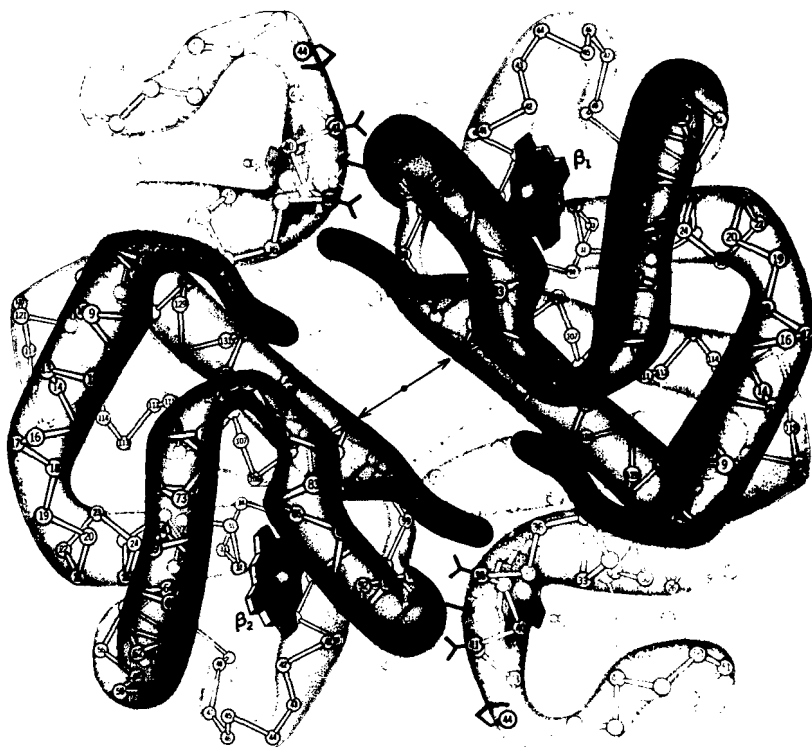


Fig. 1 Estructura molecular de la Hemoglobina.

Existen dos tipos de cadenas  $\gamma$  normales, casi idénticas entre sí,  $\gamma^a$  tiene alanina y  $\gamma^c$  glicina en la posición 136 (1,2).

**ESTRUCTURA SECUNDARIA.** Aproximadamente el 75% de los aa. que componen ambas cadenas polipeptídicas, forman una estructura helicoidal conocida como hélice- $\alpha$  que permite la formación de enlaces de hidrógeno (H) entre las cadenas laterales de los aa. para dar lugar a una estructura estable. A lo largo del eje de la hélice se encuentra un aa. cada 1.5 Å, cada vuelta de la hélice es de 5.4 Å, de manera que la vuelta completa tiene 3.6 aa (3).

En las cadenas  $\beta$ , se han determinado ocho segmentos helicoidales llamados dominios, asignados de la A la H y en las cadenas  $\alpha$  siete, encontrándose ausentes los aa que formarían la hélice D. Estas porciones helicoidales son fundamentales para la estructura terciaria (2).

**ESTRUCTURA TERCIARIA.** Representa la forma tridimensional que asume cada cadena globínica en el espacio. En la mayoría de los casos la arquitectura es muy irregular debido a que la hélice- $\alpha$ , se interrumpe por:

a) Presencia de una prolina, que altera los enlaces de H, necesarios para la formación de la hélice- $\alpha$ .

b) Presencia de puentes disulfuro S-S, que se forman entre dos cisteínas de la misma cadena polipeptídica y dan lugar a una distorsión de la hélice.

c) Interacciones entre distintos grupos laterales (Ácidos o Básicos): las propiedades químicas de estos grupos causan distorsiones en la cadena al asumir la disposición espacial más favorable desde el punto de vista energético (4).

El grupo heme se encuentra localizado en una cavidad profunda de cada subunidad de la molécula, entre los dominios E y F. La parte externa de la molécula se encuentra revestida por cadenas laterales de varias clases predominando las polares. Cada subunidad es hidrofóbica en su interior e hidrofílica en su exterior (2).

La configuración tridimensional representa, la disposición más estable entre todas las alternativas posibles, la disposición de los diferentes aa., permite la formación del máximo número de contactos atómicos favorables entre la molécula y su ambiente normal.

**ESTRUCTURA CUATERNARIA.** Está dada por la disposición espacial específica de las cuatro cadenas que forman la Hb. La molécula de Hb presenta dos estados diferentes de acuerdo a su función oxihemoglobina y desoxihemoglobina, presentando estructuras diferentes, que se distinguen por la disposición espacial de las subunidades y por el número y fuerza de enlaces entre ellas. Existen dos estructuras, una muestra menos enlaces entre las subunidades



capaz de desarrollar una función de afinidad al oxígeno denominada estructura R ó RELAJADA (oxihemoglobina). La otra, tiene una mayor cantidad de enlaces entre las subunidades y es llamada estructura T ó TENSA (desoxihemoglobina).

Las subunidades de la Hb están dispuestas en los vértices de un tetraedro alrededor de ejes de simetría doble (distintos para las formas R y T). Esta simetría permite cuatro contactos distintos ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$  y  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ) que cubren una gran parte de la superficie de las subunidades (2).

El contacto entre las subunidades  $\alpha_1\beta_1$  o  $\alpha_2\beta_2$  es extenso y contiene 40 puntos de contacto y 9 puentes de H. El número de enlaces químicos entre las subunidades  $\alpha_1\beta_1$  hacen que estas se peguen fuertemente y con dificultad se alteren durante su reacción con el oxígeno, comportándose como cuerpos rígidos en la transición entre las estructuras T y R (1).

Los puntos de contacto entre las subunidades  $\alpha_2\beta_1$  o  $\alpha_1\beta_2$  durante la estructura R son diferentes a los observados durante su estructura T. El sitio de contacto primario se da entre el dominio FG y el dominio C de las subunidades, como son complementarias, forman cuatro puntos de contacto. En la estructura T, ocurren aproximadamente 40 contactos, incluyendo 19 puentes de H, mientras que en la estructura R existen aproximadamente 22 contactos y 12 puentes H (1,6).

La unión entre las subunidades de la Hb es debida a distintos tipos de enlaces como: Puentes de H, Interacciones no polares o fuerzas de Van der Waals, además, en estado T (desoxihemoglobina), se forman puentes salinos (3), localizados en los extremos de las cadenas polipeptídicas en arginina en las cadenas  $\alpha$  y en histidina de las cadenas  $\beta$ , y la tirosina que ocupa la penúltima posición en ambas cadenas. La tirosina, transporta un grupo fenol y esta ligado a un grupo hidroxilo. En la estructura T la tirosina esta insertada a la cavidad entre los dominios F y H, formando un enlace con valina que se localiza en el segmento FG.

La arginina C-terminal de las cadenas  $\alpha$ , forma un puente salino con un grupo polar de la cadena  $\alpha$  opuesta. La histidina de cada cadena  $\beta$  forma también dos enlaces salinos, uno con un grupo de la misma cadena  $\beta$  y otro con la cadena  $\alpha$  contigua. Además de estos puentes salinos, las cadenas  $\beta$  estan unidas por una molécula de 2-3 difosfoglicerato (2-3DPG) que al liberarse rompe los enlaces salinos al liberarse y permite pasar de la forma T a la R.

Durante los periodos de transición de la estructura T a R o viceversa, el átomo de hierro y la histidina proximal de la hélice H sufre ligeros desplazamientos, acercándose o alejándose del plano de la porfirina. En la desoxihemoglobina el átomo de hierro se encuentra desplazado 0.6 Å del plano

principal de la porfirina. Mientras que el átomo de nitrógeno de la histidina proximal enlazado al hierro esta desplazado 2.7 Å del mismo plano. En la estructura de la Oxihemoglobina, el hierro se desplaza del plano de la porfirina 0.1 Å. y el desplazamiento del nitrógeno de la histidina proximal es de 2.2 Å. Los movimientos de la histidina proximal y del hierro hacia el plano de la porfirina, pone en movimiento una serie de palancas que desprenden a las tirosinas y rompen los puentes salinos (2).

#### A.2 Estructura del Grupo Heme.

El grupo prostético heme es el responsable de dar la coloración roja a la sangre y es sintetizado en las células precursoras de los eritrocitos a partir de glicina y ácido succínico. La porfirina, está formado por cuatro anillos pirrólicos unidos por puentes metano y ocho cadenas laterales metilo, vinilo o ácido propiónico con un átomo de hierro en el centro (Fig 2) (3). El heme establece contacto con cadenas laterales de aa. La mayoría de estas cadenas laterales son hidrocarburos, excepto las dos histidinas enlazadas al grupo heme, las cuales desempeñan un papel importante durante la captación del oxígeno. La cadena lateral de la histidina proximal finaliza en un anillo de imidazol, formando un enlace con el hierro del heme. La histidina distal, se dispone en el lado opuesto del grupo

hemo, enlazando al oxígeno durante la etapa de oxihemoglobina mediante un puente de H (1,2).

El hierro del heme se encuentra ligado a 6 átomos en estado R, a cuatro átomos de N de la porfirina, a un átomo de N de la histidina proximal y a uno de los dos átomos de la molécula de oxígeno. Durante la estructura T, la posición del oxígeno permanece vacía, de modo que el hierro se liga a solo cinco átomos, pero el hierro no forma ningún tipo de enlace químico con los átomos que lo rodean (2).

