

1993 - 1997 E

Reg. No. 086502534

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



"DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PORTADORAS DE
HEMOFILIA A Y B MEDIANTE POLIMORFISMOS
INTRAGÉNICOS EN POBLACIÓN MEXICANA"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A
LIDIA CERDA AGUILAR

LAS AGUJAS ZAPOPAN, JALISCO. MARZO DE 1998

**El presente trabajo fue realizado en el
laboratorio de Bioquímica IV de la División de
Genética del Centro de Investigación
Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara,
Jal.**

**Director de Tesis: M. en C. Ana R. Jaloma Cruz.
Asesor: M. en C. Luis Eduardo Figuera Villanueva.**

AGRADECIMIENTOS.

BRUNO M. GONZALEZ

- A **MIS PAPAS Y HERMANOS**, por todo el apoyo y amor que siempre me han brindado a lo largo de mi vida.
- Muy especialmente a **REBE**, porque todo lo que aprendí es gracias a su conocimiento, apoyo, paciencia y sobre todo a su amistad.
- A mi jefe de laboratorio **LUIS**, por la oportunidad que me brindó de enriquecer mis conocimientos.
- A mis amigos y compañeros de laboratorio **MIRLA, ELIAS, CHAVA, CARLOS** y **LUCY**, por la ayuda en los momentos en que la requerí.
- A **HECTOR** mi amigo de siempre, porque gracias a ti encontré mi verdadera vocación.
- A **JAVI**, por su gran amistad y atención hacia mi en todo momento.
- A mi tía **MARTHA**, por su apoyo y cariño incondicional de siempre.
- A mis **MAESTROS**, por sus conocimientos que son para mí una valiosa herencia.
- A mis amigas **ELIA, MAGALY, MARTHA** y **EDITH** por los momentos grandiosos que hemos pasado juntas y a quienes recordaré siempre con mucho cariño.



DEDICATORIA.

Este trabajo te lo dedico a ti mi pequeño Eddie, por el tiempo que no he estado a tu lado y por esos momentos tan valiosos cuando estoy contigo.

Aquí va impreso todo mi amor y el que aún falta por darte el resto de mi vida.

Te amo.

INDICE

<i>Sección</i>	<i>Página</i>
Resumen	1
I. INTRODUCCION	2
1. Hemostasis	3
Cuadro 1	
Figura 1	
2. Qué es la Hemofilia	6
II. ANTECEDENTES	7
1. Generalidades sobre hemofilia A	8
1.1 Características de la hemofilia A	8
1.1.1 Definición	
1.1.2 Frecuencia	
1.2 Características clínicas	8
1.2.1 Manifestaciones clínicas	
Cuadro 2	
1.2.2 Diagnóstico clínico	10
1.2.3 Patofisiología	
1.3 Estructura del gen del FVIII	11
1.3.1 Características estructurales del gen FVIII	
Figura 2	
1.4 Patología molecular de la hemofilia A	11
1.4.1 Tipos de mutaciones en el gen del FVIII	
1.4.2 Deleciones en el gen del FVIII	12
1.4.3 Mutaciones puntuales en el gen del FVIII	
1.4.4 Una mutación "Hot Spot" en intrón 22	
e inversiones comunes involucradas	
en el gen del FVIII	13

1.4.5	Hipermutabilidad del dinucleótido CpG	14
1.5	Diagnóstico prenatal y de portadoras	14
1.6	Hemofilia A en mujeres	15
2.	Generalidades sobre hemofilia B	17
2.1	Características de la hemofilia B	17
2.1.1	Definición	
2.1.2	Frecuencia	
2.2	Características clínicas	17
2.2.1	Manifestaciones clínicas	
	Cuadro 3	
2.2.2	Patofisiología	19
2.3	Estructura del gen del FIX	19
2.3.1	Características estructurales del gen FIX	
	Figura 3	
2.4	Patología molecular de la hemofilia B	20
2.4.1	Tipos de mutaciones en el gen del FIX	
3.	Diagnóstico prenatal y de portadoras	22
3.1	Casos familiares	22
3.2	Casos aislados	23
3.3	Diagnóstico molecular de hemofilias A y B	23
3.3.1	Polimorfismos intragénicos en el diagnóstico de portadoras	25
	Figura 4	
3.3.2	Ventajas de los polimorfismos intragénicos	26
3.3.3	Desventajas de los polimorfismos intragénicos	27
3.3.4	Estudios de hemofilia a nivel molecular en población mexicana	
4.	Polimorfismos intragénicos seleccionados	29
4.1	Polimorfismos intragénicos del locus FVIII	29
4.1.1	Polimorfismo de A/wNI (intrón 7)	
4.1.2	Polimorfismo de Bcl (intrón 18)	

4.2 Polimorfismos intragénicos del locus FIX	30
4.2.1 Polimorfismo de <i>Hinf</i> I (intrón I)	
4.2.2 Polimorfismo de <i>Taq</i> I (intrón IV)	
4.2.3 Polimorfismo de <i>Hha</i> I (extremo 3' terminal)	
III. JUSTIFICACION	31
IV. OBJETIVOS	33
A Objetivo general	
B Objetivos particulares	
V. MATERIAL Y METODOS	35
1. Descripción del estudio	36
1.1 Tipo de estudio	
1.2 Universo de estudio	
1.3 Composición de la muestra	
2. Protocolo de trabajo	38
3. Descripción de la metodología	39
3.1 Purificación de DNA	39
3.1.1 Método de Fenol-Cloroformo	
3.1.2 Micrométodo de extracción de DNA por CTAB/DTAB	41
3.2 Cuantificación de DNA	42
3.2.1 Cuantificación por espectrofotómetro	
3.2.2 Evaluación del DNA por electroforesis en agarosa	
3.3 Análisis de los polimorfismos intragénicos	43
3.3.1 Condiciones de amplificación de DNA por PCR	
3.3.2 Comprobación de la amplificación de DNA	
3.3.3 Digestión con enzimas de restricción	44

3.3.4 Análisis del producto de digestión	
4. Análisis de resultados	45
4.1 Asignación de portadora	45
4.2 Glosario de términos en árboles genealógicos	46
VI. RESULTADOS	47
1. Electroforesis en poliacrilamida para la detección de alelos de los RFLP's seleccionados	48
1.1 Marcadores intragénicos del locus FVIII	49
1.1.1 <i>AlwNI</i>	
Figura 5	
1.1.2 <i>BclI</i>	
Figura 6	
1.2 Marcadores intragénicos del locus FIX	50
1.2.1 <i>HinfI</i>	
Figura 7	
1.2.2 <i>TaqI</i>	
Figura 8	
1.2.3 <i>HhaI</i>	51
Figura 9	
2. Análisis de segregación de alelos en las familias informativas para el diagnóstico de portadoras	52
3. Resultados globales del diagnóstico de portadoras en familias informativas	66
3.1 Resultados de los marcadores para el gen FVIII	66
3.2 Resultados de los marcadores para el gen FIX	67
4. Observación de la presencia de una posible delección	68
VII. DISCUSION	69
VIII. CONCLUSIONES	72

IX. BIBLIOGRAFIA	74
X. ANEXOS	78
Anexo 1. Preparación de reactivos	79
A. Reactivos para la purificación de DNA	79
B. Reactivos para electroforesis de agarosa y poliacrilamida	81
Anexo 2. Condiciones de PCR y digestión con enzimas de restricción para el análisis de RFLP's intragénicos de los loci FVIII y FIX	85
A. Marcadores del gen FVIII	85
1A. Polimorfismo de <i>A/wNI</i> , intrón 7	
2A. Polimorfismo de <i>BclI</i> , intrón 18	86
B. Marcadores del gen FIX	88
1B. Polimorfismo de ins/del de 50 pb c/sitio <i>HinfI</i> , intrón I	
2B. Polimorfismo de <i>TaqI</i> , intrón IV	89
3B. Polimorfismo de <i>HhaI</i> , extremo 3' terminal	90
Anexo 3. Carta de consentimiento informado para la participación en el proyecto de investigación	92



RESUMEN

Las hemofilias A y B son los padecimientos hemorrágicos hereditarios más frecuentes, debidos a la deficiencia de los factores VIII y IX de la coagulación respectivamente. Se transmiten con un patrón de herencia ligado al X recesivo, por lo que encontramos típicamente varones afectados y mujeres portadoras.

El asesoramiento genético en ambas entidades está dirigido consecuentemente al diagnóstico de portadoras.

La gran heterogeneidad mutacional de las hemofilias A y B obliga a utilizar métodos indirectos para dicho fin, basados en el empleo de polimorfismos intragénicos.

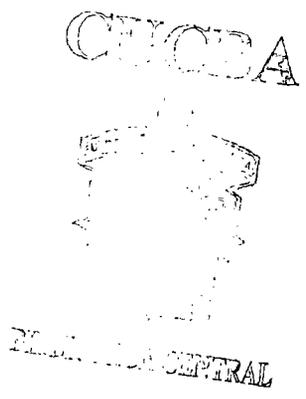
A partir de un estudio en el que se identificaron los polimorfismos de restricción (RFLP's) de mayor informatividad en mujeres normales de nuestra población, se seleccionaron los marcadores *BclI* y *AlwNI* del gen FVIII y los marcadores *HinfI*, *TaqI* y *HhaI* del gen FIX.

Mediante la amplificación por PCR de las regiones intragénicas específicas y su digestión con enzimas de restricción para la detección de los RFLP's mencionados, se analizó la segregación de sus alelos en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

En el presente trabajo se estudiaron 24 familias con hemofilia A y 10 familias con hemofilia B, y fue posible realizar el diagnóstico de portadoras en 13 familias informativas para alguno de los marcadores probados: 7 familias con hemofilia A (29%): 3 casos familiares y 4 esporádicos, y 6 familias con hemofilia B (60%): 4 casos familiares y 2 esporádicos.

En total se analizaron 40 mujeres encontrando 2 portadoras, 18 no portadoras y 20 a quienes no fue posible diagnosticar. Así de acuerdo con los resultados anteriores se logró diagnosticar a 41% de los casos en las familias con hemofilia A y a 65% de los casos en las familias con hemofilia B.

I. INTRODUCCION



1. Hemostasis

La hemostasis involucra un grupo de proteínas plasmáticas y plaquetas que interaccionan con el endotelio vascular. En el sitio del daño vascular primeramente se forma un tapón de plaquetas seguido de un coágulo de fibrina. La formación del tapón de plaquetas requiere del factor von Willebrand, el cual es una proteína del plasma que forma un puente entre el tapón plaquetario y el subendotelio.

Esta reacción es llamada "adhesión plaquetaria" e involucra un receptor de membrana específico de plaquetas llamada glicoproteína Ib que se une al factor von Willebrand.

La adhesión plaquetaria es inmediatamente seguida por la agregación plaquetaria; en esta reacción el fibrinógeno forma un puente entre las plaquetas uniéndolas unas a otras por medio de una glicoproteína llamada IIb/IIIa. Durante la formación del tapón de plaquetas, los fosfolípidos hacen posible que la cascada de la coagulación se lleve a cabo.

Los eventos precisos que disparan la cascada de la coagulación son aún desconocidos, pero parece que el factor tisular, una glicoproteína de superficie celular del subendotelio, juega un papel importante en el proceso.

Las proteínas plasmáticas que participan en la cascada de la coagulación circulan en la sangre como precursores o formas inactivas, estas proteínas son convertidas a enzimas o cofactores que eventualmente conducen a la generación de trombina y de fibrina. Las proteínas plasmáticas y sus cofactores se designan comúnmente con números romanos (cuadro 1).

Se ha demostrado que las proteínas plasmáticas involucradas en la formación de fibrina y su regulación, a menudo comparten una homología considerable en la secuencia de aminoácidos, función fisiológica y mecanismo de acción.

Las proteínas dependientes de vitamina K como son protrombina, factores VII, IX, X, proteína C y proteína S, comparten dominios comunes. Todas ellas, excepto la proteína S, son convertidas a proteasas de serina por proteólisis menor. De la misma manera los factores V y VIII son grandes cadenas sencillas

de glicoproteínas con una secuencia homóloga considerable. Estas dos proteínas también participan en la cascada de la coagulación como cofactores de las proteasas en presencia de calcio y fosfolípidos seguida de su activación por una proteólisis menor. Similarmente, el factor XI y la precalicreína son moléculas altamente homólogas, que comparten dominios comunes y son convertidas a proteasas de serina por proteólisis menor (1).

Cuadro 1. Nomenclatura asignada para los factores de la cascada de la coagulación, proteínas asociadas y plaquetas.

Designación numérica	Nombre común
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Factor tisular
Factor IV	Iones de Calcio
Factor V	Proacelerina
Factor VII	Proconvertina
Factor VIII	Factor antihemofílico
Factor IX	Factor Christmas
Factor X	Factor Stuart
Factor XI	Antecedente de tromboplastina del plasma
Factor XII	Factor Hageman
Factor XIII	Factor estabilizante de fibrina
---	Precalicreína
---	Kininógeno de alto peso molecular (HMW)
---	Proteína C
---	Proteína S
---	Antitrombina III
---	Cofactor de heparina II
---	Factor von Willebrand
---	Plaquetas

CASCADA DE LA COAGULACION

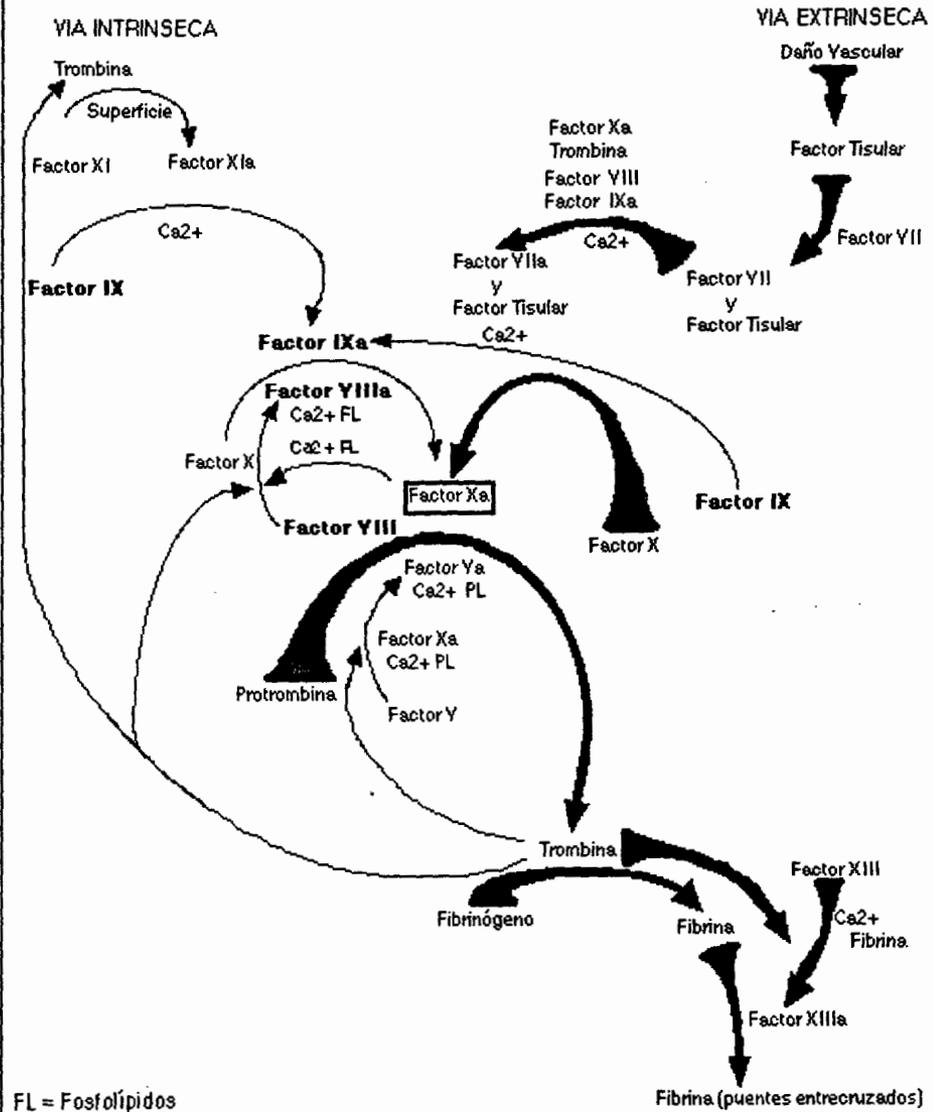


FIG. 1 Cascada de la coagulación y formación de fibrina por la vía extrínseca (der., flechas gruesas) e intrínseca (izq., flechas delgadas), resaltando la participación de los factores **VIII** y **IX** (en **negrita**). Ambas vías convergen en la formación del factor Xa. Tomado Davie E.W. et al., 1991, citado en (1).

