

1993-1997E

193804007

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“Persistencia Hereditaria de Hemoglobina
Fetal en Tres Familias Mexicanas con
Talasemia Beta”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

Josefina Yoali Sánchez López

GUADALAJARA, JAL., FEBRERO 1998.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Esta tesis fué elaborada en el laboratorio de Bioquímica II de la división de Genética, en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del M. en C. Francisco Javier Perea Díaz y la asesoría de las M. en C. Bertha Ibarra Cortés y Maricela Casas Castañeda. Con financiamiento otorgado por el CONACYT al proyecto No. 264100-5-1920PM.

AGRADECIMIENTOS

M. en C. Francisco Javier Perea Díaz

Por dirigir esta tesis, por sus enseñanzas, paciencia y amistad.

M. en C. Bertha Ibarra Cortés

Por ser asesora de esta tesis y brindarme la oportunidad de ingresar a su equipo de trabajo.

M. en C. Maricela Casas Castañeda

Por ser asesora de esta tesis, por todo su apoyo y amistad.

A mis compañeras de laboratorio

Anita, Lupita y Rosy por su amistad y compañerismo.

A mi mamá

Por darme siempre su cariño, apoyo y enseñarme que existen dos caminos en la vida y guiarme por el correcto.

A Efrén

Por permanecer junto a mí en los momentos más importantes y mostrarme otra cara del amor.

A mi hermano

Por sus momentos de alegría.

A mis otros hermanos Cris y Héctor

Por su invaluable amistad.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN	i
2. INTRODUCCIÓN	1
- Estructura de la Hemoglobina	2
- Genes Globínicos	10
- Los Mecanismos de Activación-Inactivación en los Genes Globínicos	12
- Hemoglobinopatías	15
- Variantes Estructurales	16
- Talasemias	17
- Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal	21
3. ANTECEDENTES	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
5. HIPÓTESIS	28
6. OBJETIVOS	30
7. MATERIAL Y MÉTODOS	32
- Pacientes	33
- Extracción de ADN	36
- Amplificación de la Región Promotora de los Genes γ^G y γ^A por Reacción en Cadena de la Polimerasa	40
- Digestión Enzimática	44
- Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla	48
- Secuenciación de Nucleótidos	50
8. RESULTADOS	54
9. DISCUSIÓN	65
10. CONCLUSIONES	69
11. BIBLIOGRAFÍA	71

1. RESUMEN

La Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF) es una condición hereditaria clínicamente benigna en la que uno o ambos genes globínicos fetales γ^G y/o γ^A continúan su expresión durante la vida adulta produciendo Hemoglobina fetal (*Hb F*) en niveles mayores a lo normal (2%). Se clasifica a nivel molecular en PHHF *deleccional*, debida a la pérdida de los genes δ y β y en PHHFnd (*no deleccional*), ocasionada por sustitución de bases en la región promotora de los genes γ . Se ha observado la asociación entre mutaciones para PHHFnd y alelos para talasemia beta (*tal- β*), por ejemplo, la sustitución G→A en -117 del promotor γ^A asociada a el alelo Ss cd 39 para *tal- β* ; además se ha reportado el polimorfismo *Xmn I* formado por la sustitución T→C en -158 del promotor γ^G como responsable de los valores altos de *Hb F* observados en pacientes con *tal- β* .

Con el propósito de conocer si los valores de *Hb F* mayores al 2% observados en 3 familias mexicanas con *tal- β* , (2 de ellas con el alelo Ss cd 39 y otra el alelo cd de inicio Δ TG→GTG), son debidos a algún alelo de PHHFnd, se analizó el ADN de 17 individuos (6 sanos y 11 pacientes) por técnicas moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), digestión enzimática y secuenciación de nucleótidos de las regiones promotoras γ^G y γ^A , para la búsqueda de mutaciones puntuales descritas en ambas regiones.

Los resultados obtenidos mostraron que los 17 individuos estudiados no presentan las mutaciones descritas para PHHFnd. Los valores incrementados se explican por la presencia del polimorfismo *Xmn I* en el promotor γ^G en aquellos individuos con valores de *Hb F* menores al 7%, puesto que se conoce que este polimorfismo incrementa hasta 5 veces la actividad del gen γ^G , solamente en condiciones de estrés eritropoyetico y en aquellos individuos con valores mayores al 7% pueden ser explicados por la presencia de algún determinante externo a los genes globínicos β . En la búsqueda de una de las mutaciones para PHHFnd se observaron 2 polimorfismos en el promotor γ^A : el primero es producido por la sustitución A→G en la posición +24 no descrito hasta la fecha, el segundo es una delección de 4 bases 5' - AGCA- 3' y se ha reportado asociado al alelo Ss cd 39 de *tal- β* .

2. INTRODUCCIÓN

La hemoglobina (*Hb*) es uno de los modelos clásicos del estudio de las proteínas. A partir de la descripción de su estructura tridimensional realizada por Max Perutz en la década de los 60's, un gran número de autores han contribuido al estudio de la forma, estructura y función de esta proteína en múltiples organismos, desde la leghemoglobina observada en la raíz de leguminosas, hasta la contenida en los glóbulos rojos (eritrocitos) de los mamíferos superiores.

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular en la década de los 70's, la descripción a nivel molecular de la Hemoglobina S (*Hb S*) fue el inicio del estudio de la patología molecular en otras proteínas. Actualmente, el análisis de las diferentes secuencias en el ADN que intervienen en la regulación y expresión tejido-específica de la *Hb*, en los diferentes estadios del desarrollo, están marcando las pautas de investigación para la comprensión de los mecanismos de "encendido y apagado" de los genes.

A continuación realizaremos una breve descripción de la estructura de la *Hb* humana, los genes globínicos que la forman y algunos aspectos de la regulación de dichos genes, para finalizar con los aspectos relacionados con la patología molecular de la *Hb* humana.

Estructura de la Hemoglobina

La *Hb* es la proteína principal que se localiza en los eritrocitos de la sangre en todos los vertebrados, su función es transportar el oxígeno (O_2) desde los alvéolos pulmonares hacia todos los tejidos del organismo y facilitar el regreso del bióxido de carbono (CO_2) hacia los pulmones (Rawdell, 1988; Ranney, 1990). Está formada por un grupo prostético denominado hemo y una parte proteica denominada globina.

El grupo hemo es un tetrapirrol cíclico formado por cuatro moléculas de pirrol enlazadas en un anillo planar con cuatro puentes α -metileno, en el centro de este anillo existe un átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}). Este compuesto es el que proporciona el color rojo de la sangre y permite el transporte de los gases

antes mencionados. La sangre de un hombre normal tiene una concentración aproximada de 15 gr/dl de *Hb*, cantidad suficiente para transportar 20 ml de O_2 por cada 100 ml de sangre (Bunn, 1986).

Estructura Primaria

La estructura primaria de las globinas esta determinada por un arreglo lineal específico de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, el contenido de aminoácidos separa a las globinas en 2 tipos diferentes, las globinas tipo alfa (α) y tipo no α o semejantes a beta (β). Ambas presentan diferencias en la secuencia de aminoácidos y para su estudio bioquímico son separadas por la carga eléctrica. (Bunn, 1986; Bank, 1990).

- Globinas tipo alfa α .

Existen dos globinas tipo alfa, las expresadas en la etapa fetal y adulta denominadas globinas α (*glob- α*), y las que aparecen en la etapa embrionaria llamadas globinas ζ (*glob- ζ*). Ambas están constituidas por 141 aminoácidos en secuencia lineal con un peso molecular de 15.7 Kilodaltons (Kd). El grupo hemo está unido covalentemente a la globina através de un enlace entre el grupo pirrólico y el imidazol de un residuo de histidina en la posición 87 (α His 87), contando del extremo N terminal del polipéptido, denominada histidina proximal (Figura 1).

Las *glob- ζ* son homólogas a las *glob- α* y difieren en 57 posiciones (Bunn, 1986; Bank, 1990; Huisman, 1993).

CUCEPA



SECRETARÍA GENERAL

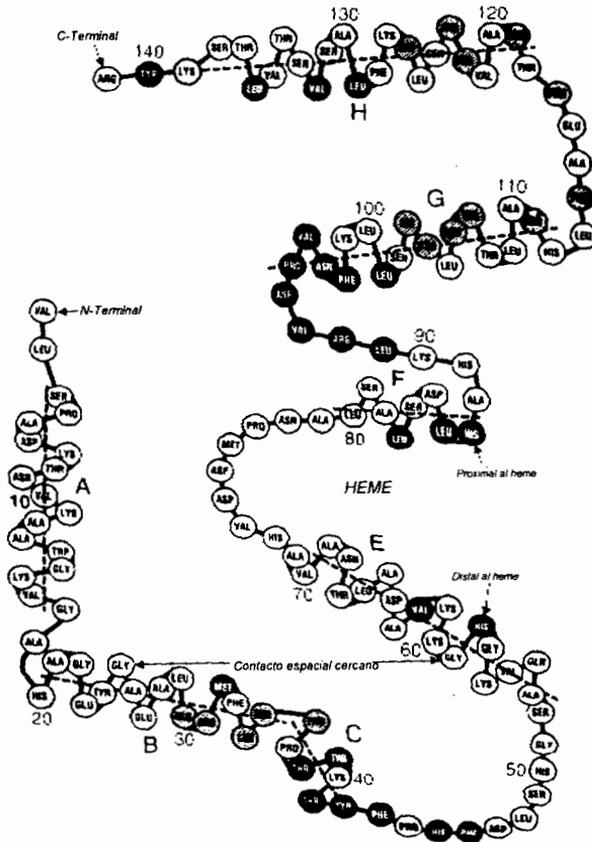


Figura 1. Estructura primaria de la globina α . Los segmentos helicoidales están representados por las letras grandes (A-H), los círculos marcados en negro indican residuos en contacto con el grupo hemo.

- Globinas tipo no alfa α (globinas semejantes a β).

Existen cuatro tipos de globinas tipo no α , las *glob*- β , δ , γ , y ϵ , que presentan una estructura homóloga y altamente conservada. Las *glob*- β difieren de las *glob*- ϵ en 36 posiciones, de las *glob*- γ en 40 posiciones y de las *glob*- δ en 10 posiciones, todas éstas globinas son producto de genes organizados en tándem (Rawdell, 1988).