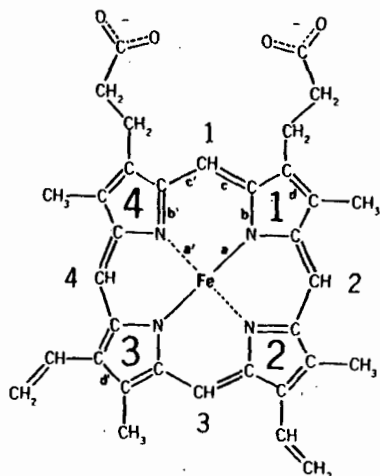


Fig. 2 Estructura molecular del grupo heme.

El átomo de oxígeno, no forma algún tipo de enlace químico con el hierro del heme. Esta molécula de oxígeno se enlaza mediante un puente de Hidrógeno al anillo de imidazol de la Histidina distal (E7), sosteniéndolo cerca del átomo de hierro del grupo heme, como ocurre en la mioglobina (1).

### A.3 Función de la Hemoglobina

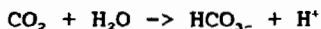
La hemoglobina es el componente principal de los glóbulos rojos. Su función es transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y colabora en el transporte del bióxido de carbono de los tejidos a los pulmones.

La reacción entre la Hb y el oxígeno depende de la afinidad entre estos. En 1930 se determinó la curva de disociación de la Hb, la representación gráfica del porcentaje de saturación de la hemoglobina frente a la presión parcial de oxígeno es sigmoideal. El carácter sigmoideal de la Hb demuestra que esta posee una afinidad relativamente baja para captar la primera molécula de oxígeno, pero una vez que ésta se ha incorporado, la unión de las siguientes moléculas resulta mas rápida (1,2,4).

#### EFEECTO BOHR

El dióxido de carbono cuando es liberado por los tejidos en la respiración es demasiado insoluble para ser transportado, pero cuando se combina con el agua para se hace mas soluble como lo demuestra la siguiente reacción al

formar un Ion bicarbonato y un protón.



Está reacción entre el dióxido de carbono y el agua está catalizada por la enzima anhidrasa carbónica.

La Hb libera al oxígeno cuando se combina con los protones producidos por la reacción descrita anteriormente y viceversa; suelen captarse dos protones por cada cuatro átomos de oxígeno liberado, y a su vez, se liberan dos protones cuando se captan cuatro moléculas de oxígeno. Esta acción recíproca se conoce como efecto BOHR, y es la clave del mecanismo del transporte del dióxido de carbono (2).

Los fosfatos orgánicos estabilizan la forma T de la Hb. El 2,3 DPG, está unido a las cadenas  $\beta$  de la desoxihemoglobina. Estas uniones se realizan entre el grupo amino terminal del anillo de imidazol de las histidina B2 y B143 y al grupo carboxilo de las valinas B1 y B85. La unión del 2,3 DPG disminuye la afinidad de la Hb por el oxígeno manteniendo de este modo una configuración estable de la forma T (5,6).

La Hb fetal tiene una menor afinidad hacia el 2,3 DGP y una mayor afinidad hacia el oxígeno, dado que en las cadenas  $\gamma$  y en la posición 143 se encuentra una serina en vez de una histidina en la misma posición en la Hb adulta. De este modo se facilita la transferencia del oxígeno desde la circulación sanguínea materna a la circulación fetal (1,2).

La presencia y el incremento en la concentración del ION CLORO disminuye la afinidad por el oxígeno, este anión inorgánico se une y favorece la forma T. El Ion Cloro se une al grupo amino de la valina  $\alpha 1$  en ambas cadenas  $\alpha$  (1,6).

## B. HEMOGLOBINAS HUMANAS NORMALES

### B.1 Localización, Estructura y Función de los Genes Globínicos.

Los genes globínicos se encuentran agrupados en dos familias, denominadas  $\alpha$  y no- $\alpha$ , con un total de 8 genes funcionales y 5 inactivos o pseudogenes.

La familia de los genes globínicos  $\alpha$  está localizada en el cromosoma 16 (8), en el segmento p13.3-pter (9), en una extensión aproximada de 40 kilobases (Kb) conformándolo 4 genes, 3 de ellos funcionales:  $\zeta$ , que se expresa solo en el período embrionario, y  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ , que se sintetizan desde la etapa fetal (Fig. 3).

Los genes globínicos no- $\alpha$  o semejantes a  $\beta$ , se localizan en el brazo corto del cromosoma 11 (12), en p15.5 en un segmento de 60 Kb, y consta de 5 genes funcionales,  $\epsilon$ ,  $\gamma^c$ ,  $\gamma^a$ ,  $\delta$  y  $\beta$  (Fig. 4) (1).

Además, se han encontrado cinco genes globínicos no funcionales o pseudogenes; uno en el cromosoma 11 entre los genes  $\gamma^a$  y  $\delta$  denominado pseudo- $\beta_1$  y cuatro en el cromosoma 16; entre los genes  $\zeta_2$  y  $\alpha_2$  están pseudo- $\zeta_1$ , pseudo- $\alpha_2$ , pseudo- $\alpha_1$  y en 3' de  $\alpha_1$  se encuentra  $\theta_1$ , que se considera pseudogen (1), ya que existen evidencias de su expresión a nivel de ARNm en saco vitelino, hígado fetal y células eritroides adultas, pero sin evidencias de la formación de una proteína estable (10,11).



## GENES GLOBINICOS ALFA CROMOSOMA 16

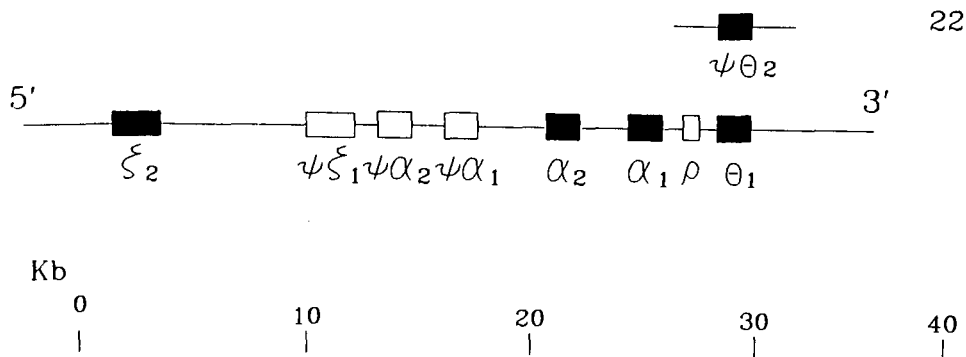


Fig. 3 Mapa de los genes globínicos α

## GENES GLOBINICOS NO-ALFA CROMOSOMA 11

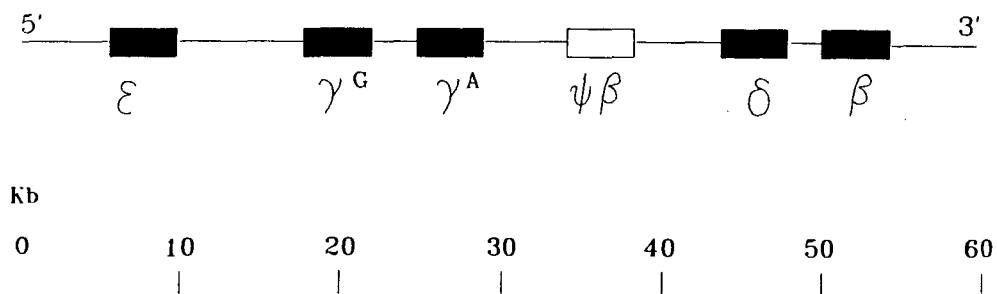


Fig. 4 Mapa de los genes globínicos no-α

Los genes globínicos están constituidos hacia 5' del sitio Cap por una región promotora de aproximadamente 100 pb: 2 regiones flanqueadoras en los extremos 5' y 3' (RF5' y RF3') que forman parte del ARN heterogéneo nuclear (ARNHn, copia fiel del ADN) y del ARN mensajero; 3 exones (E1, E2 y E3) o regiones que codifican para la secuencia de los aminoácidos de los polipéptidos, y 2 intrones (I1 e I2) o regiones no codificadoras que separan a los exones, y que son removidos durante el proceso de maduración del ARN que será utilizado como molde en la traducción (1,13). El gen  $\zeta$  consta de 2200 pb, los genes  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de 850 pb y los genes  $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$  y  $\beta$  de 1600 pb (1,3); la longitud de las regiones que integran los 8 genes globínicos expresadas en pb es la siguiente:

GENES	RF 5'	E 1	I 1	E 2	I 2	E 3	RF 3'
$\alpha_1$ y $\alpha_2$	40	93	117	207	142-149	123	113
$\zeta$	58	93	886	207	239	123	108
$\epsilon$ , $\gamma^G$ , $\gamma^A$ , $\delta$ y $\beta$	54-57	90	122-130	222	850-904	126	90-135

Para que la síntesis de las cadenas globínicas se lleve a cabo normalmente, es necesario que se encuentren conservadas al menos 8 secuencias consenso: 3 en la región

promotora, a -30, -80 y -100 pb con las secuencias **ATA**, **CCAAT** y **GGGGG (C ó T)G**; 1 en Cap, **CAT**; 3 en los intrones, en 5' **GTAAGT**, en 3' **(Pi)10NCAG** y a 20-50 nucleótidos del extremo 3' el llamado sitio de ramificación con una secuencia **ACTTT(CC)** o **ATCTT(CC)** y 1 en el sitio de poliadenilación, **AATAAA** (Fig 5). Para que la transcripción sea normal deben estar inalteradas las secuencias de la región promotora y del cap; para la maduración, las secuencias de Cap, de los intrones y del sitio de poliadenilación; mientras que para la traducción, una vez formado el ARNm maduro, es necesario que la secuencia de los exones sea normal (1,13,14).