2. Qué es la hemofilia

Tanto la hemofilia A como la hemofilia B son enfermedades hemorrágicas hereditarias, transmitidas con un patrón recesivo ligado al cromosoma X, producidas por la falta de un factor de la coagulación distinto.

El diagnóstico preciso de la enfermedad se basa en métodos de laboratorio, el tratamiento etiológico consiste en administrar el factor deficiente.

La hemofilia A (carencia del factor VIII) es la que presenta el mayor número de trastornos de la coagulación descritos en la literatura médica. La hemofilia B (deficiencia del FIX) constituye 1 de cada 5 casos. Ambos tipos dependen exclusivamente de la transmisión hereditaria de la mutación aunque es muy común la aparición de nuevas mutaciones en ambos genes; el gen anormal heredado origina un retardo de la coagulación, debido a la dificultad de la formación de tromboplastina.

Ambas se manifiestan por la presencia de hemorragias, en general muy intensas, provocadas por traumatismos a menudo insignificantes, hasta tal punto que dichas hemorragias, de localización muy diversa, pueden aparecer espontáneamente.

El tratamiento comprende la prevención de posibles accidentes* (evitar ejercicios violentos, etc.), el tratamiento general de las hemorragias y el de la afección causal, consiste en la transfusión de sangre o plasma total en el caso del FIX o crioprecipitado enriquecido en FVIII-von Willebrand (que contiene la hemoglobina antihemofílica) (2).

COPY



SECRETARIA GENERAL

II. ANTECEDENTES

1. Generalidades sobre hemofilia A

1.1 Características de la hemofilia A

1.1.1 Definición

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario que se caracteriza por una deficiencia en la actividad del factor VIII (FVIII), el cual es componente clave en la cascada de la coagulación (3).

1.1.2 Frecuencia

Constituye el 85% de los trastornos hemorrágicos hereditarios; aproximadamente 1 de 5,000 a 10,000 varones nacidos vivos son afectados en la población (3).

1.2 Características clínicas

1.2.1 Manifestaciones clínicas

El grado de severidad de la enfermedad está determinado por los niveles de FVIII mediante una prueba de coagulación basada en el tiempo parcial de tromboplastina (TPT) (4). (Cuadro 2).

Cuadro 2. Severidad clínica de la hemofilia A.

Factor VIII (U/dl)	Manifestaciones clínicas
<2	Severa: Sangrado espontáneo frecuente en articulaciones, músculos y órganos internos.
2-10	Moderada: Algunos sangrados espontáneos, hemorragias por traumas menores.
>10-30	Leve: Hemorragia sólo después de un trauma significativo o por intervención quirúrgica.

1 U = Cantidad coagulante del FVIII en una alícuota de 1 dl de plasma

De acuerdo a un criterio clínico que ha mostrado mayor correlación con la etiología de la alteración a nivel molecular, se ha establecido una nueva manera de clasificación de la hemofilia. Esta es aplicada tanto a hemofilia A como a B; la severidad de este padecimiento se clasifica dentro de tres grupos: **severa**, incluye a aquellos pacientes con episodios frecuentes de hemorragias (seis o más por año) y un historial de hemartrosis espontáneas involucrando a más de una articulación; la forma **leve**, incluye a aquellos pacientes con hemorragias poco frecuentes y/o debidas a cirugías o traumas mayores; mientras que la forma **moderada**, incluye a los pacientes cuyos rasgos clínicos son intermedios de manera que no encuadran dentro de las categorías anteriores (4).

Las zonas comunmente afectadas son las articulaciones como tobillos, rodillas, caderas y codos. Si en estos sitios no se tratan las hemorragias intracapsulares, pueden causar inflamación severa, dolor y rigidez. Las hemorragias musculares se pueden percibir en cualquier sitio del cuerpo pero más comunmente en los músculos mayores (3).

1.2.2 Diagnóstico clínico

Los casos de hemofilia severa se detectan con facilidad, porque desde el nacimiento aparecen hematomas espontáneos cuando empiezan a gatear y es común que se presenten hemorragias en las articulaciones. En los casos de hemofilia moderada y sobre todo leve, la mayoría de las veces se diagnostican en la vida adulta y en algunas ocasiones no se llegan a identificar hasta que se tiene un trauma importante o una intervención quirúrgica.

La confirmación del diagnóstico se lleva a cabo por la discriminación de la deficiencia del factor VIII del resto de las proteínas plasmáticas con las siguientes pruebas de laboratorio (3):

- Tiempo parcial de tromboplastina (TPT)
- Tiempo normal de protrombina (TP)
- Tiempo normal de coagulación de trombina (TCT)
- Tiempo normal de sangrado
- Cuenta plaquetaria normal

1.2.3 Patofisiología

Todas las características clínicas de la hemofilia A son causadas por la deficiencia del FVIII de la coagulación. Los pacientes son incapaces de producir niveles normales de factor VIII a causa de diversos tipos de mutaciones en el locus del mismo.

La deficiencia del cofactor baja drásticamente el porcentaje de producción del factor Xa, aún cuando los demás factores de la coagulación y plaquetas están presentes en cantidades normales (3). (Fig. 1).

1.3 Estructura del gen del FVIII

1.3.1 Características estructurales del gen del FVIII

El gen del FVIII contiene 186 kb (aproximadamente 0.1% del DNA del cromosoma X) y consta de 26 exones y 25 intrones. La longitud de los exones varía de 69 a 262 pb con excepción del exón 14 que tiene 3,106 pb y el exón 26 de 1,958 pb. Algunas de las secuencias intrónicas son bastante grandes, el intrón 22 tiene 32 kb, y los intrones 1, 6, 13, 14 y 26 tienen de 14 a 23 kb. El gen del FVIII está localizado en el cromosoma X, banda Xq28 (3).

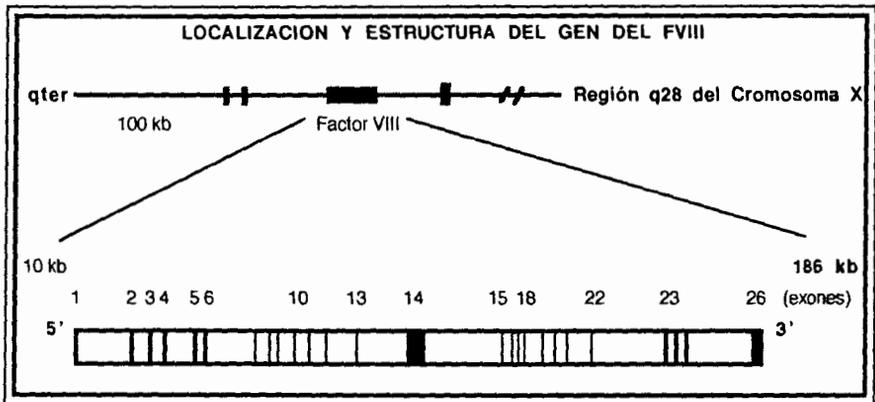


FIG. 2 Localización cromosómica del gen del Factor VIII (FVIII).

1.4 Patología molecular de la hemofilia A

1.4.1 Tipos de mutaciones en el gen del FVIII

El gen del FVIII se caracteriza por presentar gran heterogeneidad mutacional, por lo que cada caso podría considerarse como una mutación distinta.

Hasta hace poco tiempo, la hemofilia A fue una enfermedad genética letal

y afectó a hombres que tuvieron poca oportunidad de reproducirse. Por lo tanto, la frecuencia de genes observada para el padecimiento indica que una gran fracción de casos puede aumentar por una nueva mutación. Un gran número de mutaciones pueden producir la enfermedad y más del 50% de pacientes no relacionados tienen una mutación diferente (3).

1.4.2 Deleciones en el gen del FVIII

Cerca del 95% de las mutaciones del FVIII que han sido caracterizadas por la búsqueda de la región codificadora completa del gen, son mutaciones puntuales que consisten en las substituciones, deleciones e inserciones de un pequeño número de nucleótidos. Las deleciones se presentan en cerca del 5%, mientras que las grandes inserciones ocurren por debajo del 1%. Las grandes deleciones a menudo están asociadas con la formación de inhibidores y no muestran una predilección particular por una u otra región del gen de este factor.

La mayoría de los casos que resultan de la pérdida no homóloga de una región del gen, generalmente no son causadas por el mal apareamiento del DNA homólogo, como en el caso de las secuencias Alu, que ocasionan entrecruzamientos desiguales (3).

1.4.3 Mutaciones puntuales en el gen del FVIII

Las substituciones de nucleótidos observadas, que generalmente producen cambios de aminoácidos, están distribuidas por todo el gen. Sin embargo, hay ciertas regiones donde se concentran como el dominio A2. En la mayoría de estas mutaciones, tanto la actividad como la producción del FVIII, se reduce en el plasma por un mecanismo que se desconoce y es muy difícil su estudio (3).

1.4.4 Una mutación “Hot Spot” en intrón 22 e inversiones comunes involucradas en el gen del FVIII

Después del rastreo de mutaciones en todos los exones del gen del FVIII utilizando electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), Higuchi et al. (1991), encontraron las mutaciones causantes de cerca del 90% de los pacientes con hemofilia A leve y moderada.

Sin embargo, cuando se estudiaron pacientes severamente afectados por el mismo procedimiento, se detectaron mutaciones sólo en el 60% de éstos.

La dificultad para caracterizar las mutaciones en hemofilia A severa fue un misterio, incluso se comenzó a especular que otro sitio fuera del gen pudiera ser el responsable de muchos casos del padecimiento severo. Naylor et al. (1993) utilizó un estudio de transcripción ilegítima del gen del FVIII para desenmascarar esta especulación y dió los principios de una respuesta al misterio. Encontraron que los transcritos de RNA eran interrumpidos entre los exones 22 y 23 en 40% de los pacientes con hemofilia A severa. Estos pacientes tenían una o más mutaciones diferentes dentro del intrón 22. Dicha región puede considerarse un sitio “hot spot” inusual para mutaciones porque contiene un promotor que produce un transcrito que contiene 8 exones en intrón 22 que se conectan a los exones 23 al 26. Existen dos copias de este gen duplicadas río arriba en la región telomérica.

Gitschier y col. (1985) propusieron recientemente un mecanismo de apareamiento inusual entre éste gen anidado en FVIII y alguno de los genes duplicados en la región telomérica, así una inversión ocasiona una recombinación homóloga y con ello una de las dos posibles deleciones mayores. Dicho modelo ha sido ya corroborado experimentalmente.

Así, el 25% de los pacientes con hemofilia A (40% de casos severos) pueden presentar este tipo de mutación detectable fácilmente en forma directa para el diagnóstico prenatal y de portadoras (3).

1.4.5 Hipermutabilidad del dinucleótido CpG

Un sitio "hotspot" de ocurrencia de mutación existe en general en el DNA genómico humano en el dinucleótido CpG, en el cual la mutación consiste en un cambio de CG a TG, o si el cambio de C a T ocurre en la cadena complementaria, se ocasiona un cambio CG a CA.

Estos dinucleótidos CG son el único sitio "hotspot" conocido y ocurren porque el residuo de citosina 5' a guanina es el único sitio de metilación en el DNA de mamíferos. Estas citosinas son metiladas por una metiltransferasa para producir 5-metilcitosina. Cuando esta es desaminada espontáneamente en una reacción no enzimática, se produce timina. Las sustituciones CG a TG o CA se presentan en cerca del 35% de las mutaciones observadas en el gen del FVIII y representan del 25 al 40% de las mutaciones observadas en una amplia variedad de seres humanos (3).

1.5 Diagnóstico prenatal y de portadoras

Las dos inversiones en intrón 22 son fácilmente detectables por Southern Blot y se presentan por arriba del 40% en las mutaciones del FVIII en familias con casos esporádicos severos. Así, esta observación altera fuertemente nuestra posibilidad de proveer un consejo exacto para un grupo de familias que presentan casos esporádicos de hemofilia A severa, debido a que la alta incidencia de nuevas mutaciones ocasiona que el diagnóstico de DNA no esté disponible para muchas familias a quienes podría ser muy valioso un diagnóstico preciso de portadoras. Esto ha cambiado para las familias en las que los miembros afectados portan éste tipo de deleción.

Sin embargo, debido a la enorme variedad de otras mutaciones que producen la enfermedad, en el 60% de los casos restantes, el diagnóstico prenatal y de portadoras por análisis del DNA es llevado a cabo por detección indirecta utilizando polimorfismos dentro y fuera del gen (con enzimas de

restricción) (3). Las secuencias repetidas (repeticiones CA) han sido encontradas en dos intrones del gen del FVIII y son también útiles en este proceso (5). Casi todas las familias son informativas para uno o más polimorfismos, pero de un 20 a un 30% de familias son informativas para polimorfismos extragénicos únicamente. En estas familias, la posibilidad de error en el diagnóstico es de 2 a 3% en algunas y de 4 a 6% en otras, dependiendo del número de meiosis en cuestión. Cuando un polimorfismo intragénico es utilizado para el diagnóstico de portadora o afectado, la posibilidad de error es menor del 1%.

En familias con un sólo varón afectado, quien no porta una inversión-delección, hay a menudo más incertidumbre para determinar el estado de portadora por análisis de ligamiento. Las portadoras del gen del FVIII dañado tienen en promedio 50% del nivel del FVIII normal en su plasma. Sin embargo, debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X (lionización) y a muchas otras influencias fisiológicas incluyendo la edad, el grupo sanguíneo y estado hormonal, hay un solapamiento entre los niveles del FVIII en portadoras e individuos normales.

En la práctica del consejo genético, el análisis bioquímico para detección de portadoras en familias con hemofilia A es el único recurso cuando una inversión no es detectada en el propósito y el análisis de ligamiento no es informativo. A pesar de todo, éste sigue siendo un método valioso junto con el análisis de DNA.

Cientos de familias se han sometido a diagnóstico prenatal y de portadoras de la deficiencia del FVIII por análisis de DNA, con resultados que generalmente son satisfactorios y con un mínimo de error (3).

1.6 Hemofilia A en mujeres

La hemofilia A en mujeres es muy rara, a continuación se presentan algunas bases biológicas para esta observación. Si la frecuencia de varones afectados en la población es 1 en 5,000, y un tercio de hombres afectados son resultado de nuevas mutaciones ocurridas en mujeres quienes no son

portadoras de la enfermedad, entonces cerca de 1 en 7,000 varones heredan la enfermedad de una mujer portadora. Puesto que las mujeres portadoras presentan una oportunidad de dos (50%) de tener un varón afectado en cada embarazo, la incidencia de mujeres portadoras podría ser aproximadamente 1 en 3,500. Una verdadera mujer homocigota resultará de la unión de un varón afectado y una mujer portadora, con la incidencia de 1 en cada 2 mujeres nacidas. Así, la frecuencia en la población general de mujeres afectadas homocigotas será aproximadamente de 1 en 50 millones de mujeres.

Otro caso de hemofilia en una mujer es el genotipo 45,X o síndrome Turner (XO), en el que una mujer presenta hemicigosidad para los genes ligados al X como los varones.

Una causa potencialmente más frecuente es la lionización desfavorable o inactivación de uno de los cromosomas X más a menudo de lo normal, resultando una situación similar a la de un varón hemicigoto afectado, con la mayoría de las células expresando la mutación del cromosoma X.

Una cuarta causa de hemofilia A en una mujer es una translocación X-autosoma involucrando un punto de ruptura dentro del gen del FVIII. El gen del FVIII está muy cerca al extremo del telómero del brazo largo del cromosoma X, las translocaciones que involucran a este gen y el extremo de un brazo de un cromosoma autosómico son detectadas por análisis citogenético convencional. Este tipo de translocación, aunque raramente reportado hasta ahora, sería una contribución importante en la incidencia de mujeres con hemofilia A.

Una quinta causa posible es la isodisomía uniparental, la herencia de dos copias de un cromosoma homólogo de un par de uno de los padres sin la herencia del otro par del otro padre. En este caso, la isodisomía uniparental requerirá la herencia de las dos copias del cromosoma X en una mujer afectada, llevando la mutación del FVIII de su madre portadora. Tal mujer, homocigota para el gen o el cromosoma X, no sería viable.

La isodisomía ha sido observada en un caso de transmisión de varón-varón de hemofilia A, en la que un varón afectado pasó el cromosoma X y el cromosoma Y a su hijo afectado, quien no recibió un cromosoma sexual de su madre (3).

2. Generalidades sobre hemofilia B

2.1 Características de la hemofilia B

2.1.1 Definición

La hemofilia B constituye el 15% de los trastornos hemorrágicos siendo el padecimiento más común después de la hemofilia A (6). Se transmite con un patrón recesivo ligado al cromosoma X; se caracteriza por una deficiencia en la actividad del factor IX (FIX), otro componente de la cascada de la coagulación (1).