Las *glob*- γ a su vez son de 2 tipos γ^G y γ^A , estas difieren en el aminoácido de la posición 136, en γ^G se presenta Glicina y Alanina en γ^A , respectivamente. Existe una globina variante γ^A que presenta Treonina en vez de Isoleucina ($^T\gamma^A$) en la posición 75 (Figura 2) (Bunn, 1986; Bank, 1990; Huisman, 1993).

Todas estas globinas tienen una longitud de 146 aminoácidos y peso molecular de 16.5 Kd, el grupo hemo está unido a la globina en His 92 (Figura 3). El residuo de cisteína en 93 de la *glob*- β es altamente reactivo y experimenta rápidamente una oxidación que puede formar una mezcla de sulfuro y otros tioesteres, éste fenómeno puede estar involucrado en el catabolismo de la *Hb* (Bunn, 1986).

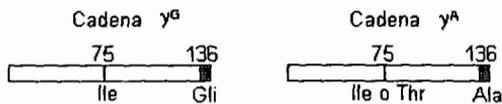


Figura 2. Heterogeneidad estructural de las subunidades globínicas humanas γ . Obtenido de: Bunn, 1986.

Estructura Secundaria

Se define a la estructura secundaria como la relación espacial entre los residuos que están cercanos en la secuencia lineal. Los segmentos de las globinas son estabilizados al adquirir cualquiera de las 2 conformaciones regulares conocidas para todas las proteínas: la hélice α o la β laminar plegada.

Algunas proteínas fibrilares como queratina y miosina exhiben la forma hélice α , mientras que otras como la fibra de seda, están en forma β laminar plegada. El colágeno rico en prolina e hidroxiprolina no puede formar dichas estructuras y da lugar a su propia estructura secundaria.

Las subunidades de la *Hb* son excelentes ejemplos de un patrón de hélice α , esta estructura fue descrita por Pauling y Corey y consiste de una hélice con 3.6 aminoácidos por vuelta, los grupos laterales de los residuos están orientados hacia el exterior en forma radial, la hélice se estabiliza por los puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de cada residuo y el grupo amino del cuarto residuo posterior (Bunn, 1986; Rawdell, 1988).

En estado nativo, el 75% de las moléculas de *Hb* son helicoidales α , después de eliminar el hemo, el contenido helicoidal de globina decrece aproximadamente 50%. En sitios específicos de las globinas, la hélice α es interrumpida por segmentos que carecen de una configuración helicoidal, en esos sitios, la cadena polipeptídica es capaz de doblarse para formar la estructura β laminar plegada. Algunos segmentos son interrumpidos de la configuración helicoidal α debido a la presencia de prolina la cual no participa en esta configuración; los 3 últimos residuos del extremo N terminal son ejemplo de esto.

Durante la investigación de la estructura tridimensional de las subunidades de *Hb* mediante cristalografía de rayos X, Perutz y asociados demostraron que existen similitudes conformacionales y concluyeron que, probablemente las subunidades de globina tienen segmentos helicoidales análogos. La *glob- β* presenta 8 segmentos helicoidales denominados con la

letra A hasta la letra H, a diferencia de 7 segmentos helicoidales de la *glob- α* pero son comparables a los de la *glob- β* . La región correspondiente a la hélice D de *glob- β* está ausente en la *glob- α* , por consiguiente, la designación helicoidal de los aminoácidos de cada subunidad es por la homología entre los segmentos, ejemplo: la histidina ligada al hemo es F8 en ambos tipos de globinas. En este caso cuando las globinas se alinean de acuerdo a sus designaciones helicoidales se presenta la máxima homología entre las subunidades α y β (Figuras 1 y 3).

Estructura Terciaria y Cuaternaria

La estructura terciaria está determinada por el ordenamiento espacial y la interrelación entre las diversas regiones helicoidales de una cadena polipeptídica sencilla, mientras que la estructura cuaternaria se refiere a la unión de varias subunidades.

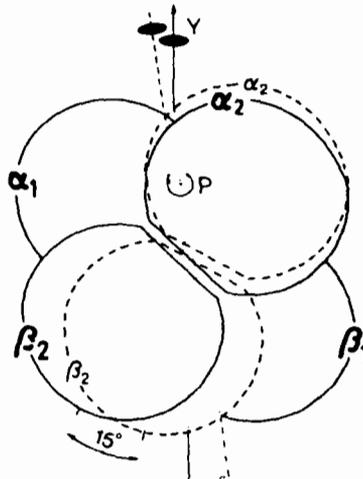
La estructura tridimensional de las globinas fue determinada por patrones de difracción de rayos X. La *Hb* humana es una molécula con dimensiones de 64 x 55 x 50 Å y las subunidades están orientadas en una unidad con un eje de simetría doble que corre bajo una cavidad central llena de agua (Bunn, 1986).

Las proteínas globulares solubles están divididas en 4 clases: a) sólo de estructura hélice α , b) formadas sólo de estructura β laminar plegada, c) compuestas de estructuras hélice α y β laminar plegada, separadas espacialmente y d) segmentos alternados de hélice α y β laminar plegada.

Se dice que las proteínas poseen estructura cuaternaria si están constituidas por 2 o más polipéptidos unidos por fuerzas distintas a los enlaces peptídicos o puentes disulfuro. Estas fuerzas son debidas a los puentes de hidrógeno y los enlaces electrostáticos o salinos formados entre los residuos sobre la superficie de las cadenas polipeptídicas (Rawdell, 1988).

La *Hb* humana es un tetrámero de 64.5 Kd, por lo tanto, la molécula de *Hb* captura 4 átomos de O_2 , la facilidad de captura depende de la presencia de otros átomos de O_2 en el mismo tetrámero, es decir, si hay O_2 unido a un hemo la fijación de átomos subsecuentes ocurre con mayor facilidad. En conclusión la *Hb* muestra una cinética cooperativa para la captación de gases.

La estructura cuaternaria de la *Hb* oxigenada se describe como el estado relajado 'R', mientras que el estado de la *Hb* con CO_2 se denomina tenso 'T'. Esta estructura cuaternaria le confiere a la *Hb* propiedades adicionales que la adaptan a sus funciones biológicas y permiten la regulación precisa de sus propiedades (Figura 4) (Rawdell, 1988).



CICERO
BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 4. Esquema que muestra la transición de la forma T de la *Hb* a la forma R, un par de subunidades rígidas (α_2/β_2) rotan 15 grados en relación con el otro par de subunidades rígidas (α_1/β_1). El eje de rotación es excéntrico y además, el par (α_2/β_2) deriva algo hacia el eje, el par (α_1/β_1) no está punteado y se conserva fijo, en tanto que el par punteado (α_2/β_2) gira y se desplaza como se observa en el dibujo.

Genes Globínicos

Los 6 diferentes tipos de globinas (α , β , γ , δ , ϵ y ζ) encontradas en las Hbs humanas son expresadas durante los diferentes estados del desarrollo y son sintetizadas por 6 genes estructurales distintos que se encuentran organizados en 2 familias génicas: a) los genes globínicos α y b) los genes globínicos β (Figura 5).

Familia de los Genes Globínicos α

Localizados en una región aproximada de 40 Kb sobre el brazo corto del cromosoma 16 en la banda 13.3 (16p13.3) los genes globínicos α incluyen: un gen embrionario funcional (ζ_2), dos genes fetales/adultos (α_2 y α_1), tres pseudogenes o secuencias de ADN que no contienen las características estructurales requeridas para ser genes globínicos funcionales, pero con una gran homología en la secuencia de nucleótidos ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$ y $\psi\alpha_1$) y un gen de función desconocida denominado θ_1 . El orden de éste agrupamiento de genes es: 5' - ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ_1 - 3', de los 7 genes globínicos α solo 3 son traducidos en proteína (Figura 5).

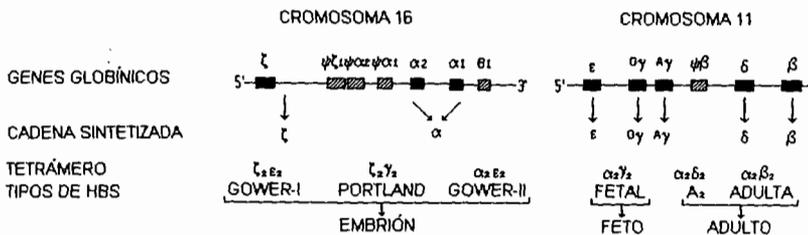


Figura 5. Localización de los genes globínicos α y β , las cajas negras representan a los genes funcionales, mientras que las cajas rayadas representan a los pseudogenes. Obtenido de: Grosfeld, 1993.

Familia de los Genes Globínicos β

Los genes globínicos β , se sitúan en una región de 60 a 70 Kb sobre el brazo corto del cromosoma 11 en la banda 15.5 (11p15.5) e incluyen los siguientes genes: un gen embrionario (ϵ), dos genes fetales (γ^G y γ^A), dos genes adultos (δ y β) y un pseudogen ($\psi\beta$), estos genes se encuentran acomodados en el orden en que se expresan durante el desarrollo y se manifiestan de manera tejido-específica: 5' - ϵ - γ^G - γ^A - $\psi\beta$ - δ - β - 3', de estos 6 genes globínicos tipo β solamente 5 son traducidos en proteína (Grosveld, 1993; Weatherall, 1995).

Todos los genes globínicos tienen una estructura similar que consiste en tres regiones codificadoras llamadas exones, estos determinan la secuencia de los aminoácidos en los polipéptidos. Dos secuencias no codificadoras intercaladas entre los exones conocidas como intrones que son removidos durante el proceso de maduración del ácido ribonucleico (ARN). Una secuencia promotora 5' y dos regiones llamadas flanqueadoras, de 75 a 100 nucleótidos extras en los extremos 5' y 3' del gen estructural, en ésta última se localiza la secuencia AATAAA que identifica el sitio de poliadenilación del ARN mensajero (ARNm) (Figura 6) (Bank, 1990).

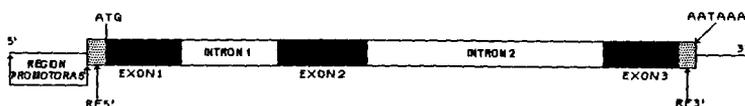


Figura 6. Esquema que muestra la organización del gen globínico β . Las secuencias que definen el promotor se localizan en el extremo 5'. Los cuadros punteados delimitan las regiones flanqueadoras (RF), los rectángulos negros representan los exones y los rectángulos en blanco muestran los intrones.