## GEN BETA

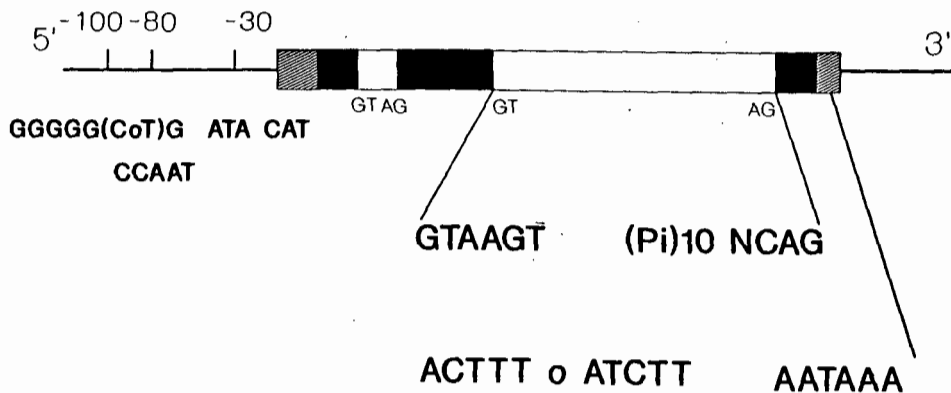


Fig. 5 Estructura del gen globínico B

## B.2 Tipos de Hemoglobinas

Ha sido demostrado que durante el desarrollo normal de un individuo se sintetizan 6 Hbs distintas que se diferencian entre sí en los tipos de cadenas  $\alpha$  y no- $\alpha$  que las constituyen. En la etapa embrionaria aparecen las Hbs: Gower I, Portland y Gower II; en la etapa fetal solo Hb F, y en etapa adulta aparecen la Hb A y Hb A<sub>2</sub> (1).

El contenido total de Hbs en adultos normales está constituido por los siguientes componentes mayores: 90% de Hb A<sub>1</sub> ó Hb A, 3% de Hb A<sub>2</sub>, 1% HbF y el resto son modificaciones postraduccionales derivados principalmente de la Hb A (Fig 6A).

La activación del gen delta tiene lugar un poco antes del nacimiento, de manera que, los niveles de Hb A<sub>2</sub> en recién nacidos son bajos y alcanzan los valores normales del adulto, aproximadamente, a los 6 meses de edad (1).

Korber en 1866, descubrió que los hemolizados de células rojas de recién nacido eran resistentes a la desnaturalización alcalina sugiriendo que contenían una Hb diferente. Esta resistencia se explica por las diferencias en la interfase entre las subunidades en el dímero  $\alpha\gamma$  en comparación con el dímero  $\alpha\beta$ , además por la existencia de dos residuos en la cadena  $\beta$ (112 Cis y 130 Tir) que pueden ionizarse por alcalinización o hidratación favoreciendo la formación de monómeros de Hb desnaturalizada. Las cadenas

gamma en esta posición tienen treonina y triptofano respectivamente, residuos que no son alterados por alcalis y por tanto no contribuyen a la desnaturalización de la Hb F (1,3).

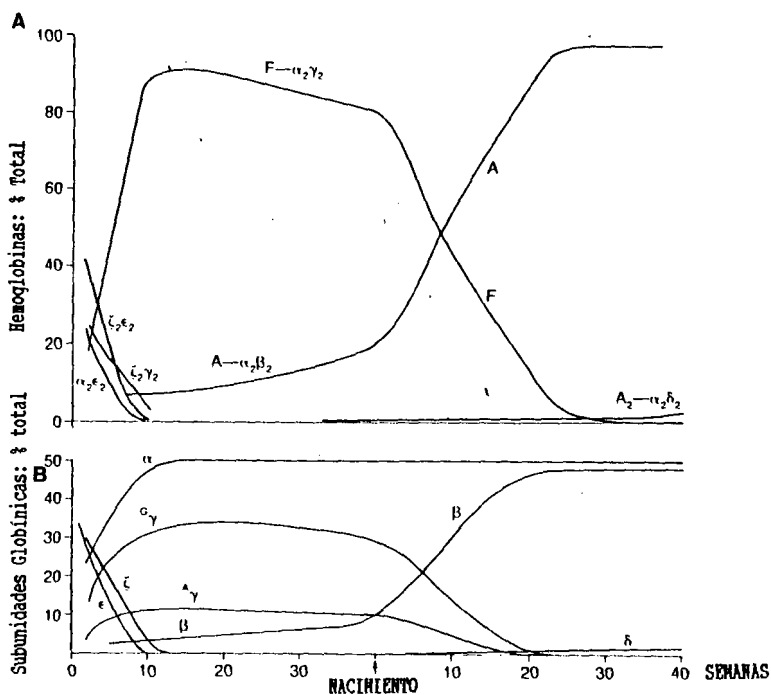


Fig. 6 Cambios en los tetrámeros de la Hb (6-a) y en las subunidades globínicas (6-b) durante el desarrollo humano del embrión a la infancia temprana.

### B.3 Ontogenesis

Las diferentes hemoglobinas humanas se representan con distintos niveles durante el desarrollo. En embriones de hasta 10 a 12 semanas de gestación aparecen tres hemoglobinas: Hb GOWER 1, compuesta por 2 cadenas  $\zeta$  y 2 cadenas  $\epsilon$ . Hb PORTLAND, compuesta por 2 cadenas  $\zeta$  y 2 cadenas  $\gamma$ . Hb GOWER 2 formada por 2  $\alpha$  y 2  $\epsilon$ .

La Hb FETAL predomina desde la décima semana de gestación hasta el nacimiento, cuando inicia su disminución a valores normales que se alcanzan alrededor del año de vida: Esta Hb está formada por 2 cadenas  $\alpha$  y 2 cadenas  $\gamma$ . La Hb A tiene un comportamiento similar al de la Hb F ya que los niveles son bajos durante el desarrollo intrauterino y se elevan al disminuir los niveles de HbF y está formada por 2 cadenas  $\alpha$  y 2 cadenas  $\beta$ . La Hb A<sub>2</sub> aparece en el eritrocito en pequeñas cantidades en el tercer trimestre de gestación (0.5%) para llegar a valores normales alrededor del año de vida, y está formada por un par de cadenas  $\alpha$  y un par de cadenas  $\delta$  en una concentración de aproximadamente del 2.5% al 3.0% (Fig. 6B) (1,5).

### C. ALTERACIONES DE LA HEMOGLOBINA

El tipo de alteración de la Hb depende del sitio donde ocurrió la mutación en la estructura del gen: Región promotora, sitio cap, exones, intrones o regiones flanqueadoras, así, como del tipo de mutación (Sustitución de una base por otra, deleción, adición o fusión génica) (1,18).

Las alteraciones de la Hb se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo al sitio y tipo de mutación en el gen:

#### C.1 Defectos en Síntesis.

Se caracterizan por la ausencia o disminución en la síntesis de cadenas globínicas que conducen a un desequilibrio en la relación de cadenas  $\alpha$ /no- $\alpha$ , comumente llamadas talasemias (1).

#### TALASEMIAS

El termino talasemia describe a un grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por una producción reducida o ausente de una o más cadenas globínicas.

La ausencia total de síntesis de una determinada cadena de globina se indica con el superíndice<sup>o</sup> y una síntesis disminuida con '. Estos síndromes muestran un patrón de herencia autosómico recesivo.

Las talasemias se caracterizan por un desequilibrio en la producción de los polipéptidos de globina. En las

$\alpha$ -talasemias existe una disminución o ausencia de síntesis de cadenas  $\alpha$  dando como consecuencia una producción incrementada de globinas  $\beta$  y  $\gamma$  que forman tetrameros de  $\beta_4$  (Hb H) y  $\gamma_4$  (Hb Bart's), estas al disociarse y oxidarse lesionan la membrana eritroide y provocando una destrucción celular prematura, ya sea intramedular o en circulación periférica.

En las  $\beta$ -talasemias, debido a la disminución en la producción de cadenas  $\beta$ , las globinas  $\alpha$  libres se precipitan y oxidan la membrana celular ocasionando lesiones en los eritroblastos y eritrocitos circulantes. Por tanto, la talasemia es el resultado de una producción deficiente o nula de determinadas globinas, de una eritropoyesis ineficaz y de un estado hemolítico que conduce a una anemia congénita (5,16,17).

#### PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL (PHHF)

La PHHF es una condición que involucra el complejo de genes  $\alpha$  caracterizada por una producción incrementada de Hb F en la vida adulta, sin presentar cambios hematológicos importantes. Existen 2 tipos principales: por delección de grandes segmentos de ADN que involucran la pérdida de los genes  $\delta$  y  $\beta$ , ó  $\gamma^A$ ,  $\delta$  y  $\beta$ , y por mutación puntual en las regiones promotoras de los genes  $\gamma^G$  o  $\gamma^A$  que incrementa la transcripción de esos genes (1,5).



### C.1 Defectos Estructurales.

Hasta marzo de 1992 se han encontrado 780 VARIANTES ESTRUCTURALES (7), de las cuales un tercio de ellas cursan con manifestaciones clínicas, lo que significa que las mutaciones que originan variantes estructurales no necesariamente conducen a una patología clínica (1,7).