2.1.2 Frecuencia

Aproximadamente 1 en 30,000 varones nacidos vivos son afectados en la población general (6).

2.2 Características clínicas

2.2.1 Manifestaciones clínicas

Al igual que la hemofilia A, la hemofilia B se clasifica en tres grupos: severa, moderada y leve de acuerdo al nivel de actividad del FIX en el plasma. Los síntomas clínicos reflejan el nivel del factor IX:C (actividad catalítica) en el plasma prescindiendo del nivel del factor IX:Ag (nivel de antígeno) (1). (Cuadro 3).

Cuadro 3. Severidad clínica de la hemofilia B.

Factor IX (U/ml)	Manifestaciones clínicas
<1	Severa: Sangrado espontáneo frecuente en articulaciones, músculos y órganos internos.
3-5	Moderada: Algunos sangrados espontáneos, hemorragias por traumas menores.
5-30	Leve: Hemorragia sólo después de un trauma significativo o por intervención quirúrgica.

1 U = Cantidad coagulante del FIX en una alícuota de 1 ml de plasma

En el padecimiento de tipo severo la deficiencia del FIX se caracteriza por sangrados espontáneos especialmente en las articulaciones. La enfermedad es generalmente diagnosticada cuando el varón afectado comienza a gatear o caminar. Un síntoma típico en esta etapa es el desarrollo de grandes hematomas que pueden tener el tamaño de una pelota de golf. Estos hematomas deben ser observados para prevenir necrosis o cualquier trauma en la piel.

Cuando los niños afectados empiezan a pararse y caminar, las hemorragias recurrentes de las articulaciones son las manifestaciones clínicas más obvias, apareciendo inflamación muy dolorosa en esta región. Las articulaciones más afectadas son las rodillas y los tobillos. Las hemorragias musculares pueden ocurrir espontáneamente o después de un trauma severo en pacientes con hemofilia severa. Los grandes grupos de músculos flexores son también comunmente afectados.

Los pacientes con hemofilia B moderada presentan menos hemorragia severas y las hemorragias masivas de las articulaciones ocurren con menor

frecuencia.

Los pacientes con hemofilia B leve generalmente no presentan hemorragias espontáneas en las articulaciones, sin embargo presentan algunas complicaciones especiales. La hemofilia leve no es diagnosticada sino hasta la edad adulta y es detectada debido a cirugías o traumas. Los pacientes pueden tener dificultad para mejorar dado que ellos pudieran presentar una fuerte hemorragia inesperada y esto serviría como una llamada de alerta para un posible diagnóstico (1).

2.2.2 Patofisiología

La hemofilia B es causada por la deficiencia del FIX alterando la cascada de la coagulación. El FIX participa en la etapa media del proceso y es convertido a factor IXa en presencia del factor XIa y iones de Calcio o de factor VIIa, factor tisular y iones de Calcio. El factor IXa activa al factor X en presencia del factor VIIIa, iones de Calcio y fosfolípidos (1). (Figura 1).

2.3 Estructura del gen del FIX

2.3.1 Características estructurales del gen del FIX

El gen del FIX está localizado en el brazo largo del cromosoma X en la banda Xq27 (4). Consta de 33 kb y su secuencia completa de nucleótidos ya ha sido establecida. El gen contiene ocho exones y siete intrones; los ocho exones codifican para 415 aminoácidos que forman la proteína inmadura circulante en el plasma. Dos intrones contienen cuatro secuencias repetitivas Alu que van de 188 nucleótidos (intrón II) a 9,473 nucleótidos (intrón VI) (1).

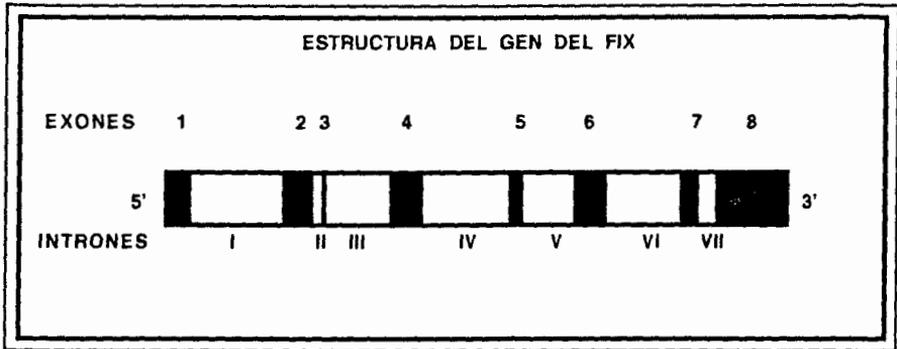


FIG. 3 Estructura del gen del Factor IX (FIX) localizado en q26-ter del cromosoma X.

2.4 Patología molecular de la hemofilia B

Al igual que el gen del FVIII, el gen del FIX también presenta una amplia heterogeneidad mutacional. La variación fenotípica de la deficiencia del FIX ha sido reflejada por la identificación de un gran número de anomalías moleculares en pacientes con hemofilia B (1).

2.4.1 Tipos de mutaciones en el gen del FIX

De las mutaciones identificadas, 12% son alteraciones génicas grandes (deleciones parciales o totales, inserciones o rearrreglos), 3% son deleciones o inserciones de segmentos pequeños y 85% son mutaciones puntuales (substitución de bases). De las mutaciones puntuales, 75% son mutaciones de sentido equivocado (cambian aminoácidos) y el 25% corresponde a mutaciones sin sentido (crean codones de terminación) (1).

Las anomalías moleculares responsables de la deficiencia del FIX han sido identificadas en la región no codificadora del extremo 5' terminal, en las uniones intrón-exón y 96% de todas ellas se ha localizado en los ocho

exones de la secuencia codificadora.

Las anomalías transcripcionales gruesas como deleciones parciales o totales del gen del FIX, inserciones, mutaciones frameshift (delección o inserción de uno o varios nucleótidos cambiando marco de lectura) y mutaciones sin sentido, están invariablemente asociadas con hemofilia B de tipo severa, y los niveles de circulación del FIX que están marcadamente reducidos o son indetectables. En suma, los pacientes severamente afectados en quienes se desarrollan inhibidores del FIX, generalmente tienen una de estas anomalías genéticas.

Al igual que en el gen del FVIII, también se han detectado sitios "hot spot" para mutación correspondientes a regiones intragénicas ricas en CG (1).

3. Diagnostico prenatal y de portadoras

El estudio de una familia se realiza cuidadosamente reuniendo información precisa sobre los varones afectados con hemofilia y los datos familiares de al menos tres generaciones. Si se presentan dos generaciones con miembros afectados el caso es familiar. Si el afectado es único caso conocido es considerado como caso aislado. Estas dos presentaciones del padecimiento serán discutidas separadamente.

3.1 Casos familiares

La probabilidad de segregación para una mujer portadora de transmitir el gen dañado a cada hijo, varón o mujer, es del 50%, mientras que un varón afectado tendrá sólo hijos varones normales e hijas portadoras.

Una portadora obligada se define como una mujer quien:

- Tiene un padre afectado (con la rara excepción de que sea un mosaicismo somático).
- Tiene un hijo afectado y una hija que ha tenido un hijo afectado.
- Tiene un hijo afectado y algún familiar afectado por línea materna (7).

Para fines diagnósticos, en el presente estudio definimos también como un caso familiar a aquel en que hay dos varones afectados, hijos de una mujer sin antecedentes familiares del padecimiento. Por lo tanto a dicha mujer se le considera portadora.

3.2 Casos aislados

Un caso aislado puede resultar de la transmisión del gen dañado de la hemofilia a través de mujeres asintomáticas en quienes el gen no se ha expresado; de una mutación nueva en la madre, o una nueva mutación en el afectado (verdadera mutación de novo)(7). La existencia de mosaïcismo somático y mosaïcismo por línea germinal tiene que ser tomado en consideración.

La proporción real de mutaciones de novo dependerá de la relación entre mutaciones surgidas en células germinales de varones contra mujeres. Si es más alto en hombres, una alta proporción de madres de casos aislados serán portadoras de la mutación.

La relación de las frecuencias de mutación por sexo no ha sido bien establecida; la mayoría de los estudios muestran una frecuencia de mutaciones más alta en varones que en mujeres. En hemofilia A la proporción de varones contra mujeres ha sido estimada como 5:0, 9:6 y 3:1 respectivamente en tres estudios recientes. En hemofilia B ha sido estimado como 1:1. Aún si esto es cuidadosamente intepretado, la mayoría de las madres de casos aislados son portadoras. Para propósitos prácticos la probabilidad genética de ser portadora para la madre de un caso aislado es del 85%.

Aunque esto podría implicar que 14% de las madres no portadoras podrían ser mosaicos para la mutación y, por lo tanto, con riesgo de transmitirla (7).

3.3 Diagnóstico molecular de hemofilias A y B

Debido a la gran variedad de mutaciones de ambos genes, la identificación de la portadora se ha basado en el estudio molecular del DNA analizando a varios miembros de la familia, incluyendo al varón afectado y a los parientes del mismo. Se identifican sus alelos utilizando la tecnología basada

en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificando secuencias intragénicas específicas de los loci de los factores VIII y IX.

La amplificación de secuencias de DNA es una ventaja para el diagnóstico prenatal y de enfermedades genéticas porque permite trabajar con pequeñas cantidades de DNA. El método de amplificación fué ideado por Saiki et al. (1985). En este método, los segmentos específicos de DNA son amplificados enzimáticamente por la DNA polimerasa con el uso de pequeños iniciadores de DNA que delimitan una región de interés. Los ciclos repetidos de la amplificación enzimática incrementan la cantidad de la región específica de DNA más de 200,000 veces.

El método se basa en el principio fundamental de que el DNA es una doble cadena y que sus hebras son complementarias. Kogan et al. (1987) modificó el procedimiento utilizando una DNA polimerasa termoestable la cual permitió la repetición de ciclos para la síntesis de DNA a 63° C. La alta especificidad de las secuencias para la reacción de amplificación a esta elevada temperatura permitió la utilización de polimorfismos de restricción como marcadores de ligamiento para ser analizados por inspección visual de su producto de digestión en geles de poliacrilamida. Kogan et al. (1987) utilizó el método mejorado para detectar portadoras de hemofilia A y para diagnóstico prenatal (6).

Se han empleado algunos polimorfismos intragénicos en los genes FVIII y FIX, estos polimorfismos genéticos son variaciones naturales de la secuencia genómica la cual se presenta en más del 1% de la población general y pueden ser utilizados como señales adecuadas para rastrear genes mutados a través de las familias.

Cuando el polimorfismo se presenta dentro del gen (polimorfismos intragénicos), la probabilidad de que el marcador polimórfico esté ligado a la mutación, está en relación con el tamaño del gen. A la fecha no hay reportes de eventos de recombinación intragénica en los genes FVIII y FIX. Así se puede asumir que el diagnóstico genético para ambos tipos de hemofilia, basado en el análisis de un polimorfismo intragénico en estas condiciones es extremadamente preciso.

Para poder rastrear los dos alelos de los genes FVIII y FIX en las mujeres,

es esencial que sean polimórficos para diferenciar el gen sano del afectado. A esto se denomina ALELOS INFORMATIVOS.

Existen dos tipos de secuencias polimórficas dentro de los genes de hemofilia. Los minisatélites o microsátélites en regiones intrónicas son repeticiones de secuencias altamente polimórficas al ser multialélicas. Los más frecuentes y sencillos son los polimorfismos bialélicos resultado de sustituciones sencillas de nucleótidos los cuales crean o destruyen sitios con endonucleasas de restricción (RFLP's). La limitante de estos sistemas bialélicos es que el nivel máximo de heterocigocidad o informatividad es del 50% (7).

Sin embargo, la simplicidad relativa del procedimiento y su aplicabilidad a las hemofilias independientemente de la causa genética, ha hecho estos análisis extremadamente útiles en la práctica de estudios genéticos.

Es también claro que la identificación de más polimorfismos, particularmente en algunos de los grupos étnicos, podrían resultar en un considerable incremento de la utilidad de estas técnicas (8).

3.3.1 Polimorfismos intragénicos en el diagnóstico de portadoras

Algunos de los polimorfismos tipo RFLP utilizados para el locus del FVIII son: *AluNI* (intrón 7), el cual muestra una heterocigocidad del 33% y su empleo aumentó la informatividad a un 70% al ser usado conjuntamente con los marcadores *BclI* y *XbaI* en población norteamericana (9). El polimorfismo *BclI* (intrón 18) ha sido el de mayor informatividad presentando un porcentaje de heterocigocidad entre el 30 y 48% en distintas poblaciones (7, 10, 11).

Los polimorfismos utilizados para el locus del FIX son *HinfI* (intrón I), que presentó 36% de informatividad en un estudio realizado en población caucásica (12), *TaqI* (intrón IV) el cual presenta un 45% de heterocigocidad en poblaciones caucásicas (12) aunque tiene limitada informatividad en grupos étnicos negros u orientales (7, 13) y *HhaI* (extremo 3' terminal) que presentó 48% de heterocigocidad en un estudio de población caucásica (14) y parece ser el más informativo en poblaciones orientales (7).

En la figura 4 se ejemplifica la aplicación de un RFLP en un caso de hemofilia familiar. A partir de la madre informativa II : 2, se observa que el caso III : 1 es no portadora al presentar el alelo sano de la madre (presencia del sitio) y el caso III : 2 es asignada portadora al presentar el alelo materno asociado a la mutación en su familia (ausencia del sitio).

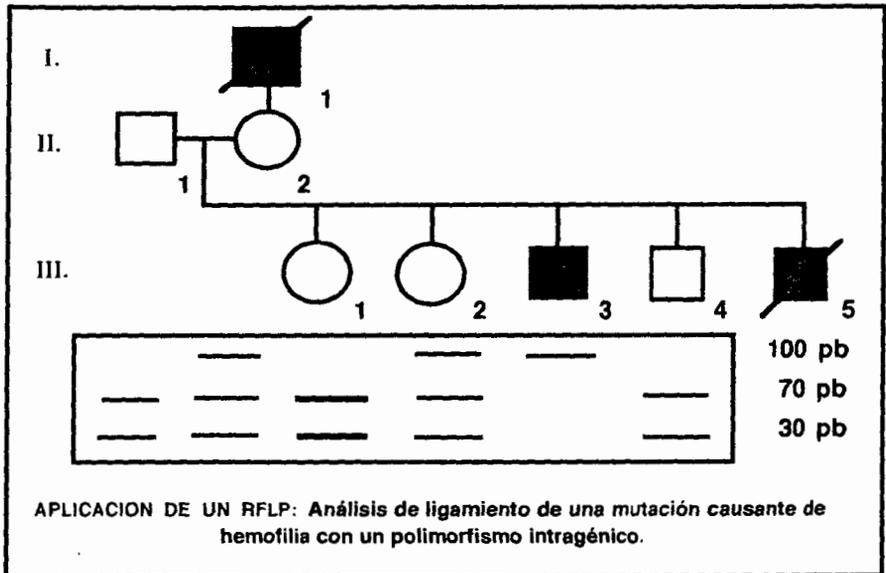


FIG. 4 Ejemplo hipotético del empleo de un polimorfismo del tipo RFLP para el diagnóstico de portadoras de hemofilia. En este caso el fragmento de 100 pb (ausencia del sitio de restricción), es el marcador ligado con el alelo mutado y los fragmentos de 70 y 30 pb (presencia del sitio), representan al marcador ligado con el alelo sano.

3.3.2 Ventajas de los polimorfismos intragénicos

De los métodos que se han empleado para la identificación de portadoras, el diagnóstico molecular basado en el análisis de la segregación familiar de RFLP's intragénicos ofrece las condiciones deseadas, ya que

cuentan con las siguientes características:

- Su presencia es independiente de la naturaleza de la mutación (7,15).
- No son afectados por la amplia variedad fenotípica individual (7).
- Minimizan la probabilidad de recombinación con el sitio de la mutación (7).

3.3.3 Desventajas de los polimorfismos intragénicos

A pesar de las grandes ventajas de los marcadores intragénicos, es necesario considerar algunas limitantes importantes de su empleo (7).

- Son aplicables predominantemente en familias que tienen antecedentes de afectados por línea materna, ya que su uso es limitado a la exclusión del estado de portadora en los casos esporádicos.
- Se necesita contar con la disponibilidad del material genético de la mayoría de los miembros de cada familia, al menos con ambos padres y el varón afectado.
- La madre de cada familia y portadora obligada debe ser heterocigota o informativa para el polimorfismo, de manera que al poseer alelos con polimorfismos diferentes se pueda identificar el alelo sano, de aquel asociado a la mutación y que poseen sus hijos varones afectados. Esto se define como marcador informativo.
- Otro aspecto a considerar es la alta posibilidad de asociación alélica o desequilibrio de ligamiento entre los marcadores (7,13,16), por lo que deben seleccionarse aquellos con segregación independiente.