Los Mecanismos de Activación-Inactivación en los Genes Globínicos

Una de las diferencias entre los genes α y los genes β es su activación e inactivación en los diferentes procesos de "encendido-apagado" del desarrollo ontogénico, las distintas globinas polipeptídicas se presentan en diferentes estados, durante el desarrollo humano existen 3 interruptores específicos que concuerdan con el cambio del sitio principal de eritropoyesis (Grosveld, 1993).

Durante el desarrollo ontogénico del humano se presentan 6 diferentes *Hbs*: en un embrión con menos de 10 semanas de gestación se aprecian: **Hb Gower I** ($\alpha_2 \epsilon_2$) la cantidad mayor se observa a las 5 o 6 semanas de gestación, **Hb Portland** ($\zeta_2 \gamma_2$) y **Hb Gower II** ($\zeta_2 \epsilon_2$) se encuentra en embriones de 4 a 13 semanas de gestación. La síntesis de éstas *Hbs* se lleva a cabo en el saco vitelino (Tabla 1).

Tabla 1. *Hbs* presentes en diferentes estados del desarrollo ontogénico del humano.

<i>Hb</i>	COMPOSICIÓN DE GLOBINAS	SITIO DE PRODUCCIÓN	TIEMPO DE PRODUCCIÓN
GOWER I	$\zeta_2 \epsilon_2$	saco vitelino	< 5 o 6 semanas
GOWER 2	$\alpha_2 \epsilon_2$	saco vitelino	4 a 13 semanas
PORTLAND	$\zeta_2 \gamma_2$	saco vitelino	4 a 13 semanas
FETAL	$\alpha_2 \gamma_2$	hígado	tempranamente, del 53 al 95% al nacer
ADULTA	$\alpha_2 \beta_2$	médula ósea	9 semanas, del 5 al 45% al nacer
A ₂	$\alpha_2 \delta_2$	médula ósea	9 semanas, del 0.5 al 1% al nacer

Obtenido de: Ranney, 1990

Tabla 2. Hbs humanas, su estructura y patologías relacionadas a su incremento o disminución.

Hb	ESTRUCTURA	HEMOLIZADO NORMAL %	INCREMENTADA	DISMINUIDA
A ₂ ADULTA	$\alpha_2 \delta_2$ $\alpha_2 \beta_2$	2.5% 92%	tal- β -	tal- α Deficiencia de hierro
A _{1a}	$\alpha_2 (\beta\text{-fucosa})_2$	<1%	-	-
A _{1b}	$\alpha_2 (\beta\text{-N-manosa})_2$	<2%	Diabetes mellitus	Anemia hemolítica
A _{1c}	$\alpha_2 (\beta\text{-N-glucosa})_2$	3%	-	-
FETAL	$\alpha_2 \gamma_2$	<1%	Eritrocitos con Hb F, tal- β , estrés medular PHHF, anemia de células falciformes, anemia perniciosa	-
F ₁	$\alpha_2 (\gamma\text{-N-acetil})_2$	<1%	-	-
GOWER 1	$\zeta_2 \epsilon_2$	0%	-	-
GOWER 2	$\alpha_2 \epsilon_2$	0%	Tempranamente en el embrión	tal con delección del gen ξ
PORTLAND	$\zeta_2 \gamma_2$	0%	tal- α	-
H	β_4	0%	tal- α	-
BART	γ_4	0%	tal- α	-

Obtenido de: Bunn, 1986

A las 8 semanas de gestación la eritropoyesis ocurre en saco vitelino y la producción de *glob* embrionarias ζ y ϵ decrece a niveles muy bajos, mientras que aumenta la síntesis de *glob*- α y *glob*- γ (Bunn, 1986; Bank, 1990; Huisman, 1993).

En el hígado fetal con una edad gestacional de 18 semanas se produce predominantemente **Hb F** ($\alpha_2 \gamma_2$), que constituye del 90 al 95% del total de Hbs, la proporción de globinas $\gamma^G:\gamma^A$ guarda una relación 3:1 o 75:25% respectivamente y aunque la *Hb A* ($\alpha_2 \beta_2$) se produce en cantidades mínimas (Bank, 1990; Bunn, 1986; Katsube, 1995). Entre la semana 18 y 36 de gestación, el hígado es reemplazado progresivamente por la médula ósea como el órgano de mayor producción de eritrocitos, entre la semana 34 ó 36 de gestación, las *glob*- γ reducen su producción, por lo que la concentración de *Hb F* en sangre decrece aproximadamente 3% cada semana, y a los 6 meses de edad el nivel es menor del 3% y en el primer año de vida la cantidad de *Hb F* es menor al 1%. En el estado adulto la proporción de globinas $\gamma^G:\gamma^A$ cambia a la relación 2:3 o 40:60% respectivamente y la producción de *Hb A* aumenta,

presentándose así el segundo fenómeno de “encendido-apagado” de los genes $\gamma \rightarrow \beta$ o el cambio de *Hb F* a *Hb A*. El proceso se completa entre los 3 a 6 meses después del nacimiento cuando la *Hb F* comprende niveles menores al 5% del total de *Hbs* (Bank, 1990; Weatherall, 1995).

El primer proceso de “encendido-apagado” de genes ocurre en el período embrionario; cuando los genes ξ se inactivan para activarse los genes α ($\xi \rightarrow \alpha$), los genes ε son reemplazados por los genes γ ($\varepsilon \rightarrow \gamma$) y los genes β ($\varepsilon \rightarrow \beta$). El segundo proceso se da alrededor del nacimiento cuando los genes γ se inactivan y los genes β se activan (Grosveld, 1993).

En un adulto, la *Hb A* representa el 95% del total de *Hbs* (Tabla 2), la *Hb A₂* oscila entre el 2 y 3.5% (la proporción de *Hb A* y *Hb A₂* es constante 40:1) la *Hb F* comprende menos del 1% y el porcentaje restante es cubierto por *Hbs* con modificaciones post-traduccionales (Huisman, 1993; Craig, 1996a).

El control de la hematopoyesis es regulada por interacciones entre glucoproteínas, llamadas factores de crecimiento hematopoyético y receptores de membrana, cuando se activan esos receptores transmiten una señal que modifica la expresión del gen y los patrones de diferenciación por diversas vías de señalamiento celular (Grosveld, 1993).

La regulación de los genes globínicos funcionales se realiza mediante un mecanismo complejo controlado por la denominada Región Controladora del Locus (RCL), localizada de 10 a 20 Kb hacia el extremo 5' del gen globínico ε y está conformada por 4 sitios hipersensitivos a la enzima *DNAsa I*. Las secuencias de estos sitios son específicas para células eritroides y son elementos cis-actuantes que hacen independiente la expresión de los genes de su posición con la familia de las β globinas (Grosveld, 1993).

Se atribuyen dos funciones a la RCL: 1) organizar el dominio de cromatina activa en células eritroides, para la transcripción de los genes globínicos y 2) actuar como un amplificador de la transcripción.

El mecanismo que controla el proceso de "encendido-apagado" de los genes para la expresión tejido-específica de los genes globínicos es por la interacción de factores proteicos tejido-específicos que se unen al RCL y compiten por los promotores de los genes globínicos en diferentes estados del desarrollo (Assendeff, 1989; Li, 1990; Townes, 1990).

En los desordenes adquiridos, el proceso de "encendido-apagado" de los genes para el cambio de expresión del estado fetal al adulto sólo ocurre en rumiantes y en primates, y parece que el incremento en la producción de *Hb F* es un efecto secundario explicado por alguna de las siguientes opciones: a) una disrupción en el proceso normal de eritropoyesis, b) una reducción en el número de células progenitoras, o c) una demanda en el incremento de la producción de eritrocitos que puede conducir a estrés eritropoyético.

El control de los interruptores de las *Hbs* podría ser manipulado para proveer una terapia de provecho para los desórdenes de la producción de *Hb A* (Wood, 1993).

Hemoglobinopatías

Los desordenes hereditarios de la *Hb* o hemoglobinopatías son las patologías más comúnmente encontradas en humanos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sugerido que aproximadamente el 5% de la población mundial es portadora de diferentes desórdenes hereditarios en la *Hb* (Weatherall, 1990; Weatherall, 1995). Las hemoglobinopatías se clasifican en 3 grupos (Tabla 3):

- Variantes estructurales que resultan de una alteración en la secuencia de aminoácidos en alguna de las globinas.
- Talasemias, caracterizadas por la reducción en la síntesis de una o más globinas causando eritropoyesis inefectiva, hemólisis y anemia de grado variable.
- Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF) en donde la síntesis de *Hb F* se mantiene después del período neonatal.

El diagnóstico de las hemoglobinopatías se realiza mediante la combinación de examen clínico, hematológico y bioquímico; este último consiste de electroforesis de *Hb*, cuantificación de *Hb F* y *Hb A₂*, estudios moleculares como la RCP son empleados para detectar las mutaciones que originan estos padecimientos.

Tabla 3. Ejemplos de alteración de la *Hb*, producidos por sustitución de una base por otra o mutaciones puntuales, el sitio de la mutación y la modificación que sufre la *Hb*.

ALTERACIÓN DE LA <i>Hb</i>	EJEMPLO	SITIO DE LA MUTACIÓN	MODIFICACIÓN
PHHF	γ -198 T→C	Promotor	Incremento de la transcripción
tal-β°	β-28 A→C	-	Disminución de la transcripción
<i>glob</i> variante <i>Hb S</i>	β6 GAG→GTG	Exon	Cambio de aminoácido (Glu→Val)
<i>glob</i> variante <i>Hb constant spring</i>	α142 TAA→CAA	-	Codon de terminación (ter→Gln)
tal-β°	β AUG→AGG	-	Codon de iniciación
tal-β°	βInt1 nt1 G→A	Exon/Intron	Maduración del ARNm en el sitio de empalme
tal-β*	βInt1 nt5 G→C	-	Maduración del ARNm en el sitio consenso
tal-β*	βInt1 nt110 G→A	Intron	Maduración del ARNm en región ramificadora
tal-β*	βAATAAA→AACAAA	RF 3'	Maduración del ARNm sitio de poliadenilación

Obtenido de: Ibarra, 1994.