Los tres exones de los genes globínicos, son las regiones que al ser modificadas por sustitución de una base por otra, deleción, adición ó entrecruzamiento tienen como consecuencia una alteración estructural de la Hb.

Las variantes estructurales se clasifican de acuerdo a su patología clínica en 4 grupos (20,21):

- 1- Hb S.
- 2- Hbs Inestables
- 3- Hbs con Alta ó Baja Afinidad por el Oxígeno.
- 4- Metahemoglobinas.

1.- Hb S. Esta Hb queda en un solo grupo por su alta prevalencia en el mundo. La Hb S fue la primera Hb anormal encontrada en 1949 por Pauling y cols, las evidencias de la anormalidad estructural fueron presentadas por Ingram, al demostrar que la Hb S presentaba una sustitución de un ácido glutámico por una Valina en la posición 6 de la cadena  $\beta$  ( $\beta^S$  Cd 6 Glu-Val) (1-5). Dicha alteración ocasiona que la Hb S se polimerise dentro del eritrocito formando fibras

largas, al disminuir la concentración de oxígeno en la sangre, y esto ocasionan la rigidez del eritrocito al adoptar la forma de hoz y una alta susceptibilidad de ser destruido al atravesar la microcirculación.

2.- Hbs Inestables. Estas Hbs conducen a un tipo particular de anemia hemolítica conocido como anemia hemolítica Congénita con cuerpos de Heinz. La inestabilidad de la Hb está dada por modificaciones en alguno de los siguientes niveles:

a). Interferencia de la estructura secundaria, particularmente de la hélice  $\alpha$ . Ej. Hb Sabine B 67 Val→Pro.

b) Inserción de residuos polares en el interior de la molécula. Ej. Hb Bristol B 67 Val→Asp.

c). Desestabilización del grupo heme. Ej. Hb Tours B 87 Tre→O

d). Interferencia con los contactos intercadena  $\alpha_1\beta_1$  ó  $\alpha_1\beta_2$

Ej. en  $\alpha_1\beta_1$  Hb Philly B35 Tyr→Phe.

3.- Hbs con alta o baja afinidad por el oxígeno. Normalmente existe un equilibrio entre las formas Desoxihemoglobina (T ó tensa) y Oxihemoglobina (R ó relajada) de la Hb, lo que le confiere a la molécula una capacidad de oxigenación y desoxigenación que se visualiza como una curva sigmoide cuando se gráfica el porcentaje de saturación contra la presión de oxígeno. La flexibilidad de la Hb está dada por

los enlaces  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 1\beta 2$ , las mutaciones que modifican estos enlaces favorecen a las formas T o R haciendo que la Hb adquiera mayor o menor afinidad por el oxígeno; las mutaciones en el sitio de unión con el 2,3 DPG modifican también el equilibrio T-R. Ej. Hb Hiroshima  $\beta$  146 His $\rightarrow$ Asp.

4.- Metahemoglobinas. En este grupo se incluyen las Hbs anormales que modifican el sitio de unión entre el grupo heme y la globina, particularmente las histidinas conocidas como proximal y distal que se localizan en las posiciones 58 y 87 de las cadenas  $\alpha$ , ó 63 y 92 de las cadenas  $\beta$ , cambios en esas posiciones favorecen a la forma oxidada de la Hb conocida como Metahemoglobina en la cual el fierro se encuentre como  $Fe^{+3}$  (1,5). Ej. HbM Boston  $\alpha$  58 His $\rightarrow$ Tir.

#### D. METODOS ELECTROFORETICOS UTILIZADOS PARA DETECTAR

##### VARIANTES DE LA HEMOGLOBINA (25,26,29)

Este método es ampliamente utilizado en investigación biomédica para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. La electroforesis se define como el movimiento de partículas cargadas electricamente por medio de una solución y la influencia de un campo eléctrico.

El campo eléctrico es generado por el paso de corriente eléctrica a través de un medio de soporte del polo negativo (ánodo) al polo positivo (cátodo). La movilidad electrofóretica (M) es definida como la distancia (D) alcanzada por una partícula cargada en una unidad de tiempo (+) bajo la influencia de un campo eléctrico (E) y puede ser representada por la siguiente formula:  $M = d/tE$ , esta la formula puede ser rearrreglada a:  $M = V/E = q/fe$

V= Velocidad constante de la partícula

q= Carga de la partícula

f= Coeficiente de fricción

para ser expresada como la velocidad por unidad de campo.

La movilidad electrofóretica de una proteína en un campo eléctrico, depende de su tamaño, forma y carga, lo cual permite diferenciar especies individuales.

Las proteínas tienen grupos amino ( $NH_2$ ) y carboxilo ( $COOH$ ) que aparecen libres a lo largo de una cadena polipeptídica. Los grupos  $COOH$  de los ácidos glutámico y

aspartico proporcionan cargas negativas y los grupos  $\text{NH}_2$  de la lisina y arginina cargas positivas dependiendo del pH del medio en que se encuentre la proteína. El número de tales aa. en la superficie de la proteína determinará su carga electrostática final. El pH en el cual una proteína tiene carga eléctrica cero se conoce como punto isoeléctrico (pI). A pH menores al pI la proteína tendrá carga eléctrica positiva (+), y a pH mayores al pI su carga será negativa. Por ejemplo: el punto isoeléctrico de la Hb A es pH 6.8, debido a los residuos glutamil y aspartil que llevan cargas negativas ( $\text{COO}^-$ ) y de arginil y lisil que tienen cargas positivas ( $\text{NH}_3^+$ ), localizados en la superficie de la proteína, hacen una suma algebraica de cero. A pH menores de 6.8 la Hb A tiene una carga eléctrica neta positiva porque predominan los cargas positivas a pH menores de 6.8 una carga neta negativa por la predominancia de cargas negativas.

Las variantes estructurales de la Hb presentan cambios de un aa. por otro, en un tercio de los casos alteran el comportamiento eletroforético que permite su identificación al utilizar diferentes medios de soporte, como los descritos a continuación.

### Electroforésis en Acetato de Celulosa.

Es el método más simple utilizado para el análisis de la Hb. El acetato de celulosa tiene una estructura porosa homogénea que pueden diferir en longitud de la cadena de celulosa y grado de acetilación de la celulosa. La separación de las Hbs en acetato de celulosa se basa principalmente en la carga eléctrica neta que adquieren a pH 8.4 utilizado para el tamizaje primario de variantes estructurales, si el patrón de migración es diferente al normal se requiere de pruebas adicionales de electroforesis en agar o agarosa para confirmar e identificar la variante anormal.

### Electroforésis en Geles de Agar.

El agar es un polisacárido lineal, obtenido de algas; con un alto contenido de agua, una buena estructura fibrosa que forma poros de gran tamaño y por lo tanto ofrece menos resistencia, y permite tiempos de corrimientos cortos. Estas características la hacen un medio altamente útil.

La electroforesis en geles de agar ó agarosa (forma mas pura de agar), se basa en la carga eléctrica y en la adsorción de la H al agar. Este método es utilizado para pruebas confirmatorias en la identificación de variantes estructurales. Comúnmente se utilizan 3 sistemas, uno a pH 6.2 con un buffer de citratos, otro a pH 7.4 y el ultimo a pH 8.6, ambos con buffer de boratos.

### Isoelectroenfoque en Geles de Poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida son polímeros de monómeros de acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ ) y N-N'metilen-bis-acrilamida ( $\text{CH}_2[\text{NHCOCHOCH}_2]_2$ ). La polimerización depende de un mecanismo de radicales libres, el cual se inicia por la adición de persulfato de amonio (catalizador) y de un iniciador N,N,N',N' tetrametiletildiamino (temed).

La concentración de acrilamida determina la longitud del poro mientras que la bis-acrilamida determina la extensión y la formación del enlace entre los polimeros y ambos determinan el tamaño del poro. El factor principal que determina la separación del polipéptido durante la electroforesis es el tamaño del poro.

El IEE es una técnica simple para la separación y caracterización de proteínas, al utilizar el punto isoeléctrico mediante el empleo de un compuesto químico de poliamino carboxilos llamados anfólitos. Los anfólitos son agregados a un gel de agarosa o poliacrilamida para formar un gradiente lineal de pH, con un rango de separación de 0.01 unidades de pH.

Dos tercios de las sustituciones de un aa. por otro no provocan cambios en el comportamiento electroforético, estos cambios pueden ser establecidos por diferencias en el pI de las Hbs anormales.

E. HEMOGLOBINOPATIAS EN MEXICO (23,27,28.)

La identificación de portadores de Hbs anormales en México data de 1950 con la observación de un paciente con drepanocitosis estudiado en el Hospital Infantil de México (23).

Los estudios sobre Hbs anormales en México podemos dividirlo en dos grupos, población abierta y población seleccionada. El primero, incluye los resultados observados en población Indígena, Mestiza y hospitalaria. El segundo grupo, incluye pacientes con anemia hemolítica.

P O B L A C I O N   A B I E R T A

A) INDIGENA

La población indígena de México se clasifica en 4 grandes grupos basados en su lengua madre en: Tarasco, Macro-Mixteco, Macro-Maya y Macro-Nahua.

MACRO-MAYA en 1894 sujetos estudiados, se encontraron 3 heterocigotos para Hb S ( $\beta 6$  Glu-Val) con una frecuencia de 0.16% (3/1894), 1 heterocigoto para Hb Chiapas ( $\alpha 14$  Pro-Arg) con una frecuencia del 0.05% (1/1894).

MACRO-MIXTECO, en 629 sujetos, se encontró un heterocigoto para Hb México ( $\alpha 54$  Gln-Glu) con frecuencia de 0.015% (1/629).