3.3.4 Estudios de Hemofilia a nivel molecular en población mexicana

En nuestro país se empezaron a utilizar los polimorfismos intragénicos detectados primeramente por Southern Blot (17) y posteriormente por medio de la PCR (18) para el diagnóstico de portadoras de hemofilia A. En ambos

estudios se empleó el polimorfismo de *Bcl* en intrón 18 del gen del FVIII, el cual resultó altamente informativo, siendo de utilidad diagnóstica en el 90% de las familias estudiadas (17) y presentando un porcentaje de heterocigocidad alrededor del 48% en la población analizada (18). Este resultado es semejante a lo observado para dicho marcador en otras poblaciones (7, 10, 17,18).

Otro estudio molecular sobre hemofilia en nuestro país es un trabajo que se realizó por un grupo extranjero empleando familias mexicanas con casos esporádicos de hemofilia B, en las que se caracterizaron las mutaciones en el gen del FIX (19) y su origen en línea germinal.

Dada la limitada informatividad que ofrece un sólo polimorfismo, se utilizaron conjuntamente los marcadores *AlwNI* y *Bcl* para el gen del FVIII y los marcadores *HinfI*, *XmnI*, *TaqI* y *HhaI* para el gen del FIX en un estudio en nuestra población con el objetivo de conocer sus frecuencias en familias mexicanas (20).

Los resultados de dicho estudio mostraron que el empleo conjunto de *AlwNI* / *Bcl* permitió una heterocigocidad del 67% y el empleo de *HinfI*, *TaqI* y *HhaI* logró una heterocigocidad del 57%.

Con el presente estudio se evaluarán dichos resultados aplicando los mismos RFLP's intragénicos de ambos loci en el diagnóstico de portadoras de familias afectadas con hemofilias A y B de nuestra población.

4. Polimorfismos intragénicos seleccionados

4.1 Polimorfismos intragénicos del locus FVIII

4.1.1 Polimorfismo de *A/wNI* (intrón 7)

Polimorfismo por la presencia de Adenina (A) o Guanina (G). Los autores que caracterizaron esta variante polimórfica (9), la analizaron por dos métodos: 1) como polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) en un gel con gradiente desnaturante (DGGE) y 2) como un RFLP, con base en el método de modificación enzimática de un producto amplificado (21), al crear un sitio para *A/wNI* en presencia de G utilizando un juego de iniciadores diseñados para tal propósito (9).

4.1.2 Polimorfismo de *Bcl* (intrón 18)

El aislamiento del gen del FVIII ha permitido una búsqueda utilizando RFLP's dentro de éste gen, y se ha reportado la identificación de un polimorfismo revelado por ésta enzima de restricción, la cual puede ser utilizada para diagnóstico en cerca del 42% de todas las familias, de acuerdo a datos reportados de distintas poblaciones (11).

4.2 Polimorfismos intragénicos del locus FIX

4.2.1 Polimorfismo de *Hinf* I (intrón I)

El polimorfismo es debido a la presencia o ausencia de una inserción de 50 pb, creado por la duplicación o ausencia de duplicación de dicho fragmento (región de DNA Z) y cuyas secuencias flanqueadoras son sitios para la enzima *Hinf*I (caracterizadas durante la subclonación del fragmento), pero el polimorfismo no requiere la digestión con la enzima, se detecta directamente por electroforesis del fragmento amplificado (22, 23).

4.2.2 Polimorfismo de *Taq* I (intrón IV)

Uno de los polimorfismos más frecuentemente utilizado, ya que ha sido examinado en cinco grupos étnicos (13). Presentó desequilibrio de ligamiento con *Xmn*I (intrón III), el cual se corroboró en el estudio realizado en población mexicana (20).

4.2.3 Polimorfismo de *Hha* I (extremo 3' terminal)

Es el marcador más informativo en distintas poblaciones dentro del locus del FIX en la región 3'. Originalmente fue detectado en población caucásica; se encuentra en una región rica en CG por lo que se requiere de condiciones especiales de amplificación para evitar la formación de estructuras secundarias (14).

III. JUSTIFICACION

La heterogeneidad mutacional característica de las hemofilias A y B nos obliga a utilizar un método indirecto para el diagnóstico de portadoras basado en el empleo de polimorfismos intragénicos de los factores de la coagulación VIII y IX. El diagnóstico molecular basado en el análisis de marcadores a nivel del DNA no muestra variación fenotípica. Dichos marcadores son independientes a la naturaleza de la alteración genética y al ser intragénicos no recombinan con el sitio de la mutación, estos factores permiten que la confiabilidad que ofrece su utilización sea mayor del 90% (7).

La aplicación de este método para realizar el diagnóstico de portadoras, basado en la técnica de PCR ofrece grandes ventajas, en comparación con técnicas como el Southern Blot aplicada también para este fin, ya que es más rápida, su costo es más bajo y además requiere menor cantidad de DNA para la técnica molecular (18).

En el estudio realizado en nuestra población se encontró que el empleo conjunto de los marcadores *BclI* y *AlwNI* para el gen del FVIII presentó un 67% de informatividad y los marcadores *HinfI*, *TaqI* y *HhaI* para el gen del FIX presentaron un 57% de informatividad (20), por lo que se espera que un porcentaje considerable de familias afectadas puedan ser diagnosticadas con dicha estrategia.

CUCEBA



BIBLIOTECA CENTRAL

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

1. Realizar la detección de portadoras de hemofilias A y B en familias afectadas de población mexicana a través del empleo de RFLP's intragénicos de los loci de los factores VIII y IX.

B. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Estimar la informatividad de los marcadores *AlwNI* y *BclI* para el gen del FVIII, y *HinfI*, *TaqI* y *HhaI* para el gen del FIX en las madres de afectados con hemofilia A y B respectivamente.
- 1.2 Realizar el diagnóstico de portadoras en las familias afectadas utilizando los marcadores informativos (emplear dos o más si es posible para corroborar resultados y aumentar la confiabilidad).
- 1.3 Conocer la utilidad diagnóstica de los marcadores en la detección de portadoras, estimando el porcentaje de mujeres diagnosticadas en los casos familiares y en los esporádicos.

V. MATERIAL Y METODOS

1. Descripción del estudio

1.1 Tipo de estudio

Descriptivo, observacional y transversal.

1.2 Universo de estudio

Población mexicana de varias regiones del país.

1.3 Composición de la muestra

FAMILIAS CON HEMOFILIA A

Fueron captadas 29 familias con hemofilia A de las que se obtuvieron datos clínicos, de genealogía y muestras de DNA a partir de sangre periférica posteriormente a su consentimiento informado. (Anexo 3).

Dichas familias fueron clasificadas conforme a sus características clínicas y a la presentación de la enfermedad en la genealogía de la siguiente forma:

Severidad clínica: 14 severas, 7 moderadas y 8 leves, de acuerdo al criterio clínico de Eyster et al. (4).

Segregación de la mutación: 16 esporádicas, 13 familiares.

Del total de familias captadas, se estudiaron 24 en las que fueron disponibles miembros de al menos dos generaciones y el varón afectado, de las cuales 7 fueron informativas: 6 para *Bcl* y 1 para *AlwNI*.

FAMILIAS CON HEMOFILIA B

10 familias captadas con hemofilia B de las que también se obtuvieron datos clínicos, de genealogía y muestras de DNA, previo consentimiento.

Severidad clínica: 3 severas, 6 moderadas y 1 leve.

Segregación de la mutación: 4 esporádicas, 6 familiares.

Se estudiaron 10 familias de las que 6 resultaron informativas: 3 para *HhaI*, 2 para *TaqI* y 1 para *HinfI*.

2. Protocolo de trabajo

1. Purificación de DNA genómico a partir de leucocitos (24,25) y determinación de la concentración y pureza del DNA por método espectrofotométrico y electroforesis en agarosa, con visualización con bromuro de etidio (24). (Anexo 1).
2. Amplificación de las diferentes regiones de los genes FVIII y FIX de los polimorfismos seleccionados por medio de PCR, de acuerdo a la estandarización en nuestro laboratorio de los protocolos originales. (Anexo 2).
 - a) Polimorfismos para hemofilia A: *A/wNI* en intrón 7 y *BclI* en intrón 18.
 - b) Polimorfismos para hemofilia B: Ins/del de 50 pb delimitada por sitio de *Hinfl* en intrón I, *TaqI* en intrón IV y *HhaI* en el extremo 3' terminal.
3. Digestión enzimática de los productos amplificados en los casos que así lo requiera el análisis de los polimorfismos.
4. Corrimiento electroforético en poliacrilamida (26) de los productos amplificados y/o digeridos para el análisis de los polimorfismos y su visualización por medio de la tinción con nitrato de plata (27).
5. Selección de familias informativas para el diagnóstico, correspondientes a aquellas en que la madre del afectado sea heterocigota para algún polimorfismo.
6. Aplicación del marcador o marcadores informativos en las familias para realizar el diagnóstico de portadoras. Repetición de análisis en dos ensayos independientes para confirmar resultados y garantizar reproducibilidad. Repetición adicional en los casos en que la interpretación fuera dudosa (baja intensidad de bandas en la electroforesis).

3. Descripción de la metodología

NOTA: Ver Anexo 1 para los procedimientos de preparación de reactivos.

Ver Anexo 2 para las condiciones de *PCR* y digestión con enzimas de restricción para el análisis de los polimorfismos.

3.1 Purificación de DNA

3.1.1 Método de Fenol-Cloroformo (24)

Utilizado como un método de gran confiabilidad para obtener DNA de alta pureza y rendimiento; empleado para preservar muestras a largo plazo sin degradación.

- Partir de 10 ml de sangre periférica colectados en tubos Vacutainer, que contienen EDTA como anticoagulante.
- Adicionar dos volúmenes de buffer de lisis de eritrocitos 10:1 (NH_4Cl : NH_4HCO_3) y refrigerar a 4°C por 10 min.
- Centrifugar 10 min. a 2.500 rpm.
- Descartar sobrenadante. resuspender el botón de células y adicionar el mismo buffer para repetir los pasos anteriores.
- Resuspender el botón de células en buffer de lisis de eritrocitos 9:1 ($\text{NH}_4\text{Cl}:\text{NH}_4\text{HCO}_3$) y refrigerar a 4°C por 10 min.
- Centrifugar 10 min. a 2.500 rpm.
- Repetir lavado si el botón aún muestra restos de eritrocitos.
- Resuspender el botón celular en 10 ml de buffer de lisis de leucocitos (Tris:EDTA:SDS, pH 8.0) y congelar a -20°C hasta su procesamiento posterior.
- Descongelar el botón de leucocitos a temperatura ambiente e incubarlo a 37°C por 10 min.

- Adicionar 2.5 ml de NaClO_4 3.5 M, 3 ml de fenol saturado con Tris : HCl 0.1 M, pH 8.5 y 3 ml de cloroformo : alcohol isoamílico, 24:1.
- Agitar los tubos suavemente con un rotador por 1 hr. a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 min. a 7,500 rpm.
- Tomar la fase acuosa, pasarla a otro tubo estéril y adicionar nuevamente 3 ml de fenol saturado con Tris : HCl 0.1 M, pH 8.5 y 3 ml de cloroformo : alcohol isoamílico, 24:1.
- Agitar los tubos suavemente en un rotador por 30 min. a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 min. a 7,500 rpm.
- Tomar la fase acuosa, pasarla a otro tubo estéril y adicionar 6 ml de cloroformo : alcohol isoamílico, 24:1.
- Agitar los tubos suavemente en un rotador por 15 min. a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 min. a 7,500 rpm.
- Tomar la fase acuosa, pasarla a otro tubo estéril, adicionar dos volúmenes de etanol absoluto y dejar en reposo por 1 min.
- Agitar suavemente por inversión hasta observar el DNA precipitado.
- Pasar el DNA a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y lavar con etanol absoluto mezclando suavemente.
- Retirar el etanol al 100% con pipeta.
- Añadir 1.0 ml de etanol al 70% y centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
- Descartar el etanol y evaporar el excedente abriendo los tubos por 1 hr.
- Resuspender el DNA en buffer Tris : EDTA, pH 7.5 (buffer TE), agitando suavemente y refrigerar a 4°C hasta su utilización posterior.
- Incubar el DNA a 55°C por 20 min. para disolver por completo antes de su cuantificación.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

3.1.2 Micrométodo de extracción de DNA por CTAB/DTAB (25)

Método rápido de extracción de DNA partiendo de poco material biológico. Se obtienen resultados aceptables de pureza y rendimiento para realizar ensayos de PCR.

- Tomar 300 μ l de sangre periférica con EDTA como anticoagulante en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Añadir 600 μ l de buffer de lisis de DTAB.
- Incubar por 5 min. a 65°C.
- Retirar el tubo de la incubación e inmediatamente añadir 900 μ l de cloroformo y agitar vigorosamente por 5 min.
- Centrifugar 10 min. a 14,000 rpm.
- Tomar la fase acuosa con una pipeta con punta estéril y pasar a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Adicionar 100 μ l de solución CTAB y 1 ml de agua desionizada estéril.
- En este paso se puede refrigerar el tubo a 4°C por 5 min. para agilizar la precipitación del DNA (paso opcional).
- Centrifugar 10 min. a 14,000 rpm.
- Decantar sobrenadante y añadir 300 μ l de NaCl 1.2 M y 1 ml de etanol absoluto.
- Centrifugar 10 min. a 14,000 rpm.
- Decantar sobrenadante y añadir 1 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar 10 min. a 14,000 rpm.
- Decantar sobrenadante y resuspender el DNA en buffer Tris : EDTA, pH 7.5, agitando suavemente y refrigerar a 4°C hasta su utilización posterior.

3.2 Cuantificación de DNA

3.2.1 Cuantificación por espectrofotómetro (24)

Para determinar cuantitativamente la cantidad de DNA genómico y la cantidad de proteínas.

- Colocar 5 μ l de muestra de DNA en una celda de cuarzo conteniendo 1 ml de H₂O destilada.
- Determinar absorbancia (densidad óptica, D.O.) a 260 nm y 280 nm.
- Cuantificar la concentración de DNA a partir de dicha lectura por la fórmula siguiente:

$$\text{[DNA ng/}\mu\text{l} = \text{D.O. 260 nm} \times \text{dilución (1005/5 } \mu\text{l)} \times 50 \text{ (factor constante)*}]$$

- * 50 es el coeficiente de extinción molar del 50 ng/ μ l de DNA que tiene la máxima absorbancia de 1.0 unidad de D.O. a 260 nm.
- Determinar pureza del DNA (cantidad de proteínas), por el valor de la relación D.O. 260 nm / D.O. 280 nm, que debe ser entre 1.8 y 2.0 para considerarse como satisfactoria.

3.2.2 Evaluación del DNA por electroforesis en agarosa (24)

Para determinar cualitativamente la concentración de DNA, su concentración de sales y estado de degradación.

- Aplicar 2 μ l de DNA en un gel de agarosa al 1% preparado con buffer TBE 1X.
- Mezclar la muestra de DNA con 3 μ l de buffer TE y 1 μ l de buffer de carga (jugo azul) 6X.
- Utilizar TBE 1X como buffer de corrimiento en condiciones de voltaje constante (60 V) por 1 hr. 30 min. o hasta que el colorante más retardado (xilen-cianol) haya migrado a 1 cm del pozo de aplicación.
- Teñir el gel sumergiéndolo en bromuro de etidio 0.5 mg/ml por 5 min. y visualizar el DNA con un transiluminador de luz U.V.

3.3 Análisis de los polimorfismos intragénicos

3.3.1 Condiciones de amplificación de DNA por PCR (10)

<u>Condiciones de reacción de PCR</u>	
<i>Reactivo</i>	<i>Concentración final</i>
• Buffer PCR 10X _____	1X
Tris 100 mM _____	10 mM
KCl 500 mM _____	50 mM
• Mezcla de dinucleótidos (dNTP's) 10X _____	800 μ M
dATP 2.5 mM _____	250 μ M
dCTP 2.5 mM _____	250 μ M
dGTP 2.5 mM _____	250 μ M
dTTP 2.5 mM _____	250 μ M
• MgCl ₂ 25 mM _____	Variable
• Iniciador sentido _____	10 pmol
• Iniciador contrasentido _____	10 pmol
• DNA templado 50 ng/ μ l (disuelto en H ₂ O ultrapura) _____	100 ng
• Taq-Polimerasa 5 U/ μ l _____	1 U
• H ₂ O ultrapura _____	Aforar a 25 μ l
• Buffer con EDTA únicamente para el marcador <i>Hha</i> I (ver anexo 2).	