Variantes Estructurales

Hasta Marzo de 1996 se describen más de 700 variantes estructurales de la *Hb*, de las cuales, aproximadamente una tercera parte cursa con manifestaciones clínicas; de manera que algunas mutaciones causantes de variantes estructurales no conducen necesariamente a alguna patología clínica, porque no afectan la función o la estabilidad de la molécula (Huisman, 1996).

Los 3 exones presentes en los genes globínicos son las regiones que al ser modificadas por una mutación, producen la alteración estructural de la *Hb*.

De acuerdo a las manifestaciones clínicas, las variantes estructurales con manifestaciones clínicas son clasificadas en 4 grupos (Bunn, 1986):

- *Hb S*, ésta *Hb* queda dentro de solo un grupo por su prevalencia tan alta en el mundo. La manifestación de esta patología es ocasionada al disminuir la concentración de O₂ en la sangre, la *Hb S* se polimeriza formando fibras largas que ocasionan rigidez en el eritrocito, adoptando la forma de hoz,

haciéndolo susceptible de ser destruido al atravesar la microcirculación, el estado homocigoto da lugar a la anemia de células falciformes.

- Hemoglobinas inestables, la manifestación clínica principal es una anemia hemolítica congénita con cuerpos de Heinz, son debidas a inestabilidad del tetrámero de *Hb* determinada por alguna de las siguientes causas:
 - Interferencia en la estructura secundaria, principalmente en la hélice α
 - Inserción de residuos polares en el interior de la molécula
 - Desestabilización de la unión del hemo con la globina
 - Interferencia en los contactos entre globinas
- Hemoglobinas con afinidad alterada por el oxígeno, son ocasionadas por la modificación de los enlaces $\alpha_1 \beta_1$ y $\alpha_1 \beta_2$, normalmente existe un equilibrio entre las formas desoxi (T) y oxi (R) las mutaciones que modifican éstos enlaces favorecen que la *Hb* capte o libere el O_2 con mayor facilidad.
- Metahemoglobinas, en éste grupo se incluye a las *Hb* anormales que modifican el sitio de unión entre el grupo hemo y la globina.

Talasemias

En 1925, Lee y Cooley describieron una forma de anemia severa que ocurre desde la infancia, asociada a esplenomegalia y cambios óseos denominándola más tarde talasemia (tal), del vocablo griego *θαλασσα* que significa "el mar", debido a que los primeros casos se presentaron en individuos originarios de la cuenca del mar Mediterráneo (Weatherall, 1990).

La tal se ha considerado como una enfermedad autosómica recesiva, se caracteriza por anemia hemolítica de tipo microcítica e hipocrómica.

Más recientemente se ha establecido que la tal no es una enfermedad única sino un grupo de desordenes hereditarios en los cuales la síntesis de globinas está reducida o ausente, la producción de *Hb* es defectuosa y existe daño en los eritrocitos o sus precursores, debida a la oxidación de las globinas producidas en exceso.

La clasificación más extendida de los síndromes talasémicos está basada en el tipo de globina afectada en su producción, por ejemplo, si las *glob-α* están disminuidas se denomina tal-α (Weatherall, 1990; Colombo, 1993).

Los 2 tipos más comunes son tal-α y tal-β por presentar una frecuencia alta a nivel mundial. De acuerdo a informes de la OMS se ha descrito que más del 90% de los portadores de tal-α presentan grandes deleciones de ADN, mientras que en tal-β se presenta una mutación puntual en el 95% de los portadores (Tabla 3).

La tal-β es extremadamente heterogénea, a nivel molecular se han reportado cerca de 150 mutaciones diferentes asociadas a éste fenotipo, algunas son deleciones del gen globínico β, la mayoría son mutaciones puntuales que pueden afectar la transcripción, procesamiento, o traducción del ARNm globínico β (Weatherall, 1990; Weatherall, 1995).

Los alelos tal-β se dividen en tal-β^o cuando conducen a la ausencia total de *glob-β* y en tal-β⁺ cuando se presenta deficiencia parcial de *glob-β* (Weatherall, 1990).

La severidad de la tal-β se relaciona con el desbalance que existe entre las *glob-α/glob-β*, y el número de *glob-α* libres que precipitan sobre la membrana de los precursores eritroides, formando cuerpos de inclusión y hemólisis periférica debida principalmente a la oxidación de proteínas y lípidos, esas inclusiones son responsables de la destrucción intramedular de los precursores eritroides y hacen la eritropoyesis inefectiva que caracteriza a todas las tal-β (Figura 7).

CUCOA



BANCO CENTRAL

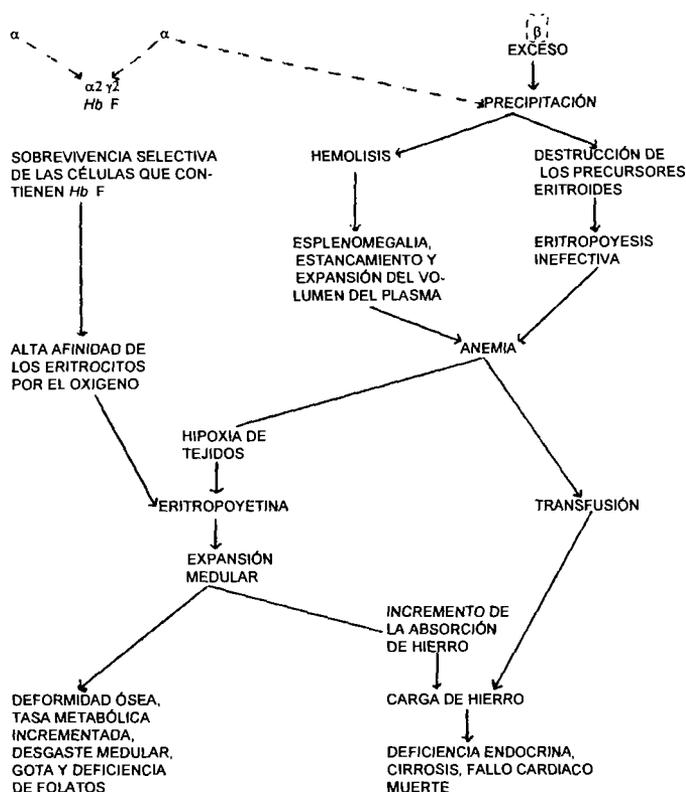


Figura 7. Fisiopatología de la talasemia β . Obtenido de Weatherall, 1995.

La severidad de la enfermedad es modulada por diversos factores, principalmente la naturaleza de la mutación, por ejemplo tal- β^0 es más severa que tal- β^+ (Dimovski, 1994). Los pacientes con tal β mayor (β^0/β^0) llamada también anemia de Cooley presentan un cuadro clínico caracterizado por anemia hemolítica, hepatoesplenomegalia, retraso en el desarrollo, cráneo prominente, crecimiento de la región maxilar y otras manifestaciones clínicas importantes que deterioran la calidad de vida del paciente, de inicio temprano y progresivo en los primeros meses de vida con una esperanza de sobrevivida

cercana a la segunda década, éstos pacientes son dependientes de transfusiones sanguíneas; los individuos con tal intermedia β^+ tienen una enfermedad menos severa desde el punto de vista clínico y no requieren de transfusiones sanguíneas frecuentes (Ibarra, 1994).

La severidad de la enfermedad esta compensada por la presencia de tal- α o por la herencia de factores que incrementan la producción de Hb F (Thein, 1993).

Las características para el diagnóstico de tal- β incluyen (Thein, 1993; Weatherall, 1990):

- Incremento en el conteo de eritrocitos
- Hipocromía
- Microcitosis
- Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) reducido
- Volumen Corpuscular Medio (VCM) reducido
- Hb A₂ del 3.5 al 5.5% en heterocigotos y del 2 al 3% en homocigotos
- Anemia ligera en heterocigotos y severa en homocigotos
- Hb F en niveles del 2.5 al 3.5% en heterocigotos y del 15 al 100% en homocigotos (Tabla 4)

Tabla 4. Características fenotípicas de las talasemias β .

CONDICIÓN	HETEROCIGOTOS			HOMOCIGOTOS		
	HCM pg	Hb A ₂ %	Hb F %	Hb A %	Hb F %	ESTADO CLÍNICO
tal- β^0	21 ± 2	3.8 - 6.5	< 4	0	~98	severa
tal- β^+	22 ± 2	3.8 - 6.5	< 4	5-50	50-90	severa
tal- β^{++}	24 ± 2	3.8 - 6.5	< 2	50-90	10-50	intermedia
tal- β con Hb A ₂ alta	21 ± 2	6.0 - 10	3-10	0	~98	intermedia
tal- β I con Hb A ₂ normal	27 ± 2	2.3 - 3.4	< 2	75-90	5-25	intermedia
tal- β II con Hb A ₂ normal	23 ± 2	2.8 - 3.5	< 2	-	-	-
tal- β heterocigoto severo	21 ± 2	3.5 - 5.3	1-12	-	-	-

Obtenido de: Weatherall, 1995.

En las células con niveles altos de *glob- γ* hay un desbalance menor de *glob- α* /*glob- β* y probablemente es debido a un incremento en la transcripción de los genes y como respuesta a un estrés eritroide extremo (Thein, 1993).

Un aspecto de particular importancia es la regulación del proceso de "encendido-apagado" de la *Hb F* a *Hb A*, para el entendimiento de las tal, debido a que muchas de ellas se asocian con síntesis persistente de *glob-γ* (Weatherall, 1990).

Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal

Durante los primeros años de vida, el nivel de *Hb F* declina hasta llegar a niveles menores al 1% del total de *Hbs*, pero en algunos desordenes adquiridos y hereditarios éste nivel se incrementa en la vida adulta. Los desordenes adquiridos que incrementan la *Hb F* en la vida adulta están restringidos a condiciones que involucran perturbaciones en la eritropoyesis, como por ejemplo algunas leucemias. Las condiciones hereditarias asociadas con niveles altos de *Hb F* en edad adulta, son el resultado directo de alguna mutación, por ejemplo PHHF, mientras que en otras el incremento aparece como resultado de una respuesta secundaria a diseritropoyesis y hemólisis (Wood, 1993).