MACRO-NAHUA, de 1068, se localizó, 2 heterocigotos para Hb México ( $\alpha 54$  Gln-Glu) y una frecuencia de 0.09% (2/1068).



TARASCO, en 133 sujetos, no se encontró portador de alguna Hb anormal.

#### B) MESTIZA

Estudios realizados en 13 comunidades de las costas del Golfo de México, se encontró una frecuencia del 3.57% (73/2044) de heterocigotos para Hb S y 0.19% (4/2044) heterocigotos para Hb C. En 8 comunidades del Pacífico (Guerrero y Oaxaca), se encontró una frecuencia del 5.1% (120/2527) de heterocigotos para Hb S.

#### C) HOSPITALARIA

En 1982, los Hospitales del IMSS de la cd. de Puebla y Guadalajara, se reportaron datos de portadores de variantes estructurales encontradas en adultos y recién nacidos, mostrando estos resultados en el siguiente cuadro.

ESTADO	No DE MUESTRAS	AS	AC	OTRAS
<b>PUEBLA</b>				
RECIEN NACIDOS	500	0	1	
ADULTOS	3886	3	1	2 Hb México
<b>GUADALAJARA</b>				
ADULTOS	3668	13	0	3 Hb Riyadh 1 Hb Baltimore 3 No Caract.
RECIEN NACIDOS	4600	1	0	2 Hb Tarrant

Ibarra y col. estudiaron a 1661 sujetos derivados de diferentes centros de atención médica del estado de Jalisco encontrando los siguientes resultados.

REGION	No DE MUESTRAS	AS	AC	OTRAS
TONALA	1096	5	4	2 Hb Chiapas 1 Hb Fannil.
COMN. HUICHOLA	65	0	0	
AMECA, COCULA, MAGDALENA, OCOTLAN Y YAHUALICA	500	2	1	

POBLACION SELECCIONADA

PACIENTES CON ANEMIA HEMOLITICA

Estudios realizados entre 1978 y 1992 en el noroccidente de México en pacientes con anemia hemolítica y/o sospecha de hemoglobinopatía, se han estudiado 577 propósitos (casos índice) encontrando, 85 pacientes con hemoglobinopatías (14.7%) de los cuales, 18 homocigotos para Hb S (21.2%), 9 heterocigotos para Hb S (10.6%) y 7 variantes estructurales aun no caracterizadas (8.24%), los restantes son portadores de talasemia  $\alpha$  o talasemia  $\beta$ .

**III   P L A N T E A M I E N T O**  
**DEL   P R O B L E M A**

### III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios encaminados a determinar alteraciones de la Hb en población seleccionada en el Noroccidente de México por Ibarra y col. hasta diciembre de 1992, se han encontrado 90 portadores de hemoglobinopatías en 577 pacientes (15.6%), de los cuales el 56.6% (51/90) son portadores de variantes en síntesis, y el 43.3% (39/90) portadores de variantes estructurales (24). Estas frecuencias pudieran estar subestimadas ya que se han observado pacientes con manifestaciones claras de AH congénita, los cuales probablemente son portadores de variantes estructurales patológicas no identificables por los métodos electroforéticos convencionales (31,32), como electroforesis en acetato de celulosa y electroforesis en geles de agarosa. Por lo que es necesario estandarizar en nuestro laboratorio otras metodologías con mayor sensibilidad, como el Isoelectroenfoque (IEE) en geles de poliacrilamida, el cual es un procedimiento rápido y altamente sensible que permite detectar más de 70 variantes en base a su punto isoeléctrico (1,30,33).

**I V   H I P O T E S I S**

#### IV HIPOTESIS

La técnica de IEE permitirá detectar variantes estructurales de la hemoglobina no identificables por métodos convencionales.

V O B J E T I V O S

## V O B J E T I V O S

1.- Estandarizar la metodología de IEE para la identificación de variantes estructurales de la Hemoglobina.

2.- Buscar variantes de la Hemoglobina por IEE en un estudio prospectivo en pacientes con AH y/o sospecha de hemoglobinopatías.

3.- Realizar un estudio prospectivo aleatorio en población hospitalaria.



VI MATERIAL Y  
METODOS

## VI MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en 132 muestras clasificadas en 2 grupo (I y II). Ambos grupos se sometieron al estudio por IEE y electroforesis en acetato de celulosa.

El grupo I con 32 propositi enviados de la consulta de Hematología de los Hospitales de Especialidades y Pediatría del C.M.N.O., I.M.S.S., con diagnóstico clínico de AH y/o sospecha de alguna hemoglobinopatía. Las muestras del grupo II fueron seleccionadas mediante tablas aleatorias de los pacientes que acudieron al laboratorio clínico del Hospital de Especialidades.

### OBTENCION DE LA MUESTRA

A los pacientes del grupo I se les tomaron 2 ml. de sangre por punción venosa con EDTÀ al 10%, mientras que las muestras del grupo II se obtuvieron directamente del laboratorio clínico del Hospital de Especialidades, I.M.S.S.

### PREPARACION DE MUESTRAS Y HEMOLISADOS (26,30,34)

Para la estandarización de la metodología se emplearon diferentes formas de preparación de muestras para el tamizaje de Hbs, empleándose:

- a) Sangre Total.
- b) Eritrocitos Lavados.
- c) Hemolizado por Congelación-Descongelación.
- d) Hemolizados por Tetracloruro de Carbono (CCl<sub>4</sub>).

a) Las muestras de sangre total, solo se diluían al 5% para ser sometidas a corrimiento electroforetico.

b) Los eritrocitos fueron lavados y centrifugados en 3 ocasiones con solución salina al 0.85%.

c) El hemolizado por congelación-descongelación se realizó, lavando y centrifugando los eritrocitos 3 veces con solución salina al 0.85%, posteriormente el precipitado se congelo a - 40°C empleándose una mezcla de hielo seco-acetona y después descongelando a temperatura ambiente. Esta rutina se repitió en tres ocasiones.

d) Para la preparación del hemolizado por CCl<sub>4</sub>, los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85%. Por cada mililitro de paquete de eritrocitos se agrego 1 ml de agua destilada y 0.4 ml de CCl<sub>4</sub>, se agitó vigorosamente y se centrifugo a 3000 rpm durante cinco minutos, el sobrenadante se recupero sin tocar los estromas. Empleandose este hemolisado por CCl<sub>4</sub>, para la preparación de las 132 muestras de trabajo.

Para el corrimiento de rutina, se tomó 10  $\mu$ l del hemolizado diluidos en 100  $\mu$ l de solución de cianuro de potasio (KCN) al 0.05%.

#### PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA IEE (30)

El procedimiento inicial para la elaboración de geles de poliacrilamida para IEE en placas de 250x115x0.5mm se realizó en base al método descrito por Basset (30).

Realizando posteriormente algunas modificaciones para obtener un procedimiento óptimo.

Durante la preparación de geles de poliacrilamida para IEE hubo 3 modificaciones de consideración.

1) Primeramente, se trabajó con geles de poliacrilamida con una concentración del 5% idéntico al descrito por Basset, posteriormente modificamos la concentración al 6% logrando mejores resultados.

2) Solo se empleo un tipo de anfolitos con un rango de pH 6-8.

3) La adición de KCN al gel, nos permitió corregir el patrón de bandeado obtenido en nuestros geles.

El esquema de preparación de geles de poliacrilamida para IEE aplicable, óptimo y satisfaciendo las necesidades de nuestro laboratorio se presenta en la siguiente tabla:

a) Solución Stock Acrilamida Bisacrilamida Agua Dest. 50 ml.	9.5 Grs. 0.5 Grs.	4.44 ml
b) Solución de Anfolitos al 40%	pH 6-8	1.0 ml
c) Agua Destilada		9.36 ml
d) Persufato de Amonio al 3%		0.1 ml
e) TEMED		5.0 $\mu$ l
f) KCN		12 $\mu$ g

La mezcla se vertió en el molde y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se guardó a 4°C durante toda la noche, para obtener una gelificación completa.

El gel de poliacrilamida se montó en el aparato de electroenfoque, colocando en el ánodo papel filtro whatman impregnado con ácido fosfórico 1M y en el cátodo con hidróxido de sodio 1M. Se realizó un precorrimento de 10 minutos a 150 Volts.

Las muestras quedan impregnadas sobre papel whatman de 3x3mm colocándose a 2 centímetros del cátodo.

Se efectuó el corrimiento de 1 a 2 horas con voltaje inicial de 150 y final de aproximadamente 700 volts.

Terminado

el corrimiento, se retiró el papel whatman y la muestra se fijó con ácido tricloroacético al 12% durante 10 minutos, posteriormente se lavó exhaustivamente con agua destilada. La tinción de la placa se realizó con O-toluidina al 3% (34).

#### FORMA DE EVALUACION

Una vez establecido el patrón de bandeado conocido de la Hb A, A<sub>2</sub>, F y S (controles: Recién Nacidos y Adultos), se sometió a IEE las muestras de los grupos I y II.

La evaluación de estas muestras se realizó tomando la distancia en milímetros (mm) partiendo de la Hb A hacia las otras bandas (30,35).

Los Puntos Isoeléctricos (pI) de las Hbs usadas como controles son conocidos (26,30). En base a esta información, se calculó el pI de acuerdo a la relación en distancia (mm) que exista entre la posición de 2 bandas con pI conocidos con la banda a determinar. El pI obtenido con este cálculo, será comparado con los pI de variantes conocidas para la identificación de las bandas anormales.