3.3.2 Comprobación de la amplificación de DNA

- Electroforesis de Agarosa al 2% preparado con TBE 1X.
- Utilizar una alícuota de 5 μ l de la mezcla de reacción de PCR y mezclar con 2 μ l de jugo azul 6X.
- Condiciones de corrimiento: Voltaje constante a 120 V por 1-2 hrs.
- Buffer de corrimiento TBE 1X.
- Marcador de peso molecular: 50pb ladder

- Tinción de DNA con bromuro de etidio 0.5 mg/ml por 5 min. y visualizar el DNA con un transiluminador de luz U.V.

3.3.3 Digestión con enzimas de restricción

- Preparar la mezcla de reacción que incluye:
 - 10 μ l del producto amplificado por PCR
 - 2 μ l del buffer de reacción 10X de la enzima correspondiente
 - 2-5 U de enzima por reacción
 - Aforar a 20 μ l con H₂O inyectable
- Cubrir la mezcla de reacción con aceite en los casos en que la temperatura de incubación exceda los 40°C, para evitar la pérdida de volumen por evaporación.
- Realizar la incubación durante toda la noche (15 hrs. aproximadamente) para evitar digestiones parciales a la temperatura óptima de reacción indicada para cada enzima.

3.3.4 Análisis del producto de digestión

Realizada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (26):

- En condiciones estándares: preparar un gel de poliacrilamida (relación Acrilamida-bis-Acrilamida 29:1) al 6%.
- Dar un pre-corrimento de 10 min. a 200 V.
- Aplicar 12 μ l del concentrado de la reacción de digestión mezclados con 2 μ l de jugo azul 6X.
- Condiciones de corrimiento: Voltaje constante a 200 V por 2-4 hrs.
- Buffer de corrimiento TBE 1X.
- Marcador de peso molecular: 50 pb ladder
- Visualización del DNA con tinción con nitrato de plata (27).

4. Análisis de resultados

TIPOS DE ALELOS	
Nomenclatura	Sitio de restricción
Alelo 1	(-) Ausencia del sitio
Alelo 2	(+) Presencia del sitio

4.1 Asignación de portadora

El procedimiento que se llevó a cabo para asignar estado de portadora fue el siguiente:

- Se obtiene la genealogía de la familia identificando afectados.
- Se identifica la forma de presentación de la enfermedad (esporádica, familiar).
- Posteriormente se asignan los alelos correspondientes a cada miembro en el árbol genealógico, de acuerdo al estudio realizado con los marcadores.
- Se identifica el alelo asociado a la mutación en la familia y se observa quienes lo presentan para determinar el diagnóstico correspondiente, asignando las siglas P., P.O., N.D.E, etc.

4.2 Glosario de términos en árboles genealógicos

Casos No Diagnosticados (N.D.)

N.D.F = No diagnosticado en caso familiar. No es posible descartar estado de portadora al no distinguir si presenta alelo sano o afectado por tener madre portadora no informativa.

N.D.? = No es posible diagnosticar al no estar disponible la muestra del padre o de la madre.

N.D.^E = No diagnosticado en caso esporádico. Riesgo considerable de ser portadora al presentar el alelo asociado a la mutación.

Casos diagnosticados

PO = Portadora obligada por genealogía.

P = Portadora.

N.P. = No portadora.

P.? = Posible portadora. No es posible saber si la madre del caso esporádico es portadora, hasta identificar en ella la mutación directamente.

N. I. = No informativa, mujer homocigota para el polimorfismo.

+ Signo para resaltar a los individuos analizados en el estudio molecular en los que la muestra de DNA fue disponible.

VI. RESULTADOS

1. Electroforesis en poliacrilamida para la detección de alelos de los RFLP's seleccionados

En las figuras que se muestran a continuación se presentan los sistemas de alelos para cada uno de los marcadores utilizados para el gen FVIII, así como para los marcadores del gen FIX.



1.1 Marcadores intragénicos del locus FVIII

1.1.1 *A/wNI*

Sistema de Alelos. Alelo 1: Fragmento de 260 pb.

Alelo 2 : Fragmento de 232 pb.

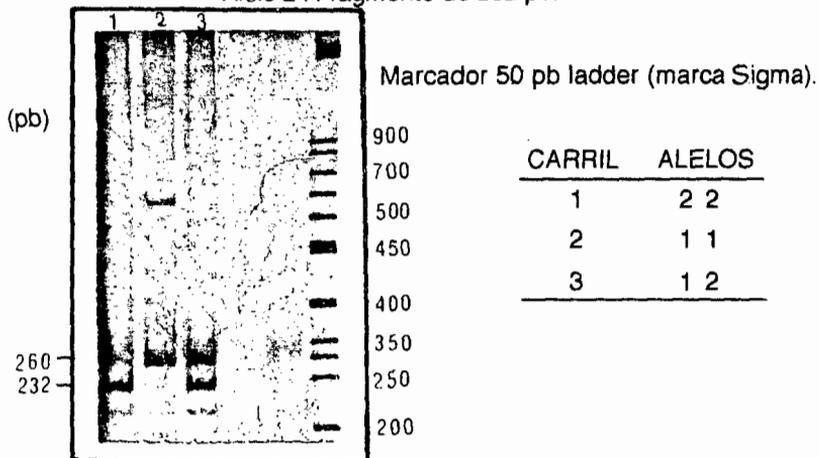


FIG. 5 Marcador *A/wNI*.

1.1.2 *BclI*

Sistema de Alelos. Alelo 1 : Fragmento de 142 pb.

Alelo 2 : Fragmento de 99 pb.

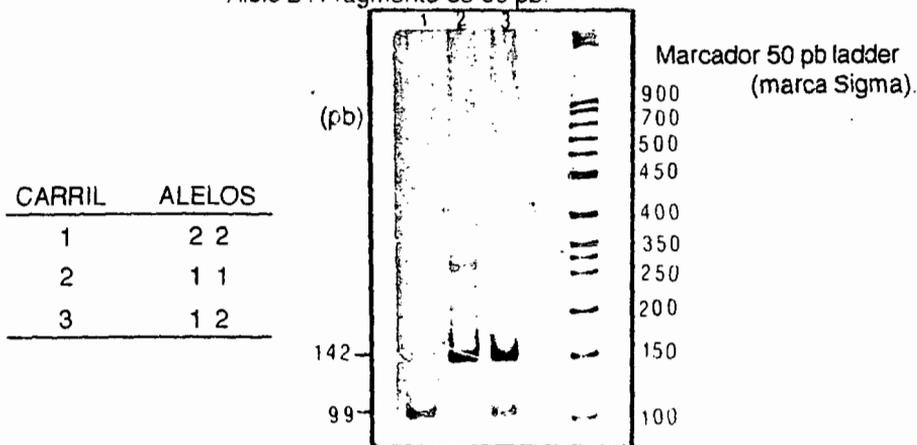
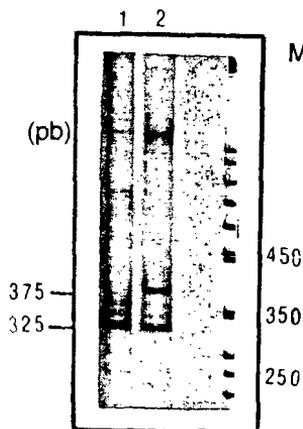


FIG. 6 Marcador *BclI*

1.2 Marcadores Intragénicos del locus FIX

1.2.1 *Hinf*I

Sistema de Alelos. Alelo 1 : Fragmento de 375 pb (inserción de 50 pb).
Alelo 2 : Fragmento de 325 pb (delección de 50 pb).



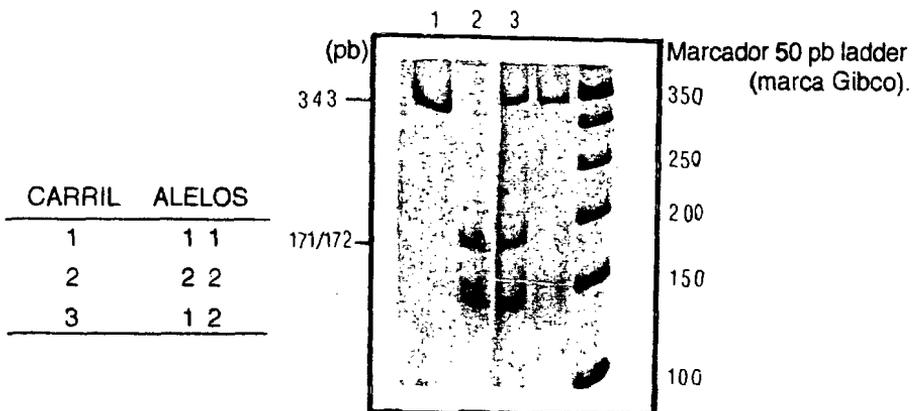
Marcador 50 pb ladder (marca Sigma).

CARRIL	ALELOS
1	2 2
2	1 2

FIG. 7 Marcador *Hinf*I.

1.2.2 *Taq*I

Sistema de Alelos. Alelo 1 : Fragmento de 343 pb.
Alelo 2 : Fragmento de 172 y 171 pb.



Marcador 50 pb ladder
(marca Gibco).

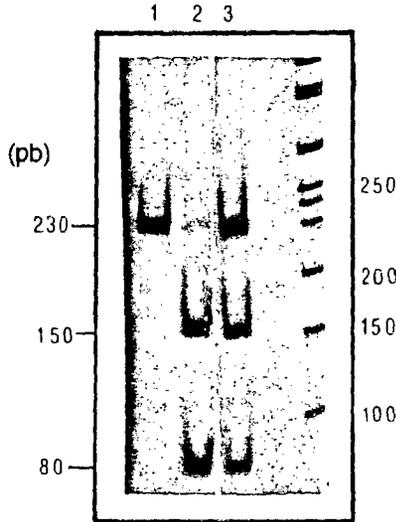
CARRIL	ALELOS
1	1 1
2	2 2
3	1 2

FIG. 8 Marcador *Taq*I

1.2.3 HhaI

Sistema de Alelos. Alelo 1 : Fragmento de 230 pb.

Alelo 2 : Fragmento de 150 y 80 pb.



Marcador 50 pb ladder (marca Gibco).

FIG. 9 Marcador HhaI

CARRIL	ALELOS
1	1 1
2	2 2
3	1 2

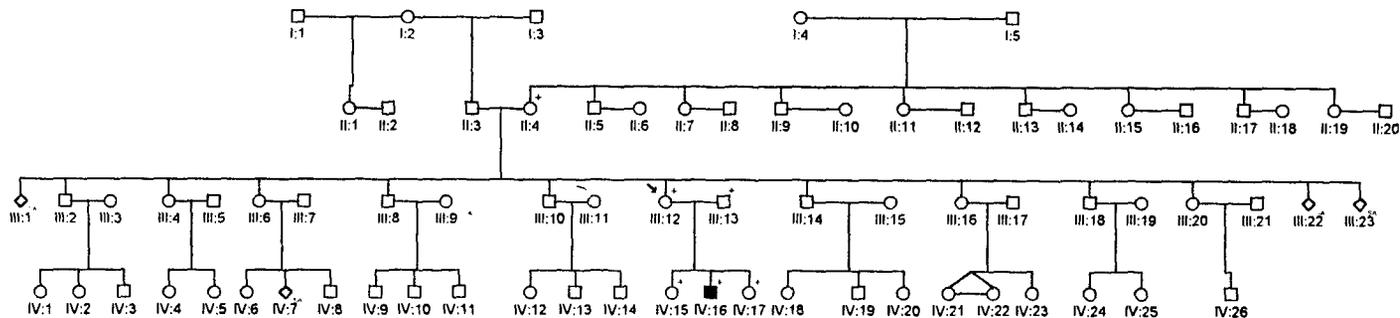
BIBLIOTECA CENTRAL

2. Análisis de segregación de alelos en las familias informativas para el diagnóstico de portadoras

A continuación se presentan las genealogías de cada una de las familias analizadas, mostrando el resultado de acuerdo a la segregación de los alelos obtenidos por los marcadores aplicados en ellas.

HEMOFILIA A

Fam. 1

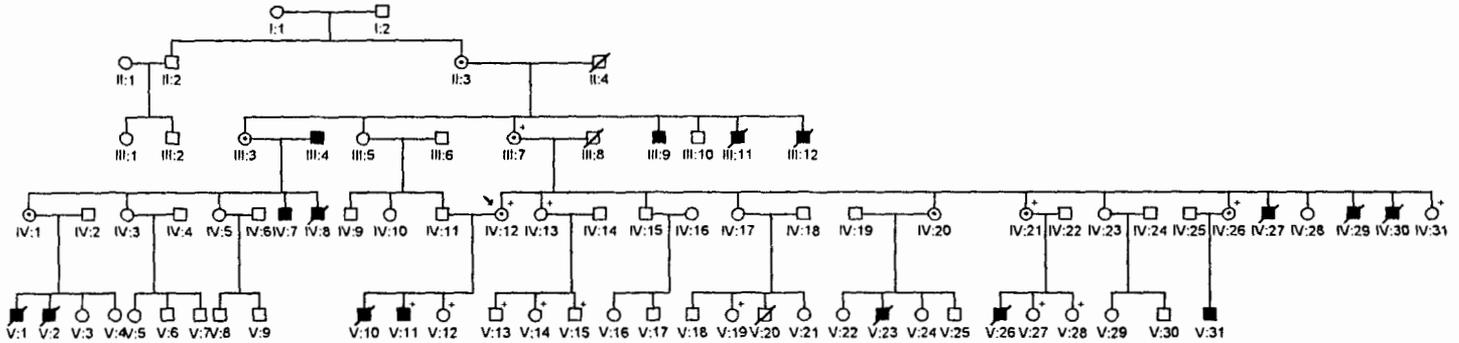


Marcador *Bcl*

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
II : 4	1 2	
III : 12	1 2	P.?
III : 13	2	
IV : 15	1 2	N. D. ^E
IV : 16	1	
IV : 17	1 2	N. D. ^E

Casos de estudio = 2

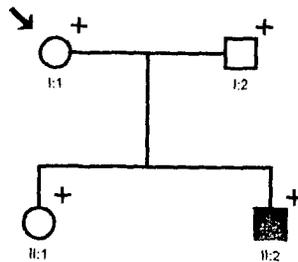
N. D. → 2



Marcador Bcl I

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
III : 7 (P. O.)	2 2	N. I.	V : 12	1 1	N. P.
IV : 12 (P.O.)	1 2		V : 13	1	
IV : 13	1 2	N. D.F	V : 14	2 2	N. D.F
IV : 21 (P. O.)	1 2		V : 15	1	
IV : 26 (P. O.)	1 2		V : 19	1 2	N. D.?
IV : 31	1 2	N. D.F	V : 27	1 2	N. P.
V : 11	2		V : 28	2 2	P.

Casos de estudio = 7
 Dx → 3
 N. D. → 4



Marcador Bcl

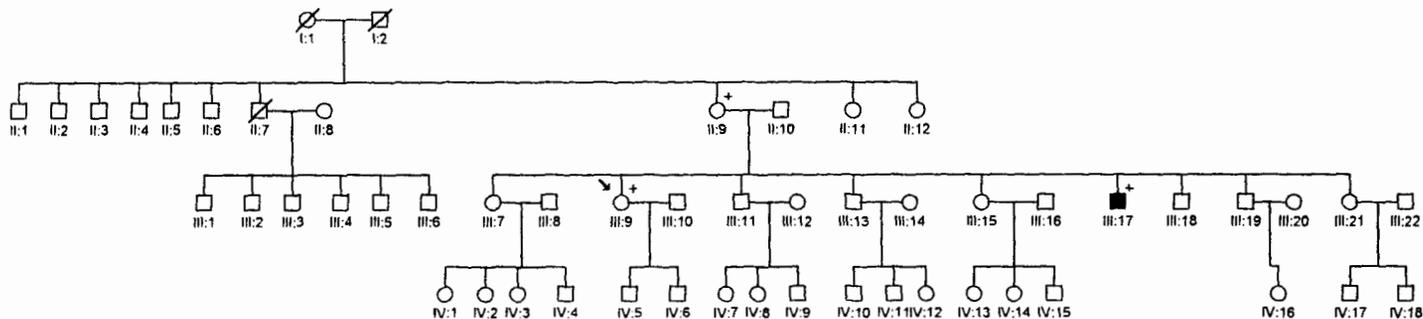
<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
I:1	1 2	P.?
I:2	2	
II:1	2 2	N. P.
II:2	1	

Casos de estudio = 1

Dx → 1



Fam.4



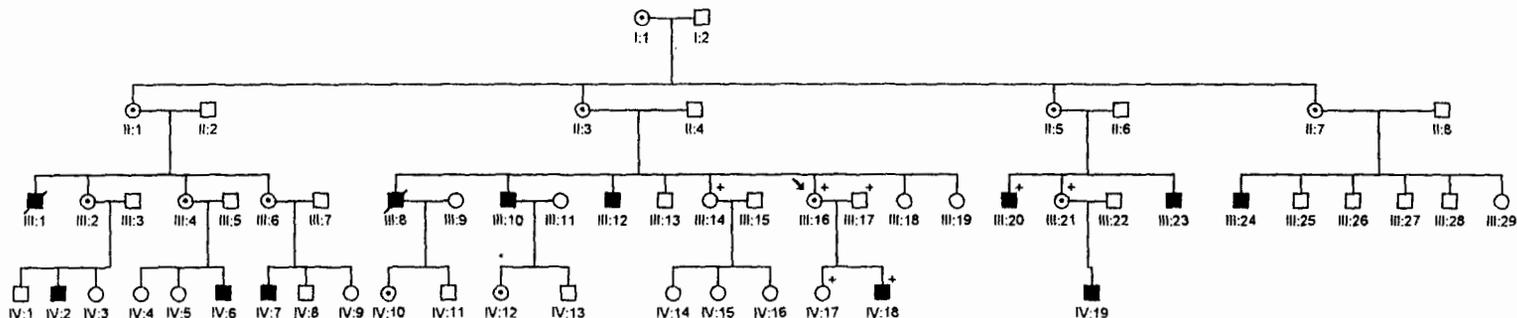
Marcador *Bcl*

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
II : 9	1 2	P. ?
III : 9	1 2	N. D. ?
III : 17	1	

Casos de estudio = 1

N. D. → 1

Fam. 5



Marcador *Bcl*

Individuos

Alelos

Diagnóstico

III : 16 (P. O.)