La PHHF es una condición hereditaria bastante heterogénea, clínicamente benigna en la cual uno o ambos genes globínicos fetales γ^G y/o γ^A continúan expresándose, por lo que la producción de *Hb F* es permanente durante la vida adulta.

A nivel molecular la PHHF se clasifica en 3 grupos (Tabla 5):

1. El primero es un grupo de desórdenes hereditarios con *Hb F* en niveles bajos que persisten durante la vida adulta, en éstos desordenes el determinante genético es segregado independientemente a la agrupación del gen globínico β (Weatherall, 1995).

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Tabla 5. Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal.

TIPO	RAZA	MUTACIÓN	CADENA	Hb F %
NO DELECCIONAL independiente del gen globínico β	-	Desconocida	$\begin{matrix} G \\ \gamma \\ \gamma \end{matrix}$	-
DELECCIONAL	Negra/India Negra/Hb Kenya	Delección de genes δ y β Delección de genes γ^G y δ , delección solo del gen δ y $\psi\beta$, fusión de genes ($\gamma^A\beta$)	$\begin{matrix} G \\ \gamma \\ \gamma \end{matrix}$	15-25% 5-20%
NO DELECCIONAL involucra al gen globínico β	Negra Negra/Cerdeña - Japonesa - Negra Británica Italiana/China Brasileña Negra Grecia/Negra Georgia Negra	-202 C→G -175 T→C o T→A -161 G→A -114 C→T -200 inserción de G -202 C→T -198 T→C -196 C→T -195 C→G o C→T -175 T→C -117 G→A -114 C→T -114 a -102 delección	$\begin{matrix} G \\ \gamma \\ \gamma \end{matrix}$ $\begin{matrix} A \\ \gamma \\ \gamma \end{matrix}$	15-25% 17-30% - 11-14% - 1.5-4% 3-10% 12-21% 4-7% 36% 10-20% 3-5% 30-32%

Obtenido de: Wood, 1993; Weatherall, 1995.

2. PHHF deleccional, se produce por la pérdida de segmentos de ADN que contienen a los genes globínicos δ y β , con una expresión continua y elevada de los genes γ^G y γ^A y niveles de Hb F entre 5 al 25% en la vida adulta ($\delta\beta^0$ PHHF) (Craig, 1993).

Existen dos variedades africanas debidas a delecciones de longitudes menores a 70 Kb que difieren fenotípicamente en las proporciones de producción de $glob-\gamma^G$ y $glob-\gamma^A$. Estas formas deleccionales son muy similares a $tal-\delta\beta$ excepto por que la síntesis de $glob-\gamma$ es más eficiente y hay un desbalance menor de globinas, el homocigoto se asocia con cambios talasémicos. Estas también pueden ser clasificadas y además subdividirse de acuerdo a la población en particular en que ocurre y el defecto molecular asociado (Weatherall, 1990).

3. PHHF nd, ocasionada por mutación puntual o la sustitución de bases en alguna posición de la región promotora de los genes globínicos γ , con una

expresión incrementada de hasta 36% de *Hb F* en individuos adultos, con expresión persistente del gen β en ""cis"" ($\gamma^G \beta^+$ o $\gamma^A \beta^+$ PHHF).

Se han descrito mutaciones en la región promotora de los genes globínicos γ , que son responsables del fenotipo no delecional de PHHF (Tabla 5), entre las reportadas para el promotor de γ^G están: C→G -202, T→A -175, T→C -175, G→A -161, T→C -158, C→G -114 y una inserción de G en la posición -200. De las reportadas para el promotor de γ^A se encuentran las siguientes: C→T -202, T→C -198, C→T -196, C→G -195, T→C -175, G→A -117 y C→T -114 (Winichagoon, 1994; Pissard, 1996; Coleman, 1993; Motum, 1994).

Existen sustituciones que han sido consideradas como polimorfismos por presentarse en al menos el 1% de la población sin ocasionar alguna patología, sin embargo, se ha observado que la asociación de estos polimorfismos con otras patologías, por ejemplo, la sustitución T→C en la posición -158 que crea el sitio polimórfico *Xmn I* en el promotor del gen γ^G es responsable de los valores incrementados de *glob- γ^G* observados en pacientes con estrés eritroide, como por ejemplo tal- β y anemia de células falciformes, se conoce que la sobreexpresión de *Hb F* disminuye la severidad clínica de estas patologías (Lanclos, 1989; Efremov, 1994).

Se ha observado que las mutaciones puntuales en las regiones promotoras modifican la unión de varias proteínas trans-actuantes que detienen la expresión de los genes γ . Estas mutaciones conducen a reducir la afinidad de proteínas represoras por el promotor, o bien, a incrementar la afinidad de factores transcripcionales por el promotor (Weatherall, 1995).

3. ANTECEDENTES

En algunos casos, la PHHF nd se asocia con mutaciones que involucran al gen globínico β , donde el gen mutante se encuentra en el mismo cromosoma del determinante PHHF. Este grupo está asociado con niveles ligeramente incrementados de *Hb F* y se subdividen en PHHF $\gamma^G \beta^+$ y PHHF $\gamma^A \beta^+$ (Weatherall, 1990).

Se ha observado la asociación de PHHF nd con alelos de tal- β . Individuos heterocigotos para el alelo Sin sentido codon 39 (Ss cd 39) de tal- β con valores incrementados de *Hb F* pueden presentar asociación en "cis" con la mutación G→A en la posición -117 del promotor γ^A y en otros casos con el alelo -175 T→C del gen γ^G (Pistidda, 1995; Pistidda, 1997).

La PHHF es de particular interés porque presenta un síndrome asociado con una ausencia total de la síntesis de *glob- β* (*tal- β^0*), este síndrome se asocia con niveles altos de síntesis de *glob- γ* que compensan la deficiencia de síntesis de las *glob- β* y no presenta manifestaciones clínicas (Bunn, 1986).

El descubrimiento de los individuos homocigotos para PHHF tipo deletional son clínicamente normales con *Hb F* del 100%, ha demostrado los beneficios evolutivos de los tipos del mecanismo de "encendido-apagado" de *Hb* durante el desarrollo, por lo cual la *Hb F* podría ser un sustituto adecuado para la producción de *Hb* defectuosa en condiciones como tal- β y anemia de células falciformes.

El incremento de la producción de *Hb F* a niveles viables para aliviar la severidad clínica, así como el curso clínico benigno, se observan también en homocigotos para las mutaciones en el promotor del gen globínico β en ausencia de sustituciones en el gen γ (Wood, 1993).

En estados de estrés eritropoyético, la síntesis de *Hb F* puede ser reactivada a niveles altos en ciertas malignidades hematológicas como leucemia mieloide juvenil (Villalobos, 1993).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro laboratorio se realiza un programa para la detección de alteraciones de la hemoglobina y durante los estudios familiares observamos que, algunos miembros de 3 familias mexicanas presentan valores de *Hb F* mayores a los esperados (<3.0%) asociados con el rasgo de tal- β , lo que nos conduce a investigar la causa que origina estos incrementos en las personas afectadas.

CUBA



BIBLIOTECA CENTRAL

5. HIPÓTESIS

El incremento de *Hb F* en los individuos afectados con $\alpha\text{-}\beta$ de las 3 familias en estudio se debe a una mutación puntual en la región promotora de alguno de los genes γ^G o γ^A , lo que conduce a Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal.



6. OBJETIVOS

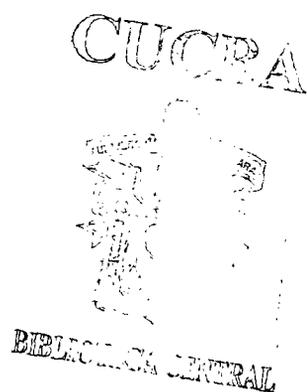
Objetivo General

Demostrar la presencia de un alelo para PHHF de tipo no delecional en los miembros con rasgo de tal- β de las 3 familias en estudio.

Objetivos Particulares

1. Demostrar si el polimorfismo *Xmn* I en -158 de γ^G participa en el incremento de *Hb F* en los pacientes con tal- β .
2. Determinar la existencia de alguna mutación puntual en la región promotora de los genes γ por digestión enzimática, Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla o por secuenciación de ADN.

7. MATERIAL Y MÉTODOS



Pacientes

Se estudiaron 17 individuos de 3 familias mexicanas con rasgo de tal- β , las familias 1 y 3 radican en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco y la familia 2 radica en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León. Los parámetros hematológicos y bioquímicos de los 17 individuos estudiados previamente, se muestran en la Tabla 6 y los arboles genealógicos en la Figura 8.

Familia 1. El propositus es una mujer de 22 años de edad, con evidencias clínicas de hepato-esplenomegalia, ictericia generalizada y anemia microcítica hipocrómica compensada; con diagnóstico clínico de tal- β intermedia y genotipo $\beta^{39}/\beta^{\text{tal}}$ (nota: los datos que presenta el propositus en la Tabla 6 fueron obtenidos después de una transfusión sanguínea). Esta familia cuenta con 12 miembros de los cuales 6 portan la mutación C \rightarrow T en el codon 39 (CAG \rightarrow TAG) conocida como Ss cd 39 (I-2, II-1, II-5, II-7, III-1 y III-2, los individuos II-1, II-5 y II-7 portan además otra mutación aún desconocida para tal- β); 2 individuos son sanos (II-2 y II-8) y 4 miembros no fueron estudiados (Figura 8) (Villalobos-Arámbula, 1997).

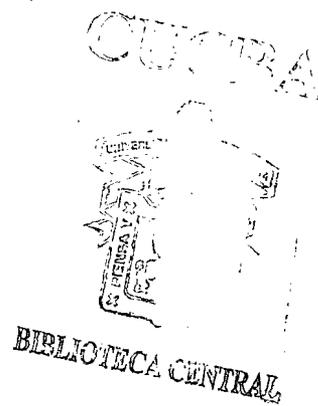
Familia 2. El propositus es un varón de 22 años, que presenta anemia microcítica e hipocrómica, con diagnóstico clínico de tal- β menor. Un alelo Ss cd 39 C \rightarrow T, fue observado en 3 miembros (I-1, II-1 y II-2) de los 6 individuos estudiados de esta familia (Tabla 6, Figura 8) (Ibarra, 1995).