Los corrimientos electroforeticos realizados por electroforesis en acetato de celulosa dada su capacidad de identificación de variantes de Hbs nos permitió comparar patrones de bandeo con los obtenidos por IEE.

#### ELECTROFORESIS DE Hbs EN ACETATO DE CELULOSA pH 8.4(26)

Se prepara una solución amortiguadora con Tris-EDTA-Borato (10.2 gr Tris + 0.60 gr EDTA disódica + 3.2 gr de ácido bórico en 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 Beckman microzone). Se aplica la muestra previamente hemolizada en posición catódica, se realiza el corrimiento a 250 volts por 50 minutos, y un amperaje entre 2 y 4mA. 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%.

**VII    R E S U L T A D O S**

## VII RESULTADOS

### A) ESTANDARIZACION

Los geles de poliacrilamida, elaborados a una concentración del 5%, resultaron muy frágiles para su manejo ya que se quemaban con facilidad al aplicar un voltaje bajo durante el precorrimiento. Esto nos condujo a aumentar la concentración a un 6%, presentando una consistencia y resistencia mayor, pudiéndose trabajar hasta con un voltaje de 1200 Volts.

Durante la estandarización de IEE para Hbs, se emplearon muestras hemolizadas con  $CCl_4$  de personas normales, observándose al principio de la estandarización patrones de bandeo diferentes a los descritos por la presencia de una banda rara de movilidad semejante a la Hb F (Fig 7). Con el fin de identificar y/o eliminar la banda rara, se realizaron corrimientos posteriores empleando diferentes preparaciones de muestras que consistió, en dos tipos de hemolizados; por  $CCl_4$  y congelación-descongelación, además el empleo de sangre total y eritrocitos lavados. Estas diferentes preparaciones de hemolizados no modificaron el patrón observado y la banda rara seguía presente (Fig 8). La banda se eliminó cuando tanto al gel como al hemolizado se añadió cianuro de potasio (KCN), obteniéndose un patrón de bandeo similar a los descritos en trabajos previos (Fig 9).



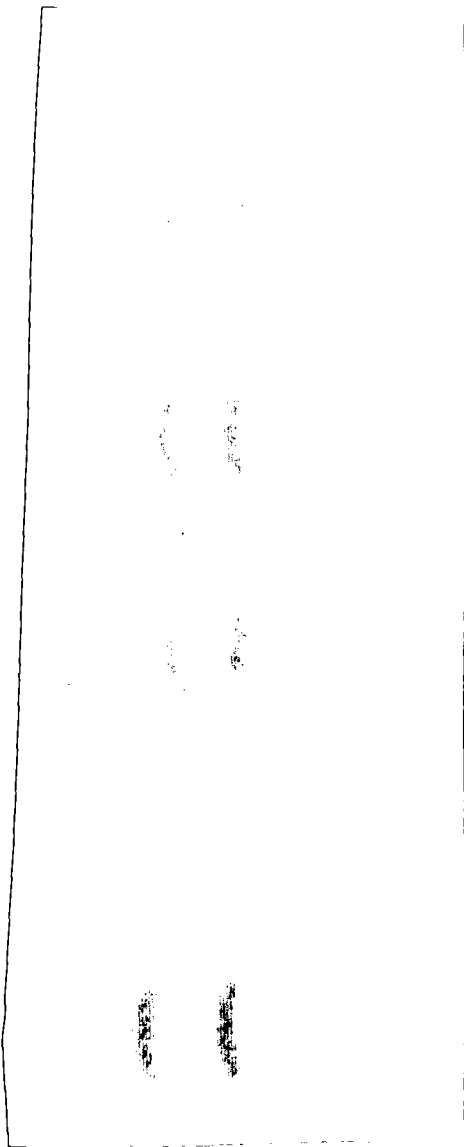


Fig. 7 Representación del patrón de bandeos obtenidos con anfólitos con rango 5-8 de pH, utilizando hemolizados con  $\text{CCl}_4$ .

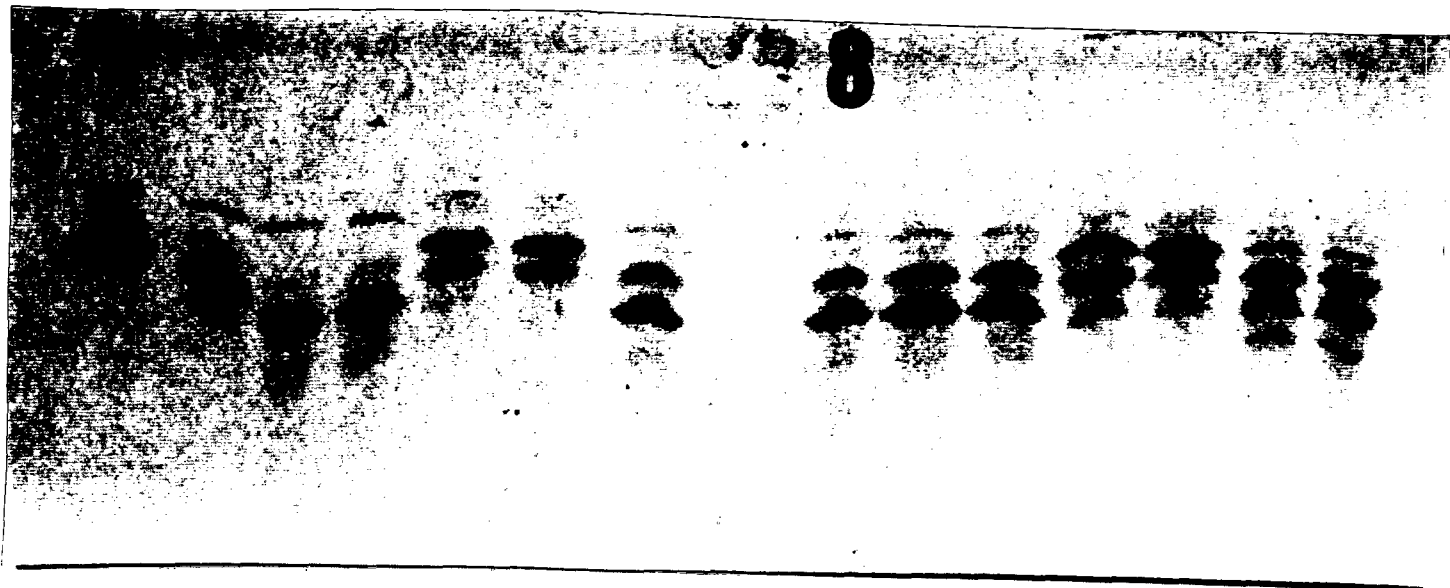


Fig. 8 Corrimiento con hemolizados preparados por congelación descongela $\acute{o}$ n (7-10), FCHK (5,6,11,12) y  $CCl_4$  (1-4, 13, 14).

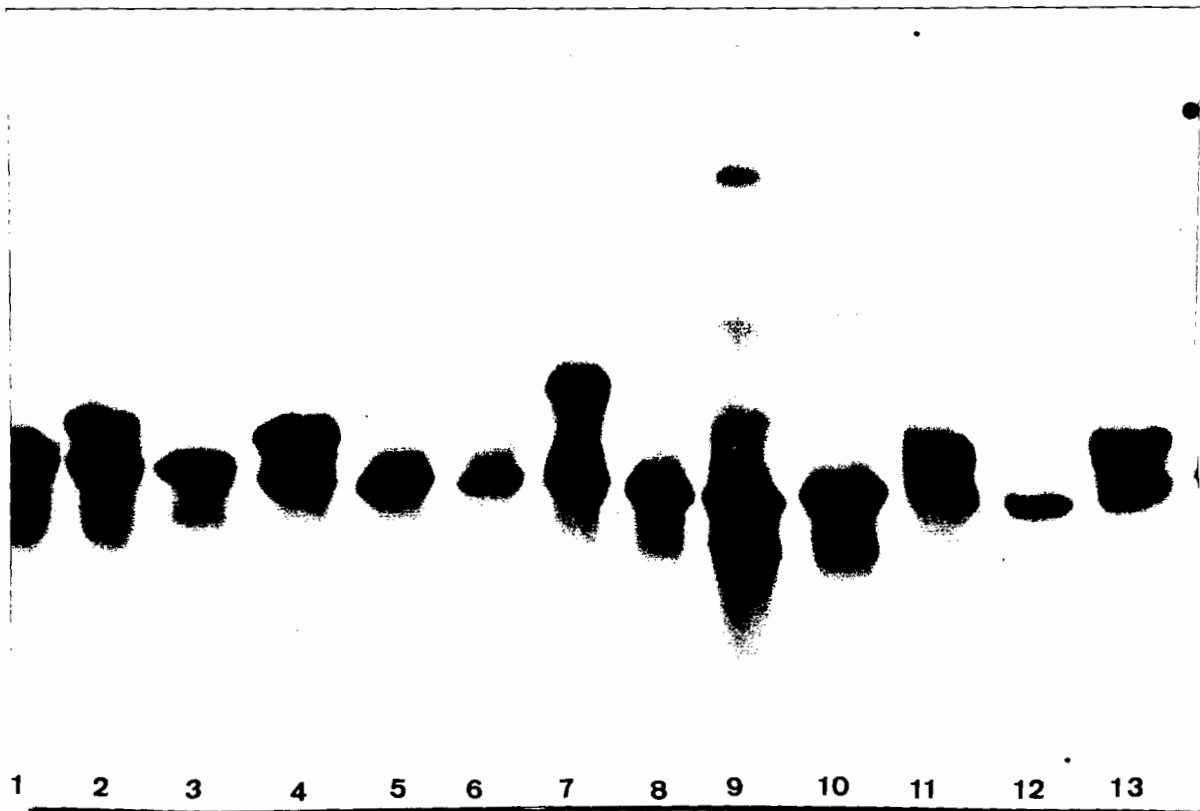


Fig. 9 Resultado del patrón de bandeo obtenido con las condiciones óptimas de corrimiento de IEE. Carril 1, 3, 5, 6, 8, 10 y 12, Hb N; Carril 2, Hb Bart; Carril 4, 11 y 13 Hb F; Carril 9, Meta Hb; Carril 7, Hb S.