1 2

III : 17

1

IV : 17

1 2

N. P.

IV : 18

1

III : 14

1 1

N. D.?

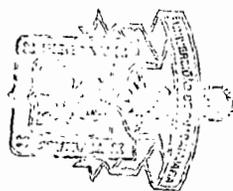
III : 21 (P. O.)

1 1

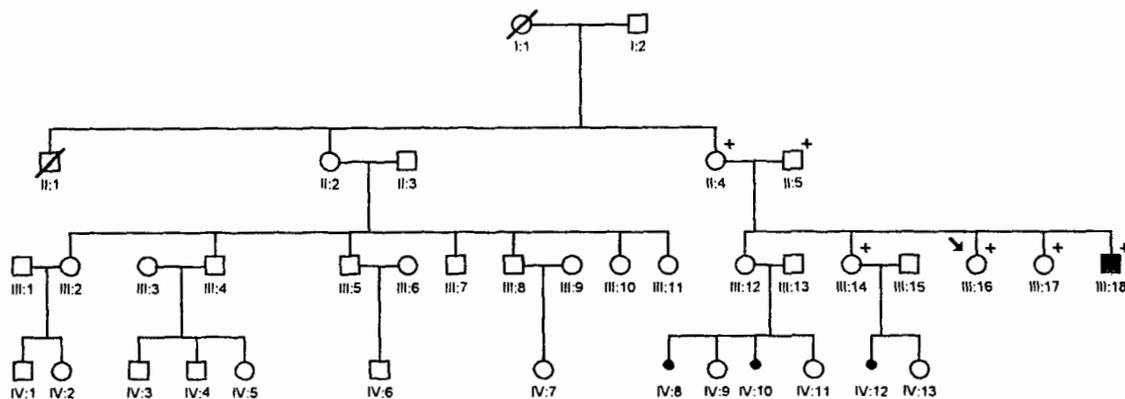
Casos de estudio = 2

Dx → 1

N. D. → 1



Fam. 6



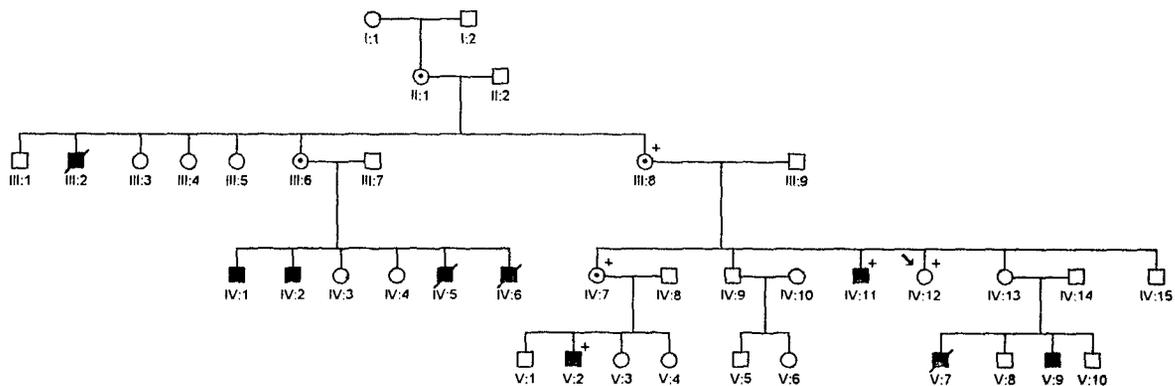
Marcador Bcl I

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
II : 4	1 2	
II : 5	2	
III : 14	2 2	N. P.
III : 16	1 2	N. D. ^E
III : 17	2 2	N. P.
III : 18	1	

Casos de estudio = 3

Dx → 2

N. D. → 1



Marcador A/wNI

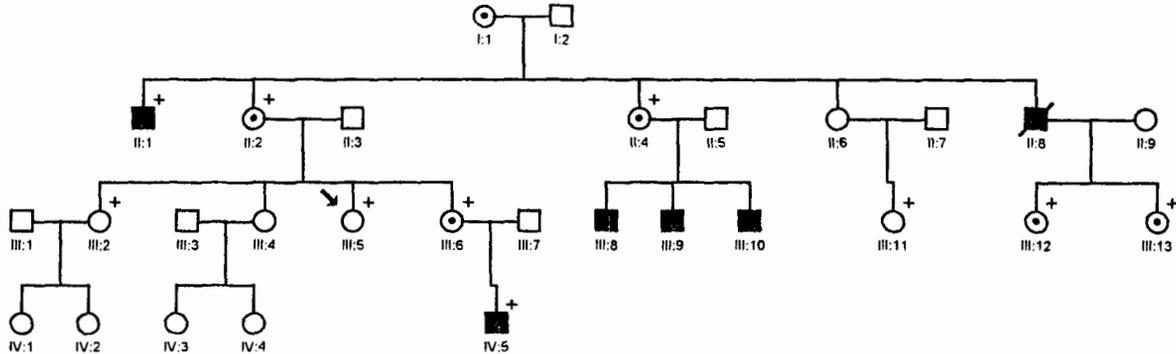
<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
III : 8 (P. O.)	2 2	
IV : 7 (P. O.)	1 2	
IV : 11	2	
IV : 12	1 2	N. D. ^F
V : 2	2	

Casos de estudio = 1

N. D. → 1

HEMOFILIA B

Fam. 1



Marcador TaqI

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
II : 1	1		III : 6 (P. O.)	1 2	
II : 2 (P. O.)	1 2		III : 11	1 2	N. D. F
II : 4 (P. O.)	1 2		III : 12 (P. O.)	1 2	
II : 6 **			III : 13 (P. O.)	1 1	
III : 2	2 2	N. P.	IV : 5	1	
III : 5	1 2	P. *			

* Se asume que el genotipo de II : 3 es 2.

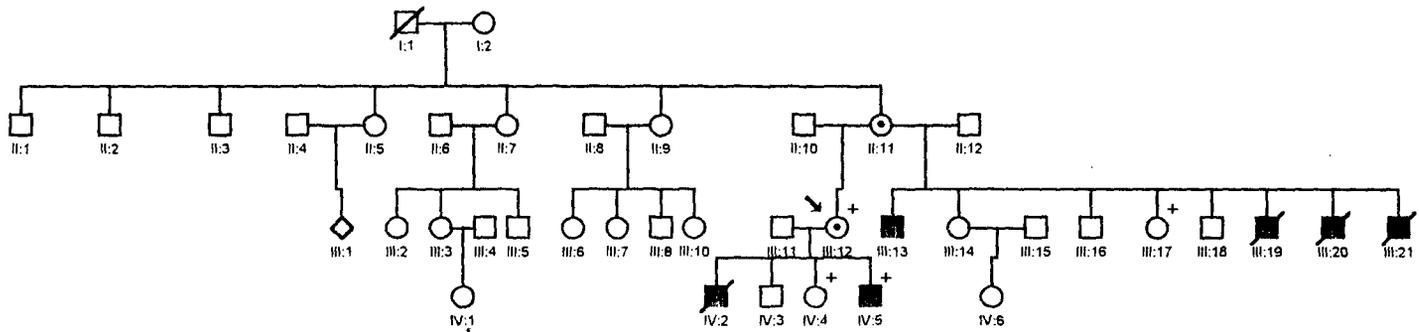
** Muestra degradada.

Casos de estudio = 3

Dx → 2

N. D. → 1

Fam. 2



Marcador *TaqI*

Marcador *HhaI*

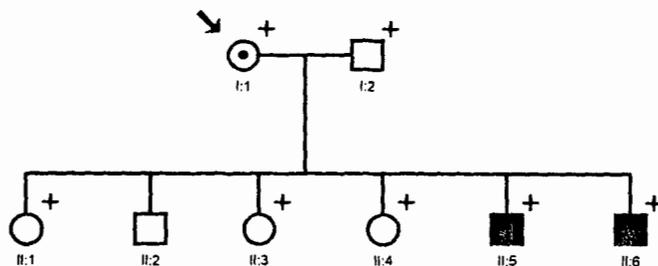
<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
III : 12 (P. O.)	1 2	
III : 17	1 2	N. D.F
IV : 4	1 1	N. P.
IV : 5	2	

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
III : 12 (P. O.)	1 Δ	
III : 17	1 Δ ó 1 1	N. D.F
IV : 4	1 2	N. P.
IV : 5	Δ	Identificación de mutación (delección > 50 pb)

Casos de estudio = 2

Dx → 1

N. D. → 1

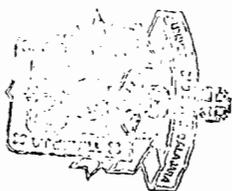


Marcador *HhaI*

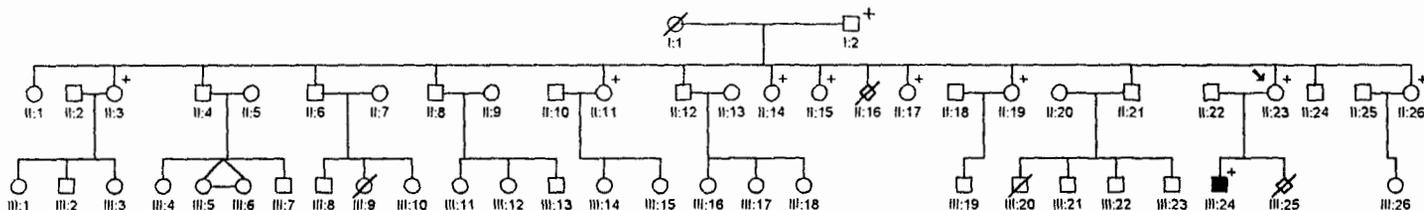
<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
I : 1 (P. O.)	1 2	
I : 2	1	
II : 1	1 2	N. P.
II : 3	1 2	N. P.
II : 4	1 2	N. P.
II : 5	1	
II : 6	1	

Casos de estudio → 3

Dx → 3



Fam. 4



Marcador *Hha* I

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico*</u>
I : 2	1	
II : 3	1 2	N. P.
II : 11	1 2	N. P.
II : 14	1 2	N. P.
II : 15	1 2	N.P.
II : 17	1 1	N. D. ^E
II : 19	1 2	N. P.
II : 23	1 1	P.?
II : 26	1 1	N. D. ^E
III : 24	1	

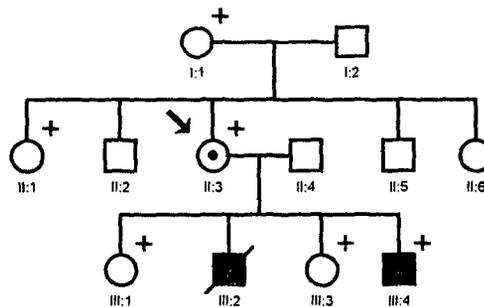
Casos de estudio → 7

Dx → 5

N. D. → 2

* Se asume que el genotipo de I : 1 es 1 2.

Fam. 5



Marcador *Hha*I

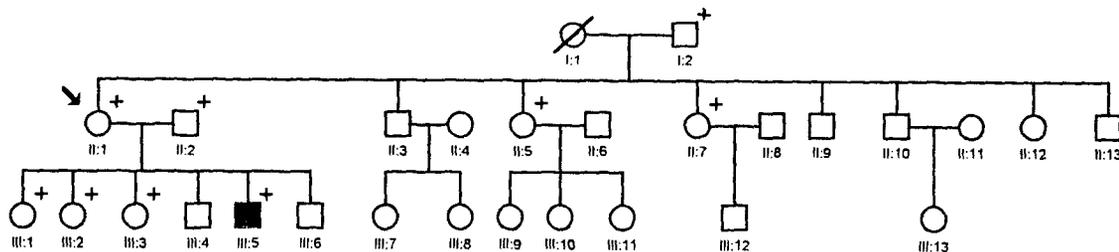
<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
I : 1	2 2	N. I.
II : 1	1 2	N. D. E
II : 3 (P. O.)	1 2	
III : 1	1 2	N. D. E
III : 3	1 1	N. P.
III : 4	2	

Casos de estudio → 3

Dx → 1

N. D. → 2

Fam. 6



Marcador *Hinf*

<u>Individuos</u>	<u>Alelos</u>	<u>Diagnóstico</u>
I : 2	1	
II : 1	1 2	P.?
II : 2	2	
II : 5	1 2	N. D. E
II : 7	1 2	N. D. E
III : 1	2 2	N. D. E
III : 2	1 2	N. P.
III : 3	2 2	N. D. E
III : 5	2	

Casos de estudio → 5

Dx → 1

N. D. → 4

3. Resultados globales del diagnóstico de portadoras en familias informativas

3.1 Resultados de los marcadores para el gen FVIII

Severidad clínica	Segregación de la mutación	# Familia	No. casos a Dx	Marcador empleado	P.	N.P.	N.D.
Severa	Esporádica	1	2	<i>Bcl</i>	---	---	2
Severa	Familiar	2	7	<i>Bcl</i>	1	2	4
Severa	Esporádica	3	1	<i>Bcl</i>	---	1	---
Leve	Esporádica	4	1	<i>Bcl</i>	---	---	1
Leve	Familiar	5	2	<i>Bcl</i>	---	1	1
Severa	Esporádica	6	3	<i>Bcl</i>	---	2	1
Severa	Familiar	7	1	<i>AlwNI</i>	---	---	1
2 casos = L 5 casos = S	3 casos = F 4 casos = E	TOTAL	17		1	6	10

- La informatividad o porcentaje de familias informativas para algún marcador del total de familias estudiadas fue de $7/24 = 29\%$.
- El marcador *AlwNI* fue informativo en $1/7$ familias = 14% .
- El marcador *Bcl* fue informativo en $6/7$ familias = 86% .
- La utilidad diagnóstica o porcentaje de casos diagnosticados (P + NP) fueron $7/17$ casos estudiados = 41% .
- Los casos no diagnosticados fueron $10/17 = 59\%$.

3.2 Resultados de los marcadores para el gen FIX

Severidad clínica	Segregación de la mutación	# Familia	No. casos a Dx	Marcador	P.	N.P.	N.D.
Severa	Familiar	1	3	<i>TaqI</i>	1	1	1
Leve	Familiar	2	2	<i>TaqI / HhaI</i>	---	1	1
Moderada	Esporádica	3	3	<i>HhaI</i>	---	3	---
Severa	Esporádica	4	7	<i>HhaI</i>	---	5	2
Moderada	Esporádica	5	3	<i>HhaI</i>	---	1	2
Moderada	Esporádica	6	5	<i>HinfI</i>	---	1	4
1 caso= L 2 casos= S 3 casos= M	4 casos = F 2 casos = E	TOTAL	23		1	12	10

- La informatividad o porcentaje de familias informativas para alguno de los marcadores del total de familias estudiadas fue de 6/10 = 60%.
- El marcador *HinfI* fue informativo en 1/10 familias = 10%.
- El marcador *TaqI* fue informativo en 2/10 familias = 20%.
- El marcador *HhaI* fue informativo en 3/10 familias = 30%.
- La utilidad diagnóstica o porcentaje de casos diagnosticados (P + NP) fueron 13/23 = 56%.
- Los casos no diagnosticados fueron 10/23 = 43%.