FAMILIA 3. El propositus es una mujer de 23 años con diagnóstico clínico de tal- β menor, con anemia microcítica e hipocrómica, presenta la mutación A \rightarrow C en el codon de inicio de traducción (ATG \rightarrow CTG). Esta familia cuenta con 3 individuos que fueron estudiados, de los cuales 2 portan dicha mutación (I-2 y II-1) (Tabla 7, Figura 8) (Villalobos-Arámbula, 1997).

Tabla 6. Parámetros hematológicos, bioquímicos y moleculares de las 3 familias en estudio.

FAM	IND	GENOTIPO	GR	Hb	HCTO	VCM	HCM	Hb F	Hb A ₂
1	I-2	β^{39}/β^A	5.1	10.6	33.6	65.5	20.8	2.2	3.3
	II-1	β^{39}/β^{tal}	1.8	4.8	15.6	85.1	26.8	11.7	3.8
	II-2	β^A/β^A	5.3	13.9	42.8	80.3	26.1	1.7	1.1
	II-5	β^{39}/β^{tal}	3.2	7.3	22.4	70.6	22.9	16.5	3.5
	II-7	β^{39}/β^{tal}	4.0	8.0	25.7	64.6	20.2	3.1*	5.5
	II-8	β^A/β^A	4.6	14.7	42.7	93.2	32.1	1.5	2.2
	III-1	β^{39}/β^A	4.7	8.9	27.6	58.9	18.9	4.0	4.8
	III-2	β^{39}/β^A	3.4	9.4	28.6	85.3	28.2	51.6	1.0
2	I-1	β^{39}/β^A	5.4	10.1	32.4	60.2	18.8	3.1	4.4
	I-2	β^A/β^A	4.0	11.8	35.8	89.0	29.3	1.5	2.0
	II-1	β^{39}/β^A	4.8	9.6	30.3	62.8	20.0	7.4	5.2
	II-2	β^{39}/β^A	5.0	10.1	31.7	63.0	-	9.9	4.4
	II-3	β^A/β^A	5.1	14.3	42.6	84.1	28.2	1.0	3.2
	II-4	β^A/β^A	4.6	12.9	37.8	83.0	28.3	2.1	2.9
3	I-1	β^A/β^A	5.1	14.4	43.1	84.4	28.2	2.5	2.8
	I-2	$\beta^{cdATG \rightarrow GTG}/\beta^A$	4.4	8.2	25.7	59.2	18.8	6.1	5.0
	II-1	$\beta^{cdATG \rightarrow GTG}/\beta^A$	4.8	11.9	36.2	75.6	24.8	3.9	3.6

FAM= Familia, IND= Individuo, GR= Glóbulos Rojos ($10^{12}/L$), Hb= Hemoglobina (gr/dL), HCTO= Hematocrito (%), VCM= Volumen Corpuscular Medio (fL), CMH= Concentración Media de Hemoglobina (pg), Hb F= Hemoglobina Fetal (%), Hb A₂= Hemoglobina A₂ (%). *Nota: los datos de la paciente II-7 fueron obtenidos posteriormente a una transfusión sanguínea.



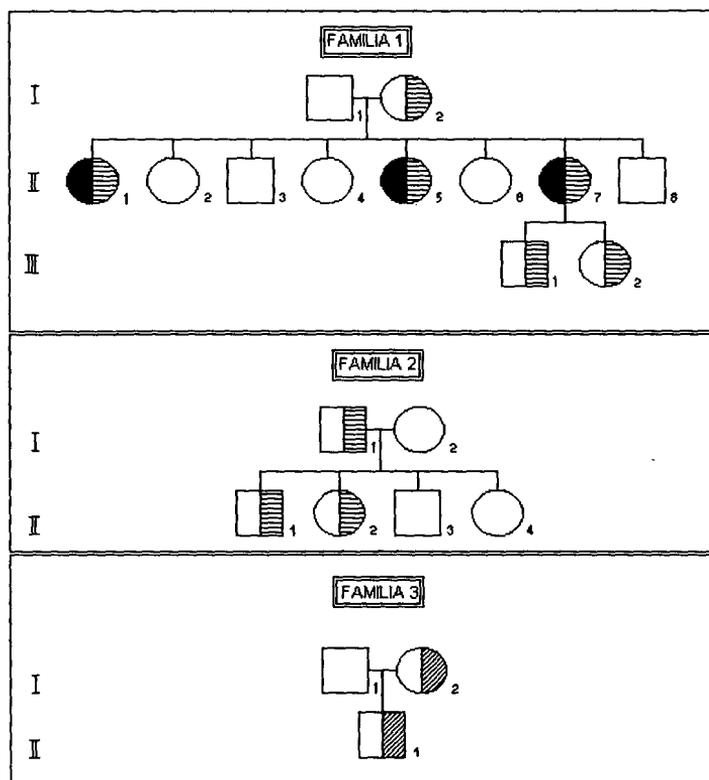


Figura 8. Arboles genealógicos de las familias estudiadas.

Métodos

Extracción de ADN

A cada individuo se le realizó extracción de ADN a partir de sangre periférica conforme la técnica de extracción con sales (Miller, 1988).

Procedimiento:

1. En un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante, se colectaron 10 mililitros (ml) de sangre periférica.
2. Se transfirió la muestra de sangre más 20 ml de solución (sol) para lisis de eritrocitos a un tubo de plástico Nalgene de 50 ml y se mantuvo en reposo durante 10 minutos (min) en el congelador, posteriormente se agitó por inversión y se puso a centrifugar durante 10 min a 2 500 revoluciones por minuto (rpm).
3. El sobrenadante fue descartado y el procedimiento anterior de lisis de eritrocitos se repitió varias veces hasta que el botón de leucocitos quedó completamente blanco, en el último paso de lavado el sobrenadante también se descartó y el botón fue resuspendido en 3 ml de la sol de lisis de leucocitos, se agitó en vórtex para separar los grumos formados, se añadieron 0.2 ml de SDS 10% y 0.5 ml de sol de proteinasa K y se incubaron a 37°C durante toda la noche.
4. A la mañana siguiente, se agregó 1 ml de sol saturada de NaCl 6M, se agitó vigorosamente durante 15 segundos (seg) y se centrifugó durante 15 min a 5 000 rpm, se recuperó el sobrenadante que contenía el ADN disuelto, con la precaución de no tomar las proteínas del sedimento, el sobrenadante se transfirió a un tubo de plástico de 15 ml, el sedimento se descartó.
5. Se agregaron 2 volúmenes (vol) de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión varias veces hasta precipitar el ADN.
6. Este ADN precipitado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía 1 ml de etanol absoluto y se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm, el sobrenadante fue descartado, el paso anterior se repitió 2 veces más

utilizando etanol al 70%, finalmente se resuspendió el ADN en 0.2 ml de buffer TE.

SOLUCIÓN DE LISIS DE ERITROCITOS 9:1

COMPONENTE	CANTIDAD
NH ₄ Cl 0.144 M	6.93 gr
NH ₄ HCO ₃ 0.01 M	0.08 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 1000 ml	

SOLUCIÓN DE LISIS DE LEUCOCITOS

COMPONENTE	CANTIDAD
Tris HCl 10 mM	0.12 gr
Na Cl 400 mM	2.34 gr
EDTA 0.2 mM	0.07 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 1000 ml	

Ajustar A pH 8.2

BUFFER TE

COMPONENTE	CANTIDAD
Trisma base 10 mM	12.11 mg
EDTA 0.2 mM	0.75 mg
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 10 ml	

Ajustar A pH 7.5 con HCl

PROTEINASA K (1mg/ml)

COMPONENTE	CANTIDAD
Proteinasa K	10 mg
SDS 1%	0.10 gr
EDTA 2 mM	0.007 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 10 ml	

CLORURO DE SODIO 6 M

COMPONENTE	CANTIDAD
Cloruro de Sodio	17.53 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 50 ml	

Cuantificación de ADN

Procedimiento:

1. La cuantificación del ADN se realizó de la siguiente manera, se tomaron 5 μ l del ADN diluido en buffer TE y se agregaron a una celda de cuarzo que contenía 1 ml de agua inyectable, se tomo la lectura en espectrofotómetro ajustado a una densidad óptica de 260 nm para ADN y 280 nm para proteínas, tomando como blanco agua inyectable.
2. Para obtener la pureza y la cantidad de ADN se utilizó la siguiente fórmula:

PUREZA = DO 260 nm/DO 280 nm	valor > 1.7 ADN puro
DO 260 nm/DO 280 nm	valor < 1.7 ADN contaminado
CONCENTRACIÓN de ADN ng/ μ l = (FD) x (50) x (DO 260 nm)	
FD Factor de dilución = $\frac{\text{Volumen total en la celda}}{\text{Volumen de ADN añadido}}$	= $\frac{1005 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} = 201$

3. La concentración del ADN en las muestras se uniformizó a 100 ng/ μ l utilizando agua inyectable.
4. La calidad del ADN fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %

Procedimiento:

1. Se realizó una suspensión de agarosa de la siguiente manera y se calentó en una plancha hasta que ésta se fundiera con la precaución de que no hirviera, una vez fundida la agarosa se vertió en el molde de la cámara con el peine para espacios puesto, se dejó gelificar por espacio de 15 min.

COMPONENTE	CANTIDAD
Agarosa	0.3 gr
Buffer TBE 0.5 X	30 ml

2. Posteriormente se quitaron los peines y se adicionó buffer TBE 0.5 X hasta llegar al nivel indicado en la cámara.

3. Se tomaron 5 μ l del tubo con ADN disuelto en buffer TE, se mezclaron con 1.0 μ l de "jugo azul 10X" y se colocaron en uno de los pozos del gel.
4. El corrimiento electroforetico se efectuó con 100 volts y 20-40 miliAmperes (mA), se dejaron correr las muestras hasta una cuarta parte antes del otro extremo del gel, donde no se aplicaron las muestras.
5. Este gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/ml durante 10 min, se colocó en un recipiente con agua, y posteriormente se observaron las bandas sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

El buffer TBE 0.5 X se preparó a partir del buffer TBE 10 X y se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad V_1 = V_2 \times C_2 / C_1 \quad V_1 = ?$$

$$C_1 = 10 \text{ X}$$

$$V_2 = 100 \text{ ml}$$

$$C_2 = 0.5 \text{ X}$$

BUFFER TBE 10 X

COMPONENTE	MOLARIDAD	PESO MOLECULAR	CANTIDAD A PESAR
Trisma base	0.890 M	121.1	107.78 gr
EDTA	0.025 M	372.2	9.31 gr
Ac. Bórico	0.890 M	61.83	55.03 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 1000 ml			

JUGO AZUL 10X

COMPONENTE	CANTIDAD
Azul de xilencianol 0.25%	25 mg
Azul de bromofenol 0.25%	25 mg
Sacarosa 50%	5 gr
Agua inyectable	10 ml

CUCEPA

SECRETARÍA DE SALUD

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICA

Amplificación de la Región Promotora de los Genes γ^G y γ^A por RCP

Una vez cuantificado el ADN y verificada su calidad, se procedió a amplificar un fragmento de 685 pb de la región promotora del gen γ^A y otro fragmento de 666 pb de la región promotora del gen γ^G por medio de la técnica de RCP. En la Figura 9 se muestran las secuencias de nucleótidos de los genes globínicos γ , obtenida del Gen Bank con el nombre HUMGAMGLOA y número de acceso M91036. La ubicación de los iniciadores es mostrada por letras en negritas y subrayadas y las flechas indican posiciones referidas en el texto.