Cabe mencionar que se obtuvo un resultado óptimo empleando en la mezcla de la preparación de geles de poliacrilamida solamente un tipo de anfolitos con un rango de pH 6-8.

En la tabla siguiente, se presenta el esquema de preparación de geles de poliacrilamida para IEE mostrando las modificaciones realizadas en nuestro laboratorio, partiendo del método empleado por Basset:

		5%	6%
a) Solución Stock		3.75 ml	4.5 ml
Acrilamida	9.5Grs		
Bisacrilamida	0.5 Grs		
Agua Destilada	cpb 50 ml		
b) Solución de Anfolitos al 40%	pH 6-8	0.9 ml	1.0 ml
c) Solución de Anfolitos al 40%	pH 7-9	0.9 ml	-----
d) Agua Destilada		11.7 ml	9.36 ml
e) Persulfato de amonio al 3%		0.18 ml	0.1 ml
f) TEMED		3.5 $\mu$ l	5.0 $\mu$ L
g) KCN		-----	12 $\mu$ g

El patrón de bandeo óptimo se observa en la figura 10, en la cual se muestran las bandas y los puntos de migración de las Hbs A, A<sub>2</sub>, F y S.

#### B) ESTUDIO EN POBLACION SELECCIONADA (GRUPO I) Y POBLACION HOSPITALARIA (GRUPO II)

Con esta metodología se realizó la electroforesis a 132 muestras, de las cuales 32 son del grupo I, en el cual se identificó un portador de Hb Bart sólo observado por IEE

(Fig 10) y un portador de Hb S, previamente identificado por electroforesis en acetato de celulosa.

En el grupo II se identificó 1 portador de Hb S de los 100 pacientes estudiados con IEE.

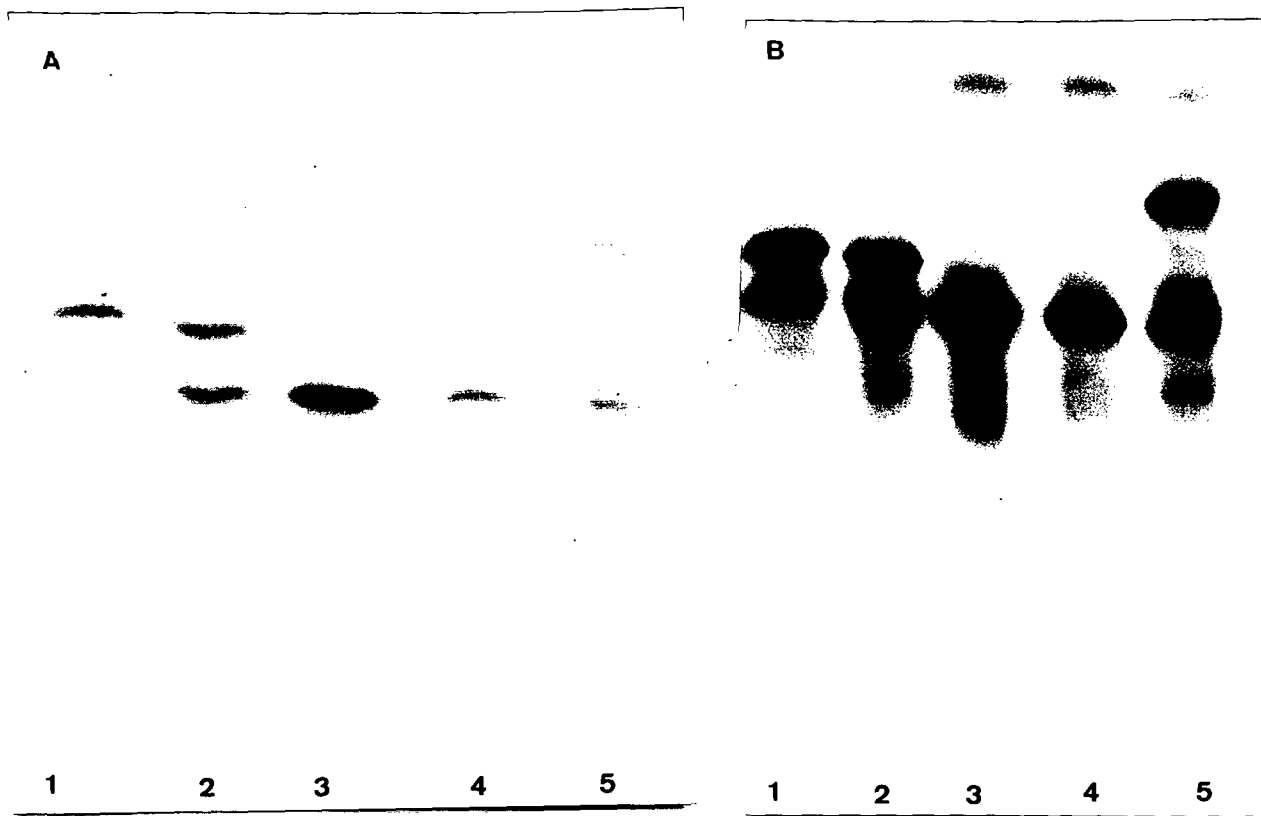


Fig. 10 Patrón de bandeo con anfolitos 6-8 de pH, añadiendo KCN al gel, antes de ser teñido (A) y despues de teñido con Ortofoluidina. Carril 1, Hb f; Carril 2, Hb Bart; Carril 3 y Carril 4, Hb N; Carril 5, Hb S.

VIII D I S C U S I O N

## VII DISCUSION

### A) ESTANDARIZACION

Los geles elaborados en nuestro laboratorio a una concentración del 5% como se trabajó en un inicio, sufrían una deshidratación por evaporación debido al paso de voltaje de 200 volts durante el precorrimiento, ocasionando además, adelgazar el grosor de nuestro gel, perdiendo este, resistencia y finalmente quemándose. Al modificar la concentración a un 6%, aún cuando el gel sufría de deshidratación, soportaba un voltaje de 1200 volts durante el precorrimiento y corrimiento, y no perdía su resistencia ni su consistencia, posiblemente debido a que la red establecida en nuestro gel por los polimeros de poliacrilamida son más estrechos.

Para identificar la banda rara se preparó MetaHemoglobina y diferentes formas de hemolizados. El patrón electroforetico reveló que no se trata de esta Hb sino de otra diferente, que migró en forma similar a la Hb F.

La movilidad de la banda rara presente en los corrimientos de estandarización para IEE, es muy semejante a la observada por la Hb F. Comparando los pI de las bandas correspondientes de la Hb A (pI 6.98), Hb A<sub>2</sub>(pI 7.42), Hb A<sub>1c</sub>(pI 6.96), MetaHemoglobina (pI 7.3) y la banda no identificada (pI 7.17), (1,30) tiene una migración similar a la Hb F como lo muestra la figura 8.



El empleo de un solo tipo de anfolitos no mostró variaciones en nuestro gel, dado que obtuvimos un gran poder de resolución de bandeos. Los trabajos publicados refieren al empleo de 2 tipos de anfolitos con diferentes rangos de pH, para obtener una mejor resolución en el bandeo (30,33,36).

B) ESTUDIO EN POBLACION SELECCIONADA (GRUPO I) Y POBLACION HOSPITALARIA (GRUPO II)

De 32 Proposito estudiados con diagnóstico clínico de AH del grupo I solo 2 portadores de variantes estructurales fueron identificados, lo que representa el 6.2% (2/32), el 3.1% portador de Hb Bart y el resto portador de Hb S.

El portador de Hb Bart ( $\gamma_4$ ) fue un recién nacido que falleció a consecuencia de hidropesía Fetal. En la electroforesis de acetato de celulosa solo se observó Hb F y Hb A, debido a que el paciente fue transfundido antes de la realización de la pruebas. No fue posible establecer su genotipo por que no se realizó el estudio familiar. El IEE permitió la identificación de esta variante, la cual hubiese pasado desapercibida por la electroforesis de acetato de celulosa.

Por otro lado, el portador de Hb S es un niño con genotipo  $\beta^s/\beta^A$  deducido del estudio familiar y del patrón electroforetico observado.

La frecuencia observada por nosotros para Hb S (3.1%) es similar al reportado por Perez y col. (31), en un estudio realizado en 129 pacientes, quien encontró 4 portadores de Hb S (3.1%).

Un factor limitante para la realización de esta metodología, es el alto costo comercial de los anfolitos, pero el costo por muestra comparado con la electroforesis de acetato de celulosa, la diferencia es poca, dado que en la placa electroforetica para IEE se puede aplicar como máximo 25 muestras, mientras que en las tiras de acetato de celulosa solo se pueden colocar 8 muestras, esto indica que se corren un 200% más de muestra que en acetato de celulosa.