4. Observación de la presencia de una posible delección

En uno de los pacientes estudiados, familia No. 5 de hemofilia B, no se obtuvo producto amplificado del polimorfismo *Hhal* de la región 3' del gen *FIX*, lo cual sugirió una posible delección en esta región. Esta observación fue corroborada con un estudio en el que se comprobó la presencia de una delección mayor a 100 kb en este paciente (Jaloma A. R., comunicación personal).

Otro punto interesante en la misma familia, fue que los marcadores utilizados (*TaqI* y *Hhal*) coincidieron en los resultados del diagnóstico, por lo que se aumentó la confiabilidad.

También hubo ausencia de amplificación para el mismo polimorfismo en otro paciente del que fue corroborada otra delección mayor (Jaloma A. R. comunicación personal). Dicho caso no se incluyó en el presente trabajo ya que no se logró el diagnóstico de portadoras por la falta de informatividad de los polimorfismos en dicha familia.

VII. DISCUSSION

1. Diagnóstico de portadoras.

Este estudio nos permitió el uso de marcadores útiles en nuestra población, corroborados en estudios anteriores (17,18,20). Aunque no todas las familias resultaron ser informativas para estos marcadores, en una gran parte de ellos fue posible dar un diagnóstico seguro.

Los marcadores para el gen FVIII (*A/wNI* y *BclI*) empleados en las familias informativas para estos (7/24), presentaron una informatividad o heterocigocidad del 29%; mientras que los marcadores para el gen FIX (*HinfI*, *TaqI* y *HhaI*) en las familias informativas (6/10), tuvieron una informatividad del 60%.

El porcentaje de mujeres diagnosticadas con los marcadores del gen FVIII fue de 41% y no diagnosticadas de 59%.

Para los marcadores del gen FIX, el porcentaje de mujeres que fueron posible diagnosticar resultó de 52% y aquellas en las que no fue posible dar un diagnóstico de 48%.

La principal limitante para brindar el diagnóstico certero fue el considerable número de casos esporádicos en la muestra analizada (6/13 familias = 46%) y la falta de informatividad de algunas de las portadoras obligadas.

2. Diagnóstico de portadoras en casos aislados.

En ésta situación se presentan ciertas limitantes en cuanto a la asignación de un diagnóstico, ya que no se sabe con certeza el individuo en el que surgió la mutación, lo que hace casi imposible realizar el diagnóstico por medio de polimorfismos dados por los marcadores.

Aunque se debe considerar la posibilidad de mosaicos no somáticos o germinales, se ha encontrado que en el 85% de los casos aislados, las mujeres con hijos afectados son portadoras (5).

En 4 de 6 familias con casos esporádicos (67%), fue posible descartar portadoras, con lo que se observó una importante utilidad de los marcadores aún en estas circunstancias, ya que se diagnosticaron 9 de 21 individuos.

3. Ventajas y limitantes del empleo de polimorfismos RFLP's. Para realizar el diagnóstico en las familias, antes que nada las mujeres deben ser

polimórficas, es decir, deben presentar los alelos que nos ayudan a diferenciar el alelo sano del que está asociado a la mutación (heterocigocidad o informatividad). El número de familias informativas estudiadas fue de 13, encontrando 7 para los marcadores del FVIII y 6 para los marcadores del FIX.

Aunque se empleó más de un RFLP por locus, caso la totalidad de las familias fueron informativas sólo para un polimorfismo, encontrando que fue limitado su empleo sobre todo en el gen del FVIII, ya que fueron informativos sólo en el 29% de las familias, a pesar de que el marcador *BclI* se había definido como altamente informativo en nuestra población (20).

Se obtuvieron mejores resultados globales con los marcadores del gen del FIX, ya que 60% de las familias fueron informativas para al menos uno de los tres RFLP's empleados.

Dado que estos resultados nos ofrecieron un alcance diagnóstico limitado y debido al gran porcentaje de casos esporádicos ($6/13 = 46\%$), se plantean dos estrategias diagnósticas.

a) Gen FVIII

Probar polimorfismos multialélicos en los intrones 13 y 22 del gen FVIII (5) y el procedimiento de Southern Blot para la detección de la delección/inserción en intrón 22 en los casos severos. Para los casos moderados y leves, utilizar la estrategia de análisis de polimorfismos de cadena sencilla (SSCP), como tamizaje previo a la detección directa de la mutación que es compleja por el tamaño del gen (186 kb) (3).

b) Gen FIX

Dado que el tamaño del gen es más accesible que el FVIII y que la mayoría de las mutaciones se encuentran en región codificadora (2.2 kb), tratar de implementar la detección directa de mutaciones por secuenciación (7).

Finalmente es importante señalar que el análisis de polimorfismos intragénicos por PCR es una técnica rápida, sencilla y altamente reproducible, lo cual le da una confiabilidad diagnóstica mayor al 90%, sin embargo fueron evidentes sus limitantes en este estudio.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se observó con este estudio que la informatividad alcanzada para los marcadores del gen del FVIII fue de un 14% para las familias informativas del marcador *A/wNI* y de un 86% para las familias informativas del marcador *BclI*, en el gen del FVIII.
2. En el gen del FIX la informatividad alcanzada fue de un 10% para las familias informativas del marcador *HinfI*, de 20% para *TaqI* y de 30% para *HhaI*.
3. La aplicación de los marcadores en la detección de portadoras nos brindó una gran utilidad al permitirnos un diagnóstico en el 86% de casos familiares y de un 67% de casos esporádicos.
4. Se observó una gran utilidad del diagnóstico basado en PCR, con la potencialidad incluso de observar ciertos tipos de mutaciones como lo fueron las deleciones grandes (>50 pb) en dos familias captadas.
5. Para las familias en las que no fue posible dar un diagnóstico con el uso de RFLP's, es necesario recurrir a la búsqueda de nuevas técnicas, como el análisis de polimorfismos multialélicos o la caracterización de mutaciones e implementarlas de manera conjunta para cuando el caso así lo requiera.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Reiner A. P., Davie E. W. Introduction to hemostasis and the vitamin K-dependent coagulation factors. En: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Seventh edition, McGraw-Hill, vol III, cap. 104, 3181-3222, 1995.
2. Levin P. H. The clinical manifestations and therapy of hemophilias A and B. En: Colman, R. W. et al., ed. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia, J. B. Lippincott, 75-90, 1982.
3. Kazazian Jr. H. H., Tuddenham E. G. D., Antonarakis S. E. Hemophilia A and Parahemophilia: Deficiencies of coagulation factors VIII and V. En: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Seventh edition, McGraw-Hill, vol III, cap. 106, 3241-3256, 1995.
4. Eyster M. E., Lewis J. H., Shapiro S. S., Gill F., Kajani M., Prager D., Djerassi I., Rice S., Lusch C., Keller A., The Pennsylvania Hemophilia Program 1973-1978. *Am J Haematol* 9: 277-286, 1980.
5. Chan V., Tong T. M. F., Chan T. P. T., Tang M., Wan C. W., Chan F. Y., Chu Y. C., Chan T. K. Multiple *Xba*I polymorphisms for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 73:497-500, 1989.
6. McKusick V.A. Mendelian inheritance in man. Catalog of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. Eleventh edition, Baltimore. John Hopkins University Press, 1994.
7. Peake I. R., Lillicrap D. P., Boulyjenkov V., Briet E., Chan V., Ginter E. K., Kraus E. M., Ljung R., Mannucci P. M., Nicolaides K., Tuddenham E. G. D. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bulletin of the World Health Organization*; 71 (3/4): 429-458, 1993.
8. Peake I. Registry of DNA polymorphisms within or close to the human factor VIII and factor IX genes. For the factor VIII / IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb & Haemost* 67 (2): 277-280, 1992.
9. Kogan S., Gitschier J. Mutation and a polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2092-2096, 1990 b.7. Antonarakis S. E. Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. *N England J Med* 320: 153-161, 1989.
10. Kogan S. C., Gitschier J. Genetic prediction of hemophilia A. En: Innis M. A., Gelfand D.H., Spinsky J. J., White T. Y. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. London,

Academic Press, Inc., cap.35, 288-299, 1990 a.

11. Gitschier J., Drayna D., Tuddenham E.G.D., White R.L., Lawn R.M. Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a *Bcl I* polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 314: 738-740, 1985.
12. Koeberl D.D., Bottema C.D.K., Ketterling R.P., Bridge P. J., Lillicrap D. P., Sommer S.S. Mutations causing hemophilia B : Direct estimate of the under lying rates of spontaneous germ-line transitions, transversions and deletions in a human gene. *Am J Med Genet* 47: 202-217, 1990.
13. Lubahn D. B., Lord S. T., Bosco J., et al. Populations genetics of coagulant factor IX: Frequencies of two polymorphisms in five ethnic groups. *Am J Hum Genet* 40: 527-536, 1987.
14. Winship P.R., Rees D.J.G., Alkan M. Detection of polymorphisms at cytosine phosphoguanadine dinucleotides and diagnosis of haemophilia B carriers. *Lancet* 1: 631-634, 1989.
15. Antonarakis S. E. Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. *N England J Med* 320 : 153-161, 1989.
16. Graham J. B., Kunkel G. R., Fowlkes D. M., Lord S. T. The utility of a *Hind III* polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. *Br J Hematol* 1990; 76: 75-79.
17. Carrillo P. M. C., Cisneros V. B., Esparza A., Cantú G. J. M., Montañez O. C., Frago H. R. Carrier detection of hemophilia A by DNA analysis *Bcl I* polymorphism. *Arch Med Res* 24: 49, 1993.
18. Rivera Pérez J. A., Rojas Martínez A., Charles García F., Barrera Saldaña H. A. Análisis molecular de la hemofilia A en familias del noreste de México. *Rev Inv Clin* 1993. 45: 23-28, 1993.
19. Thorland E. C., Weinschenker B. G., Liu J-Z, Ketterling R. P., Vielhaber E. L., Kasper C. K., Ambriz R., Paredes R., Sommer S. S. Molecular epidemiology of factor IX germline mutations in mexican hispanics: pattern of mutation and potential founder effects. *Thromb & Haemost* 74 (6), 1995.
20. Jaloma Cruz A.R. Frecuencia de polimorfismos intragénicos de los loci de los factores de la coagulación VIII y IX en población mexicana, Tesis de Maestría en Genética Humana. CUCS, U. de G. 1996.
21. Haliassos A., Chomel J. C., Tesson L., Baudis M., Kaplan J. C., Kitzis A. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations *Nucl. Acids*

Res. 17(9):3606, 1989.

22. Winship P. R., Anson D. S., Rizza C. R., Brownlee G. G. Diagnosis of Haemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 12:8861-8872, 1984.
23. Sarkar G., Paynton C., Sommer S. S. Segments containing alternating purine and pyrimidine dinucleotides: patterns of polymorphisms in humans and prevalence throughout phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 19 (3): 631-636, 1991.
24. Maniatis T., Fritsch S. F., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
25. Gustincich S., Carminci P., Del Sal G., Mamfielli G., Schneider C. A fast method for high-quality Genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11 : 300-302, 1991.
26. Rickwood D., Hames B.D. *Gel electrophoresis of nucleic acids, a practical approach.* 5a edición, IRL press Limited, Oxford, England, 1988.
27. Sanguinetti C.J., Dias N.E., Simpson A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Bio Techniques* 17 (5): 915-918, 1994.
28. Camerino G., Grzeschik K. H., Jaye M., De La Salle H., Tolstoshev P., Lecocq J. P., Heilig R., Mandel J. L. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 498-502, 1984.

X. ANEXOS

ANEXO 1.

PREPARACION DE REACTIVOS

A. REACTIVOS PARA LA PURIFICACION DE DNA.

1. Buffer de lisis de Eritrocitos.

NH ₄ Cl	(PM 53.49 g)	0.144 M	(7.7 / 1L)
NH ₄ HCO ₃	(PM 79.06 g)	0.01 M	(0.0791 g / 100 ml)

Esterilizar por autoclave.

Buffer 10:1 : 500 ml NH₄Cl 0.144 M + 50 ml NH₄HCO₃ 0.01 M

Buffer 9: 1 : 450 ml NH₄Cl 0.144 M + 50 ml NH₄HCO₃ 0.01 M

2. Buffer de lisis de Leucocitos.

Trizma base	(PM 121.1 g)	0.1 M, pH 8.0	(12.11 g / 1L)
EDTA	(PM 372.2 g)	0.01 M	(3.72 g / 1L)
SDS		0.5 %	(5 g / 1L)

Disolver Trizma base en 3/4 del volúmen final y ajustar a pH 8.0 con HCl.

Adicionar el EDTA, el SDS, volver a ajustar a pH 8.0 y esterilizar por autoclave.

3. Solución de Perclorato de Sodio 3.5 M.

NaClO ₄	(PM 122.44 g)	3.5 M	(4.28 g / 10 ml)
--------------------	---------------	-------	------------------

Disolver el NaClO₄ en agua desionizada estéril, tomando en cuenta adicionar 2.5 ml a cada muestra, para una concentración final de la sal de 0.7 M. Se prepara en el momento de su uso.

4. Solución de Fenol saturado con Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5

Procedimiento de saturación del Fenol:

- Colocar el fenol en baño María a 68°C para difundir los cristales.
- Añadir hidroxiquinoleina como antioxidante e indicador de color, a una

concentración final de 0.1%.

- c. Añadir un mismo volúmen de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.5 y agitar por 15 min.
- d. Retirar la fase acuosa y volver a añadir un volúmen de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.5 y agitar por 15 min.
- e. Eliminar la fase acuosa y añadir un volúmen de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 y agitar por 15 min.
- f. Retirar la fase acuosa y verificar con papel indicador que el pH del fenol esté por arriba de pH 8.0.
- g. Añadir una décima parte del volúmen de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 conteniendo 0.2% de Beta-mercaptoetanol.
- h. Conservar el fenol saturado en un frasco ámbar a 4°C por periodos no mayores a 1 mes. De no ser así, verificar que el pH del fenol esté por arriba de pH 8.0.

5. Solución de Cloroformo : Alcohol Isoamílico 24 : 1.

Cloroformo 24 volúmenes

Alcohol isoamílico 1 volúmen

Agitar ambos reactivos dentro de un frasco ámbar y preparar en el momento de su uso.

6. Buffer de Tris-EDTA, pH 7.5 (buffer TE).

Tris (PM 121.1 g) 0.1 M (0.0605 g / 50 ml)

EDTA (PM 372.2 g) 0.001 M (0.0186 g / 50 ml)

Disolver en agua desionizada, ajustar a pH 7.5 con HCl 1N y esterilizar con autoclave.

7. Buffer de Lisis de DTAB.

Bromuro de Duodeciltrimetilamonio (DTAB) 8% (8 g / 0.1 L)

Tris (PM 121.1 g) 0.1 M, pH 8.6 (1.21 g / 0.1 L)

NaCl (PM 58.44 g) 1.2 M (7 g / 0.1 L)

EDTA (PM 372.2 g)	0.05 M	(1.86 g / 0.1 L)
-------------------	--------	------------------

Disolver el Tris y ajustar a pH 8.6 en 3/4 del volúmen final, adicionar el DTAB, el NaCl y el EDTA y verificar nuevamente el pH antes de aforar al volúmen final.
Esterilizar con autoclave.

8. Buffer de CTAB.

Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	5%	(5 g / 0.1 L)
NaCl (PM 58.44 g)	0.4 M	(2.34 g / 0.1L)

Disolver ambas sales en agua desionizada y esterilizar con autoclave.

9. Solución de NaCl 1.2 M.

NaCl (PM 58.44 g)	1.2 M	(7 g / 0.1 L)
-------------------	-------	---------------

Esterilizar con autoclave.

B. REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA.

10. BUFFER TBE 10X.

EDTA (PM 372.2 g)	0.01 M	(40 ml de sol. 0.5 M / 1L)
Tris (PM 121.1 g)	0.89 M	(108.0 g / 1L)
Acido Bórico (PM 61.844 g)	0.89 M	(55.04 g / 1L)

Preparar una solución de EDTA 0.5 M (18.61 g / 0.1 L) adicionando lentamente lentejas de NaOH para facilitar que se disuelva el EDTA. Ajustar pH 8.0.

Disolver el Tris en 800 ml de agua desionizada, adionar 40 ml de solución de EDTA 0.5 M, ajustar el pH a 8.0 con los 55.04 g del ácido bórico y aforar a 1 L.

La concentración de uso del buffer es 1X, diluyendo 10 veces en agua destilada.

11. Gel de Agarosa al 1%.

Pesar agarosa de acuerdo al volúmen del molde a utilizar, para una concentración del 1%. Adicionar TBE 1X y fundir la agarosa en calor, hasta que no se observen grumos.

Si disminuye el volúmen, compensar con agua destilada. Bajar la temperatura hasta 55°C y vaciar en el molde evitando la formación de burbujas. Esperar al menos 30 min. para que la agarosa gelifique a temperatura ambiente antes de usar.