SECUENCIA DEL GEN GLOBINICO GAMMA-G

ATATTACATA	ACATTAATCT	ATTCTGCAC	TGA AACTG IT	GC TTTATAGG
ATTTT CACT	ACACTAATGA	GAACCTAAGA	GATAATGGCC	TAAAACCA
GAGAGTATAT	TCAAGAATAA	GTATAGCACT	TCITATTGG	AAACCAATGC
TTACTAAATG	AGACTAAGAC	GTGTCCCATC	AAAAATCCTG	GACCTATGCC
TAAAACACAT	TTCACAATCC	CTGAACTTT	CAAAAATTGG	TACATGCTTT
AACTTTAAAC	TACAGG CC TC	ACTGGAGCTA	CAGACAAGAA	GGTGAAAAAC
GGCTGACAAA	AGAAGTCCTG	GTATCTTCTA	TGGTGGGAGA	AGAAAACTAG
CTAAAGGGAA	GAATAAATTA	GAGAAAAATT	GGAACTACTG	AATCGGAACA ↓-202
AGGCAAGGC ↓-198	TATAAAAAA	ATTAAGCAGC	AGTAT CC TCT	TGGGG CC CCC ↓-158
TJCCCCACAC	TATCTCAATG	CAAATATCTG	TCT GA AACGG	TT CTGGCTA
AACTCCACCC	ATGGGTGGC	CAGCCTGCC	TTGACCAATA	GCCTTGACAA
GGCAAACTTG	ACCAATAGTC	TTAGAGTATG	CAGT G AGCC	AGGGGCCGGC ↓-1
GGCTGGCTAG ↓1	GGATGAAGAA	TAAAAGGAAG	CACCCCTCAG	CAGTTCACAA
CACTCGCTTC	TGGAACGTCT	GAG TTATCA	ATA AGCTCCT	AG TCCAGAGC
CCATGGGTCA	TTTCACAGAG	GAGGACAAGG	CTACTATCAC	AAGCCTGTGG
GGCAAGGTGA	ATGTGGAAGA	TGCTGGAGGA-3'		

CONTINÚA EN LA SIGUIENTE PÁGINA

SECUENCIA DEL GEN GLOBINICO GAMMA-A

TATTATGAAC	ACTAATCTAT	TACTGGCTG	AAACTGTGGC	TTTATAGAAA
TTGTTTTAC	TACACTATTG	AGAAATTAAG	AGATAATGGC	AAAAGTCACA
AAGAGTATAT	TCAAAAAGAA	GTATAGCACT	TTTTCTTAG	AAACCCTGTC
TAAGTAAAG	AGACTAAGAT	TTGCCCCTC	AAAAATCTG	GACCTATGCC
TAAAACACAT	TTCACAATCC	CTGAACTTTT	CAAAAATTGG	TACATGCTTT
AGCTTTAAAC	TACAGGCTC	ACTGGAGCTA	CAGACAAGAA	GGTAAAAAC
GGCTGACAAA	AGAAGTCTG	GTATCTCTA	TGATGGGAGA	AGGAAACTAG
CTAAAGGGAA	GAATAAATTA	GAGAAAACT	GSAATGACTG	AATCGGAACA
AGGCAAAGGC	TATAAAAAA	ATTAAGCAGC	AGTATCTCT	TGGGGCCCTC
↓-198				
TCCCCACAC	TATCTCAATG	CAAATATCTG	TCTGAAACGG	TCCCTGGCTA
AACTCCACCC	ATGGGTTGGC	CAGCCTTGCC	TTGACCAATA	GCCTTGACAA
GGCAAACCTG	ACCAATAGTC	TTAGAGTATC	CAGTGAGGCC	AGGGCCGGC
GGCTGGCTAG	GGATGAAGAA	TAAAAGGAAG	CACCCCTCAG	↓-1
↓-1				
CACTCGCTTC	TGGAACGTCT	GAGATTATCA	ATAAGCTCCT	AGTCCAGAGC
CCATGGTCA	TITCAGAGAG	GAGGACAAGG	CTACTATCAC	AAGCCTGTGG
GGCAAGGTGA	ATGTGGAAGA	TGCTGGAGGA-3'		

Figura 9. Secuencia de los nucleótidos que corresponden a las regiones promotoras de los genes γ^G y γ^A tomadas como referencia para el proceso de amplificación. La flecha (↓) con los números establecen la posición del nucleótido de referencia. Las zonas con letras negras y subrayadas establecen la ubicación de los iniciadores. Las zonas subrayadas establecen los sitios de reconocimiento para las enzimas *Apa* I (5' GGGCC↓C 3'), *Mnl* I (5' CCTCNNNNNN↓ 3') y *Xmn* I (5' GAANN↓NNTTC 3').

CUCRA



BIBLIOTECA CENTRAL

Procedimiento:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se preparó la siguiente mezcla de RCP:

MEZCLA DE RCP

COMPONENTE	CANTIDAD
Buffer de RCP 10 X	147.0 μ l
Cloruro de magnesio (50 mM)	44.5 μ l
Desoxi nucleótidos trifosfatados (dNTP's) (10 mM)	30.0 μ l
Agua inyectable	778.5 μ l
TOTAL	1000.0 μ l

2. En otro tubo eppendorf de 0.5 ml se preparó la mezcla de reacción para cada una de las muestras, primero se adicionó al ADN, luego la mezcla de RCP y luego se procedió a preparar la mezcla de primer-Taq.

MEZCLA DE REACCIÓN

Mezcla de RCP	17 μ l
ADN genómico	2 μ l
Preparar 6 μ l de mezcla de primer-Taq por cada muestra y después adicionarlos aquí	

3. Se preparó la cantidad necesaria de mezcla de primer-Taq en un tubo eppendorf de 0.5 ml tomando en cuenta que se preparan 6 μ l por cada muestra a amplificar, nota: la enzima Taq-polimerasa se agregó hasta el final, manteniéndose en un recipiente con hielo, inmediatamente después de tener homogeneizada la mezcla de primer-Taq se repartieron los 6 μ l de esta mezcla a cada tubo con la mezcla de reacción y también se mantuvieron en hielo.

MEZCLA DE PRIMER-TAQ

COMPONENTE	CANTIDAD	
	GEN γ^A	GEN γ^G
Iniciador (5'F)	1.0 μ l	1.0 μ l
Iniciador (3'R)	1.0 μ l	1.0 μ l
Agua inyectable	3.9 μ l	3.9 μ l
Taq-polimerasa	0.1 μ l	0.1 μ l
TOTAL	6.0 μ l	6.0 μ l

La secuencia del iniciador de la región promotora del gen γ^G es: 5'-AACTGTTGCTTTATAGGATTTTCA-3' en la cadena codificadora y 3'-GTCTGGACTAGGAGCTTATTGAT-5' en la cadena complementaria.

La secuencia del iniciador de la región promotora del gen γ^A es: 5'-TCTATTACTGCGCTGAAACTGTG-3' en la cadena codificadora y 3'-GTCTGGACTAGGAGCTTATTGAT-5' en la cadena complementaria.

4. A éste tubo se le agregó una gota de aceite mineral, se agitó y se puso a centrifugar durante 30 seg a 14 000 rpm para bajar el contenido hasta el fondo y se colocó en un termociclador Perkin Elmer modelo 480, efectuándose el siguiente programa:

PASO	OCURRE	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial del ADN	94° C	4 minutos
2	Desnaturalización del ADN	94° C	1 minuto
3	Alineación de los iniciadores	62° C	1 minuto
4	Extensión de la cadena sintetizada	72° C	2 minutos
5	Extensión final de la cadena	72° C	3 minutos
	Fin del proceso	4° C	

NOTA: Los pasos 2, 3 y 4 son repetidos 30 ciclos.

5. La verificación de los amplificadores se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, similar a la utilizada en la verificación de la calidad del ADN, en este caso se utilizó un marcador de escalera de 100 pb para comparar las bandas obtenidas con las del marcador.

A partir de los segmentos amplificados se procedió a:

- Realizar digestión enzimática para la búsqueda de mutaciones puntuales con enzimas de restricción.
- Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (PCCS).
- Secuenciación de nucleótidos.

Digestión Enzimática

Se realizó digestión enzimática de los productos amplificados del gen γ^G con las enzimas de restricción *Apa* I, *Mnl* I y *Xmn* I para detectar las mutaciones C→G -202, T→C -198 y T→C -158 respectivamente.

Los productos amplificados del gen γ^A fueron sometidos a digestión con las enzimas *Apa* I y *Mnl* I para identificar las mutaciones C→T -202 y T→C -198.