La electroforesis en acetato de celulosa, es una metodología rápida, sencilla y económica pero con sensibilidad limitada y un poder de resolución pobre, en comparación al IEE. El IEE en geles de poliacrilamida tiene ventajas sobre otras metodologías tales como:

- a) El tiempo de corrimiento es corto
- b) Tiene un excelente poder de resolución de 0.02 unidades de pH.
- c) Requiere una cantidad de 5 a 10  $\mu$ l. de muestra hemolizada.

**IX C O N C L U S I O N E S**

## IX CONCLUSIONES

1. Se identificó un portador de Hb Bart en un paciente con anemia hemolítica.
2. Se identificó un portador de Hb S en el estudio de población seleccionada
3. El método es reproducible y permite identificar variantes estructurales de la Hemoglobina, no identificables por métodos convencionales.

X B I B L I O G R A F I A

## X BIBLIOGRAFIA

1. BUNN, H.F. and FORGET, B.C.: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. W.B. Saunders Company, 1986.
2. PERUTZ M.F. La Estructura de la Hemoglobina y el Transporte Respiratorio. *Scient. Am.* 29:40-55, 1979.
3. BRUNO C. Introducción al Estudio de las Hemoglobinopatías. Ed. Científico Técnico, La Habana, Cuba 1981
4. LENHINGER A.L., Bioquímica. Ed. Omega; 2ª edición. Barcelona, 1985
5. WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. The Thalassemia Syndromes, 3rd. Ed. Oxford. Blackwell Scientific Publications 1981.
6. DICKERSON R.E., GETS I.: Structure and Function, Evolution and Pathology. The Benjamin/Cummings. Publishing Company, INC, 1983.
7. MCKUSICK, V.A.: Mendelian Inheritance In Man. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 10th Ed., 1992.
8. DEISSEROTH, A., NIENHUIS, A., TURNER, P., VELEZ, P., ANDERSON, W.F., RUDDLE, F.H., LAWRENCE, J.: Red Cell 12:205, 1987.
9. BREUNING, M.H., MADON, K., VERJAAL, M., WIJNEN, J.T., KHAN, P., PEARSON, P.L.: Human Alpha-Globin Maps to pter-p 13.3 in Chromosome 16 Distal to PGP. *Hum. Genet.* 76(3):286-9, 1987.
10. LEUNG, S.O. PROUDFOOT, N.J., WHITELAW, E.: The Gens for Theta-globin in Transcribed in Human Fetal Erytroid

- Tissue. Nature 329:551, 1987.
11. ALBITAR, M., PESCHELE, C., LIEBHABER, S.A.: Theta, Zeta, and Epsilon Globin Messenger RNAs are Expressed in Adults. Blood 1;74(2):629-37, 1989
  12. DEISSEROTH, A., NIHENHUIS, A., LAWRENCE, J., GILES, R., TURNER, P., RUDDLE, F.H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5239, 1979.
  13. EFSTRATIADIS, A., POSAKONI, J.W., MANIATIS, T., LAWN, R.M., O'CONNELL, C., SPRITZ, R.A., DERIEL, J.K., FORGET, B., WEASSMAN, S.M.: The Estructure and Evolution of the Human Beta-Globin Gene Family. Cell 21(3):653, 1980.
  14. BRREATHNACH, R., CHAMBON, P.: Organization and Expression of Eucariotic Aplit Gene Coding for Proteins. Ann. Rev. Biochem 50:349-83 1981.
  15. LI, Q., ZHOU, B., POWERS, P. ENVER, T., STAMATOYANNOPOULOS, G.: Primary Structure of the Goat Beta-Globin Gene Locus Control Region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8207, 1990
  16. HIGGS, D.R., VICKERS, M.A., WILKIE, A.O.M., WEATHERALL, D.J.: A Review of the Molecular Genetics of the Human Alpha-Globin Gene Cluster. Blood 73:1081, 1989
  17. KAZAZIAN, H.H. Jr., BOEHN, S.D: Molecular Basis and Prenatal Diagnosis of Beta-Thalassemia. Blood 72:1107, 1988.
  18. IBARRA, B., ROMERO, F., DELGADO-LAMAS, J.L., CARRILLO,

C.: Genética y Hematología. En: Genética Clínica.  
Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades  
Hereditarias. Guízar-Vazquez, J. Ed. (en prensa).

19. BAIGET, M., NUNES, V.: Patología de la Hemoglobina: de la proteína al gen. Sangre 1988: 15-23.
20. SCRIVER C.R.: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Six Editon. Vol 2. Mac Graw Hill 1989.
21. WHO, Working group: Bull WHO 60:646, 1982.
22. MUÑOS, J., LAVALLE, A.: Un Caso de Anemia en Células de Hoz ó Drepanocitemia. Bol. Méd. Hosp. Inf. 7:3 (1950)
23. LISKER, R.: Distribution of Abnormal Hemoglobin in México. Genetical Funtional, and Physical Studies of Hemoglobin KARGER BASILEA, 1971.
24. IBARRA, B. Talasemias y Otros Defectos de la Hemoglobina en Población Seleccionada del Noroccidente de México. Tesis de Maestria en Genética Humana. Escuela de Graduados. Universidad de Guadalajara. 1993.
25. HARRIS H. and HOPKINSON D.A.: Handbock of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland Publishing Company. NORTH-HOLLAND 1976
26. HUISMAN, T H J.: The Hemoglobinopaties Techniques of Identification, Clinical and Biochemical Analysis 6. Dekker, Ney York, 1977.



27. RUIZ-REYES, G.: Hemoglobin Variants in México. HEMOGLOBIN 7:603-10. 1983
28. IBARRA, B., VACA, G., FRANCO-GAMBOA, E., GARCI-CRUZ, D., DE LA MORA, E., CANTU, J.M.: Abnormal hemoglobin in Northwestern México. ACTA ANTHROPOGENETE 6: 217-23 1982.
29. WEATHERALL, D.J.: The Thalassemias. Methodos in Hematology. Churchill Livingstone, Edinburgh.
30. BASSET, P., BEUZARD, Y., GAREL, M.C. and ROSA, J.: Isoelectric Focusing of Human Hemoglobin: Its Application to Screening, to the Characterization of 70 Variants, and to the Study of Modified Fractions of Normal Hemoglobins. BLOOD 51:971-82, 1978.
31. PEREZ, G., de la PEÑA, M.E., ESPARZA, A., IBARRA, B.: Alteraciones de la Hemoglobina en Pacientes con Anemia Hemolítica. ARCH INVEST MED (Méx) 21:101-104, 1990.
32. IBARRA, B.: Detección de Alteraciones de la Hemoglobina en una Muestra Poblacional del Noroccidente de México. ARCH INVEST MED (MEX) 11:461-6, 1980.
33. DUBART, A., GOOSSENS, M., BEUZARD, Y., MONPLAISIR, N., TESTA, U., BASSET, P. and ROSA, J.: Prenatal Diagnosis of hemoglobinopathies: Comparison of the Results Obtained by Isoelectric Focusing of Hemoglobins and by Chromatography of Radioactive Globin Chains. BLOOD 56:1092-9, 1980.
34. SAENZ I.G: Manual de Laboratorio Latinoamericano. SAN JOSE COSTA RICA 1980.

35. GIULIANI, A.: Thin-Layer Isoelectric focusing of Hemoglobin Variants: Screening and Determination of Isoelectric points. *Clinical Chimical Acta*, 90(1978) 19-20.
36. GALACTEROS, F., ROSA, J.: Cord Blood Screening for Hemoglobin Abnormalities by Thin Layer Isoelectric Focusing. *Blood* 56:6, 1980.

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Expediente .....

Número .....

Sección .....

C. JUAN CARLOS SANCHEZ RAMIREZ  
P R E S E N T E . -

Manifetamos a usted, que con esta fecha ha sido aprob  
el tema de tesis "IDENTIFICACION DE VARIANTES ESTRUCTURALES DE LA HEMOGLOP  
MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE EN PACIENTES CON ANEMIA HEMOLITICA Y EN POBLAC  
HOSPITALARIA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado c  
Director de dicha Tesis el M. en C. Francisco J. Perea D.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., 30 de Agosto de 1993

EL DIRECTOR

DR. EULOGIO PIMENTA BARRIOS

FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- El M.en C. Francisco J. Perea D., Director de Tesis.-pte.

c.c.p- El expediente del alumno

EPB/MGGG/cglr.

**M en C. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE**  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
de la Universidad de Guadalajara.  
**P R E S E N T E .**

Por medio de la presente, queremos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis titulado **IDENTIFICACION DE VARIANTES DE LA HEMOGLOBINA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE EN PACIENTES CON ANEMIA HEMOLITICA Y EN POBLACION HOSPITALARIA** que realizó el pasante en Biología **JUAN CARLOS SANCHEZ RAMIREZ** código número **83479094**. Consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo nos despedimos de Usted.

**A T E N T A M E N T E**

Guadalajara Jal. 15 de Marzo de 1994

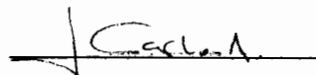
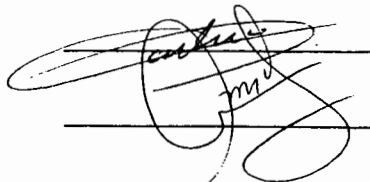
**EL DIRECTOR DE LA TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
**M. EN C. FRANCISCO J. PEREA DIAZ**

**SINODALES**

**FIRMA**

- 1.- M. en C. **CARLOS ALVAREZ MOYA**
- 2.- Q.F.B. **ADOLFO CARDENAS ORTEGA**
- 3.- Q.F.B. **ROSA MA. DOMINGUEZ ARIAS**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