12. Buffer de carga o jugo azul 6X.

Azul de bromofenol	0.25%	(25 mg / 10 ml)
Xilencianol	0.25%	(25 mg / 10 ml)
Glicerol	30%	(3 ml / 10 ml)

Mezclar ambos colorantes con el glicerol y aforar a 10 ml con agua desionizada.

13. Solución de Bromuro de Etidio.

Para la tinción de los geles, se prepara una solución stock (100X), a una concentración de 0.5 mg/ml disuelto en agua desionizada y se coloca en un frasco protegido de la luz.

La solución de uso contiene 1 ml de la solución 100X por cada 100 ml de TBE 1X.

El bromuro de etidio es un compuesto CARCINOGENO, por lo que se debe tener gran cuidado al utilizarlo, usando guantes y cubrebocas al manejarlo y desechando adecuadamente el material que haya tenido contacto con él.

14. Preparación de geles de Poliacrilamida (25).

a) *Gel de Poliacrilamida al 6%, gel de 50 ml.*

H ₂ O	_____	34.5 ml
Persulfato de amonio (PSA) 10%	_____	0.5 ml
Acrlamida : Bisacrlamida 30% (29:1)	_____	10 ml

Mezclar por inversión

TEMED _____ 50 μ l

- Preparar 100 ml de una solución stock de Acrilamida : Bisacrilamida 30% (29 g de Acrilamida y 1 g de Bisacrilamida), en un frasco ámbar.
- Colocar en un tubo graduado y con tapa el H₂O, el TBE, la solución Acrilamida : Bisacrilamida y el PSA, mezcla suavemente.
- Adicionar el TEMED, cerrar el tubo y mezclar todos los componentes.
- Dado que el TEMED funciona como catalizador, se debe procurar vaciar esta mezcla en un tiempo breve (segundos) para evitar que polimerice antes de haberlo colocado completamente y acomodar el peine.
- Dejar polimerizar al menos 15 min. y dar un precorrimento de 10 min. con buffer TBE 1X a 100-200 V antes de hacer el corrimiento de las muestras.

Nota: La acrilamida y bisacrilamida son sustancias neurotóxicas y se debe evitar el contacto mientras no hayan polimerizado.

b) Gel de poliacrilamida al 10%. TBE 1.5X, gel de 50 ml.

H₂O _____ 29.5 ml

Persulfato de amonio (PSA) 10% _____ 0.5 ml

TBE 10X _____ 7.5 ml

Acrilamida : Bisacrilamida 40% (19:1)* _____ 12.5 ml

Mezcla por inversión

TEMED _____ 50 μ l

* Sol. stock: 38 g de Acrilamida + 2 g de Bis-Acrilamida por cada 100 ml.

15. Tinción rápida de geles de Poliacrilamida con Nitrato de Plata.

(Condiciones modificadas del protocolo original, 27).

- Fijación en solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 0.5%) por 20 min., eliminar.
- Tinción con nitrato de plata al 0.2% disuelto en solución fijadora (preparado en el momento) por 5 min., eliminar.
- Lavar con H₂O desionizada por 2 min. haciendo cambios de H₂O varias veces, eliminar.

- Agregar solución reveladora (NaOH 3.0%, formaldehído 0.5%) hasta la aparición de bandas (5-15 min.), eliminar.
- Enjuagar con solución fijadora por 5 min., eliminar.
- Enjuagar con H₂O desionizada por 5 min. haciendo 2-3 cambios.
- Montar el gel sobre un papel filtro y cubrir sólo por encima con Saran-Wrape.
- Deshidratar con el secador de geles por 1 hr. a 80°C.

Solución fijadora.

Etanol absoluto 10% _____ 100 ml

Acido Acético 0.5% _____ 5 ml

Aforar a 1 L con H₂O desionizada.

Solución con nitrato de plata.

AgNO₃ 0.2% _____ 0.2 g

Aforar a 100 ml con sol. fijadora.

Solución reveladora.

NaOH 3.0% _____ 30 g

Formaldehído 0.5% _____ 5 ml

Aforar a 1 L con H₂O desionizada.

ANEXO 2.

CONDICIONES DE PCR Y DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCION PARA EL ANALISIS DE RFLP's INTRAGENICOS DE LOS LOCI DE LOS FACTORES VIII Y IX

A. MARCADORES DEL GEN FVIII

1A) Polimorfismo de A/wNI, Intrón 7, 260 (A) / 232 (G) pb.

Descripción original y condiciones de PCR determinadas por Kogan S., Gitschier J., 1990, (9). Análisis basado en el método de creación de un sitio de corte de restricción en un producto amplificado para la detección de mutaciones puntuales de Haliassos A., et al, 1989 (21).

JUEGO DE PRIMERS:

(F8-107-F) F- 5' - TAA-TGT-ACC-CAA-GTT-TTA-GG-3 N=20

(F8-107-R) R- 5' - TAT-AGA-ACA-GCC-TAA-TAT-AGC-AAC-AGA-CTC-3' N=30

Condiciones recomendadas de PCR:

- DNA genómico ____ 10 - 250 ng
- dNTP's _____ 1.0 mM
- MgCl₂ _____ 6.7 mM
- Primers _____ 0.2 uM c/u

Condiciones modificadas:

- dNTP's _____ 0.2 mM
- MgCl₂ _____ 4.0 mM
- Primers ____ 10 pmol/reac. c/u

Programa de amplificación recomendado:

1. 94°C ____ 2 min. Desnaturalización
2. 92°C ____ 1 min. Desnaturalización
3. 50°C ____ 1 min. Alineamiento
4. 70°C ____ 1 min. Extensión

Modificaciones

(Programa HA-F8-7):

1. Igual
2. Igual
3. 54°C ____ 1 min.
4. 72°C ____ 1 min.

5. 30 ciclos, pasos 2 a 4

5. Igual

6. 72°C ____ 5 min., ext. prol.

7. 4°C ____ 10 min.

8. FIN

NOTA: Fue necesario modificar temperatura de alineamiento debido a la presencia de inespecíficos.

Condiciones de digestión con *A/w*NI

- Enzima *A/w* NI (New England Biolabs) 10,000 u / ml : 2.0 U / reacción
- Vol. de reacción 20 μ l
- 10 μ l de producto amplificado
- Incubación a 37°C toda la noche
- Control positivo de digestión : heterocigota corroborada para el sitio de *A/w* NI en intrón 7 en un estudio previo.

2A) Polimorfismo de *Bcl* I, Intrón 18, 142 / 99-43 pb.

Descrito originalmente por Gitschier et al., 1985, (11), adaptación de condiciones a PCR por Kogan S. C., Gitschier J., 1990 (10).

JUEGO DE PRIMERS:

(F8-18-F) F - 5' - TAA-AAG-CTT-TAA-ATG-GTC-TAG-GC-3' N=23

(F8-18-R) R - 5' - TTC-GAA-TTC-TGA-AAT-TAT-CTT-GTT-C-3' N=25

Condiciones recomendadas de PCR:

- dNTP's ____ 0.2 mM
- MgCl₂ ____ 2.5 mM
- Primers ____ 10 pmol/reacción c/u

Condiciones modificadas:

- MgCl₂ ____ 4mM

Programa de amplificación recomendado:

1. 95°C ____ Pre calentamiento
2. 94°C ____ 2 min. Desnaturalización
3. 94°C ____ 10 seg. Desnaturalización
4. 55°C ____ 1 seg. Alineamiento
5. 72°C ____ 10 seg. Extensión
6. 30 ciclos, pasos 3 a 5
7. 72°C ____ 3 min. Extensión prolongada

Modificaciones**(Programa HA-18):**

1. Omitido
2. 5 min.
3. 30 seg.
4. 30 seg.
5. 30 seg.
6. Igual
7. Igual
8. 4°C ____ 10 min.
9. FIN

Condiciones de digestión con *Bcl* I

- Enzima *Bcl* I (New England Biolabs) 10,000 U / ml : 2.0 U / reacción
- Vol. de reacción 20 μ l
- 10 μ l de producto amplificado
- Mezcla de reacción cubierta con aceite mineral
- Incubación a 50°C toda la noche
- Control positivo de digestión : heterocigota corroborada para el sitio de *Bcl* I en intrón 18 en un estudio previo.

B. MARCADORES DEL GEN FIX

1B) Polimorfismo *Hinf*I, Intrón I, 375 (ins) / 325 (del) pb.

Caracterizado y estandarizado para ensayo por Southern-Blot por Winship et al., 1984 (22) y condiciones de PCR determinadas por Koeberl D. D., et al., 1990 (12).

JUEGO DE PRIMERS:

(F9-I01-F) F 5'-GTC-CAT-CAT-TGA-CCA-AA-3' N=17
 (F9-I01-R) R 5'-GAC-ACT-CCT-GAA-CTC-T-3' N=16

Condiciones recomendadas de PCR:

- MgCl₂ ____ 2.5 mM ó más
 si la muestra tiene contaminación de EDTA
 - Primers ____ 0.075 μ m
 (2 pmol/reacc. de 25 μ l)

Condiciones modificadas:

- MgCl₂ ____ 2.5 mM
 - Primers ____ 10 pmol c/u

Programa de amplificación recomendado: Condiciones estándares de PCR.

Programa de PCR empleado (HB-I):

1. 94°C ____ 5 min. Desnaturalización
2. 94°C ____ 30 seg. Desnaturalización
3. 63°C ____ 30 seg. Alineamiento
4. 72°C ____ 30 seg. Extensión
5. 30 ciclos, pasos 2 a 4
6. 72°C ____ 3 min. Extensión prolongada
7. 4°C ____ 10 min.
8. FIN

NOTA: Fue necesario modificar temperatura de alineamiento y concentración de MgCl₂ debido a la presencia de inespecíficos.

Visualización del polimorfismo:

Electroforesis en poliacrilamida al 6%, aplicando 15 μ l del producto amplificado y teñido con nitrato de plata.

2B) Polimorfismo de *TaqI*, Intrón IV, 343 / 172-171 pb.

Descripción original por Camerino et al., 1984 (28), condiciones de PCR por Koeberl D. D. et al., 1990 (12).

JUEGO DE PRIMERS:

(F9-IV-F) F 5' - TTG-CAT-CTG-GAG-GTA-AT-3' N=17

(F9-IV-R) R 5' - CAT-GAC-TAA-ATT-GCT-ATC-3' N=18

Condiciones recomendadas de PCR:

- MgCl₂ ____ 2.0 mM
- Primers ____ 1 μ M

Condiciones modificadas:

- MgCl₂ ____ 4mM
- Primers ____ 10 pmol c/u

Programa de amplificación recomendado: Condiciones estándares de PCR.

Programa empleado (Programa HA-18):

1. 95°C ____ Pre calentamiento
2. 94°C ____ 5 min. Desnaturalización
3. 94°C ____ 30 seg. Desnaturalización
4. 55°C ____ 30 seg. Alineamiento
5. 72°C ____ 30 seg. Extensión
6. 30 ciclos, pasos 3 a 5
7. 72°C ____ 3 min. Extensión prolongada
8. 4°C ____ 10 min.
9. FIN

Condiciones de digestión con *Taq*

- Enzima *Taq* I recombinante (New England Biolabs) 20,000 U / ml : 2.0 U / reacción
- Vol. de reacción 20 μ l
- 10 μ l de producto amplificado
- Mezcla de reacción suplementada con BSA 100 μ g / ml y cubierta con aceite mineral
- Incubación a 65°C toda la noche
- Control positivo de digestión: heterocigota corroborada para el sitio de *Taq* I en intrón IV en un estudio previo.

3B) Polimorfismo *Hha*I, extremo 3' terminal, 230 / 150-80 pb.

Descripción y condiciones de PCR determinadas por Winship P. R., et al., 1989 (14).

JUEGO DE PRIMERS:

(F9-3'-F) F 5' - ACA-GGC-ACC-TGC-CAT-CAC-TT-3' N=20
 (F9-3'-R) R 5' - AAG-TAC-CTG-CCA-AGG-GAA-TTG-ACC-TGG-3' N=27

Condiciones de PCR recomendadas:

- DNA genómico _____ 0.5 μ g
- MgCl₂ _____ 6.7 mM
- Primers _____ 0.075 μ M
(2 pmol / reacc. de 25 μ l)
- NH₄SO₄ _____ 16.6 mM
- 2-mercaptoetanol _____ 10 mM
- Albúmina bovina sérica ___ 0.1 mg/ml

Condiciones modificadas:

- DNA genómico _____ 100 ng
- MgCl₂ _____ 5.0 mM
- Primers _____ 10 pmol
- Igual
- Igual
- Omitida

- DMSO 0.5%
- EDTA 6.7 mM (conc. final)*
- * Buffer 10X prep. en lab. B2

Programa de amplificación recomendado:

1. 95°C ____ 7 min. Desnaturalización
2. Adición de 1 U de Taq-pol
3. 60°C ____ 6 min. Incubación
4. 91°C ____ 1 min. Desnaturalización
5. 60°C ____ 6 min. Temperatura combinada de alineamiento y extensión
6. 30 ciclos, pasos 4 y 5

Programa modificado (F9-HHA1):

1. Igual
2. Omitido
3. Omitido
4. Igual
5. 65°C ____ 1 min.
6. Igual
7. 65°C ____ 5 min. ext. prol.
8. 4°C ____ 10 min.
9. FIN

Condiciones de digestión con *Hha*I

- Enzima *Hha* I (New England Biolabs) 20,000 U / ml : 2.0 U / reacción
- Vol. de reacción 20 μ l
- 10 μ l de producto amplificado
- Mezcla de reacción suplementada con BSA 100 μ g/ml
- Incubación a 37°C toda la noche
- Control positivo de digestión : heterocigota corroborada para el sitio de *Hha* I en extremo 3' terminal en un estudio previo.

ANEXO 3.**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACION EN
EL PROYECTO DE INVESTIGACION**

Guadalajara, Jal., _____ de 199__.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto hago constar que acepto participar voluntaria y libremente en el proyecto de investigación titulado "DIAGNOSTICO MOLECULAR DE PORTADORAS DE HEMOFILIA A Y B MEDIANTE POLIMORFISMOS INTRAGENICOS EN POBLACION MEXICANA", cuyo objetivo es la aplicación de distintas metodologías de análisis de ácidos nucleicos para el diagnóstico de portadoras de Hemofilia A y B, el cual se realiza con fines de investigación no lucrativos.

Se me ha informado que mi participación consistirá en donar una muestra de sangre que se utilizará en el estudio con el fin de aportar datos sobre el padecimiento y en espera de recibir información diagnóstica derivada de la aplicación de los métodos mencionados.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaron a cabo, así mismo, estoy enterado sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

El investigador principal me ha garantizado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que se generen de este estudio. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente
o tutor.

Investigador

Testigo

Testigo



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

C. LIDIA CERDA AGUILAR
P R E S E N T E.

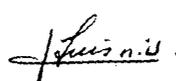
Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "DIAGNOSTICO MOLECULAR DE PORTADORAS DE HEMOFILIAS A Y B EN POBLACION MEXICANA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la M.C. ANA REBECA JALOMA CRUZ, y como Asesor al M.C. LUIS EDUARDO FIGUERA VILLANUEVA.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ENERO 27 DE 1998


M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION


M. EN C. JOSE LUIS NAVARRETE HEREDIA
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION

COMITE DE
TITULACION



c.c.p. M.C. ANA REBECA JALOMA CRUZ.- Director del Trabajo.
c.c.p. M.C. LUIS EDUARDO FIGUERA VILLANUEVA.- Asesor del trabajo.
c.c.p. El expediente del alumno.

AOB/JLNH/memn*

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DR. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES.

PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante:

CERDA AGUILAR LIDIA Código 086502534 con el título: DIAGNOSTICO
MOLECULAR DE PORTADORAS DE HEMOFILIA A Y B MEDIANTE
POLIMORFISMOS INTRAGENICOS EN POBLACION MEXICANA.

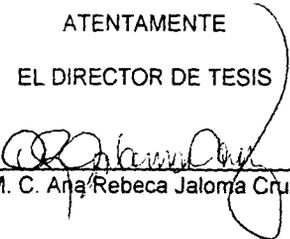
Considerando que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámen de tesis profesional y respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

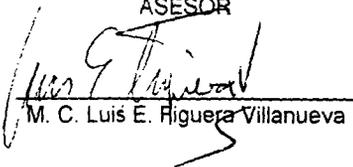
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 5 de Marzo de 1998.

ATENTAMENTE

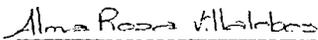
EL DIRECTOR DE TESIS


M. C. Anja Rebeca Jaloma Cruz

ASESOR


M. C. Luis E. Figueroa Villanueva

SINODALES


Dra. Alma Rosa Villalobos


Dra. Anne Santerre


M.C. Carlos Alvarez Moya