Procedimiento:

1. Se prepararon 3 diferentes mezclas de enzimas para cada una de las enzimas de restricción por cada muestra en 3 tubos eppendorf de 0.5 ml de la siguiente manera:

MEZCLA DE ENZIMA			
COMPONENTE	CANTIDAD	CANTIDAD	CANTIDAD
	<i>Apa</i> I	<i>Mnl</i> I	<i>Xmn</i> I
Enzima	0.5 μ l (10 U)	0.1 μ l (0.5 U)	1.0 μ l (6 U)
Agua inyectable	16.5 μ l	16.6 μ l	13.0 μ l
BSA	-	0.3 μ l	-
TOTAL	17.0 μ l	17.0 μ l	14.0 μ l

2. Aparte se prepararon las 3 mezclas de reacción para cada una de las enzimas de restricción en 3 tubos de 0.5 ml de la siguiente manera:

MEZCLA DE REACCIÓN			
COMPONENTE	CANTIDAD	CANTIDAD	CANTIDAD
	<i>Apa</i> I	<i>Mnl</i> I	<i>Xmn</i> I
ADN amplificado	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Buffer de la enzima	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Mezcla de enzima	17 μ l	17 μ l	14 μ l
BSA	-	-	3 μ l
TOTAL	30 μ l	30 μ l	30 μ l

3. Se colocaron los 3 tubos de cada mezcla de reacción a baño María durante 12 horas con la temperatura indicada para cada enzima, *Apa* I requiere 30°C, *Mnl* I y *Xmn* I requieren 37°C.
4. Posteriormente, se agregaron 5 volúmenes de etanol absoluto a los tubos donde se realizó la digestión, se agitaron vigorosamente y se pusieron a

centrifugar durante 5 min a 14 000 rpm, el sobrenadante se descartó y se agregaron 0.2 ml de etanol al 70%, se agitó y se pusieron a centrifugar durante 5 min a 14 000 rpm, se repitió éste último paso. Una vez descartado el sobrenadante, se agregaron 15 μ l de agua inyectable y 1.5 μ l de "jugo azul 10X", se agitaron y se pusieron a centrifugar durante 30 seg a 14 000 rpm.

- Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, para visualizar los fragmentos digeridos con las enzimas de restricción, se utilizó también el marcador de escalera de 100 pb.

Los patrones de restricción esperados para cada una de las enzimas son mostrados a continuación y fueron obtenidos a partir de las secuencias mostradas en la Figura 9.

- La enzima *Apa* I reconoce la secuencia: 5' GGGCC↓C 3' y fue utilizada para detectar la mutación C→T en -202 de la región promotora del gen γ^A que comprende 685 pb:

γ^A -202 C→T				NOMENCLATURA
Normal / Normal N / N	433	252	+/+	Presencia de corte
	433	252		
Mutación / Mutación M/M	685		-/-	Ausencia de corte
	685			
Mutación / Normal M / N	685		-/+	Combinación Ausencia/Presencia
	433	252		

Para detectar la mutación C→G en -202 de la región promotora del gen γ^G que comprende 666 pb, el patrón de restricción de la enzima es:

γ^G -202 C→G			NOMENCLATURA
Normal / Normal	414	252	Presencia de corte
N / N	414	252	
Mutación / Mutación	666		Ausencia de corte
M / M	666		
Mutación / Normal	666		Combinación
M / N	414	252	Ausencia/Presencia

- La enzima *Mnl* I reconoce la secuencia: 5' CCTCNNNNNNN↓3' 3'↓NNNNNNNGAGG 5' y fue utilizada para detectar la mutación T→C en -198 de la región promotora del gen γ^A en un segmento de 685 pb:

γ^A -198 T→C						NOMENCLATURA	
Normal / Normal	262	58	111	131	122	Ausencia de corte	
N / N	262	58	111	131	122		
Mutación/ Mutación	262	58	111	13	118	122	Presencia de corte
M / M	262	58	111	13	118	122	
Mutación / Normal	262	58	111	13	118	122	Combinación
M / N	262	58	111	131	122		Presencia/Ausencia

Para detectar la mutación C→T en -198 de la región promotora del gen γ^G que comprende 666 pb, el patrón de restricción de la enzima es:

γ^G -198 I→C						NOMENCLATURA		
Normal / Normal	<u>244</u>	<u>169</u>	<u>131</u>	<u>86</u>	<u>36</u>	-/-	Ausencia de corte	
N / N	<u>244</u>	<u>169</u>	<u>131</u>	<u>86</u>	<u>36</u>			
Mutación / Mutación	<u>244</u>	<u>169</u>	<u>13</u>	<u>118</u>	<u>86</u>	<u>36</u>	+/+	Presencia de corte
M / M	<u>244</u>	<u>169</u>	<u>13</u>	<u>118</u>	<u>86</u>	<u>36</u>		
Mutación / Normal	<u>244</u>	<u>169</u>	<u>13</u>	<u>118</u>	<u>86</u>	<u>36</u>	+/-	Combinación
M / N	<u>244</u>	<u>169</u>	<u>131</u>	<u>86</u>	<u>36</u>		Presencia/Ausencia	

- La enzima *Xmn* I reconoce la secuencia: 5' GAANN↓NNTIC 3' y fue utilizada para detectar el polimorfismo *Xmn* I dado por la sustitución de T→C en -158 de la región promotora del gen γ^G que comprende 666 pb:

γ^G -158 I→C			NOMENCLATURA	
Normal / Normal	<u>455</u>	<u>211</u>	+/+	Presencia de corte
N / N	<u>455</u>	<u>211</u>		
Mutación / Mutación	<u>666</u>		-/-	Ausencia de corte
M / M	<u>666</u>			
Mutación / Normal	<u>666</u>		+/-	Combinación
M / N	<u>455</u>	<u>211</u>		Ausencia/Presencia

CUCBA



INSTITUTO CENTRAL

Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla

Este método fue utilizado con el propósito de observar diferencias en los productos amplificados de 685 pb correspondientes a la región promotora del gen γ^A .

Procedimiento:

1. Se realizó digestión enzimática de los productos amplificados de la región promotora del gen γ^A con *Rsa* I, en un tubo eppendorf de 0.5 ml se preparó una mezcla de reacción y en otro una mezcla de enzima de la siguiente manera:

MEZCLA DE REACCIÓN

COMPONENTE	CANTIDAD
ADN amplificado	10 μ l
Buffer de la enzima	3 μ l
Mezcla de enzima	17 μ l
Total	30 μ l

MEZCLA DE ENZIMA

COMPONENTE	CANTIDAD 1 RX
Enzima <i>Rsa</i> I	0.5 μ l
Agua inyectable	16.5 μ l
Total	17.0 μ l

2. La mezcla de reacción se colocó a 37°C durante 24 horas, posteriormente se realizó la preparación de la muestra.
3. Agregar 5 volúmenes de etanol absoluto, se agitó y se puso a centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se descartó.
4. Se agregaron 200 μ l de etanol al 70%, se agitó, se centrifugó nuevamente y se repitió este paso.
5. Se agregaron 10 μ l de agua inyectable y 20 μ l de formamida, la muestra se mantuvo en congelación hasta realizar su corrimiento.
6. Posteriormente se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y glicerol 5% que fue preparado de la siguiente manera:

GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10% GLICEROL 5%

COMPONENTE	CANTIDAD
Solución stock de poliacrilamida al 30%	3.3 ml
Glicerol	0.5 ml
Buffer tris glicina 5X	2.0 ml
Agua desmineralizada	4.2 ml
TEMED	5.0 μ l
Persulfato de amonio	30 mg

SOLUCIÓN STOCK DE POLIACRILAMIDA 30% RELACIÓN (37.5: 1)

COMPONENTE	CANTIDAD
Acrilamida	2.922 gr
Bis-acrilamida	0.078 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 10 ml	

BUFFER TRIS-GLICINA 5X pH 8.3

COMPONENTE	CANTIDAD
Trisma base 250 mM	7.568 gr
Glicina	35.67 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 250 ml	

7. Se vació en el molde de la cámara de electroforesis y una vez gelificado se procedió a realizar el corrimiento.
8. Se realizó un precorrimiento del gel con 150 volts y aproximadamente 6 watts, durante 30 min, se utilizó buffer tris-glicina 0.5 X.
9. Se aplicaron las muestras y se corrió el gel durante 5 horas aproximadamente con 240 volts, 40 mA y 10 watts aproximadamente, a menos de 4°C.
10. El gel fue teñido mediante la técnica de tinción con plata y posteriormente se secó a 60 °C durante 2 horas.

Tinción con plata (Sanguinetti, 1994)

1. Pretinción: se sumergió el gel durante 5 min en la solución fijadora que consiste de etanol al 10% y ac. acético al 0.5% (10 ml de etanol + 0.5 ml de ac. acético, aforar a 100 ml con agua desmineralizada) y posteriormente se retiró ésta solución.

2. Tinción: se le agregó al gel la solución fijadora plus (10 ml de etanol + 0.5 ml de ac. acético + 0.2 gr de nitrato de plata, aforar a 100 ml con agua desmineralizada) y se dejó así 5 min NOTA: Se preparó esta solución 1 min antes de utilizarla.
3. Se lavó durante 2 min con agua destilada.
4. Desarrollo de color : el gel se colocó en la solución reveladora: hidróxido de sodio al 3% y formaldehído al 0.1% (3 gr de NaOH + 270 μ l de formaldehído aforar a 100 ml con agua desmineralizada).

Secuenciación de Nucleótidos de la Región Promotora de los Genes γ^G y γ^A

Se realizó secuenciación de nucleótidos en las muestras de los siguientes pacientes: II-5 y II-7 de la familia 1, II-1 y II-3 de la familia 2 y I-2 de la familia 3. La secuencia de nucleótidos corresponde a la región delimitada por el iniciador de 3' de ambos genes hasta aproximadamente la posición -250 del sitio CAP (Figura 9).

Procedimiento:

1. El ADN se purificó según el kit de Qiagen, agregando 5 volúmenes de buffer PB al tubo con los productos amplificados, se tomó la precaución de que el tubo no contenía restos de aceite mineral.
2. Se vació el contenido del tubo en una columna con el tubo correspondiente y se centrifugó 1 min a 14 000 rpm.
3. Se descartó el líquido que quedó en el tubo bajo la columna y se colocó nuevamente bajo la columna y se agregó 750 μ l de buffer PE y se centrifugó 1 min a 14 000 rpm.
4. Se descartó nuevamente el líquido del tubo de abajo y se centrifugó 1 minuto.
5. Se pasó la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y el tubo de abajo fue descartado.

6. Se agregaron 50 μl de agua inyectable a la columna, se centrifugó y se agregaron 20 μl más de agua inyectable, se centrifugó y se descartó la columna.
7. Se cuantificó el ADN purificado que contenía el tubo de 1.5 ml.
8. Se agregan 100 fMoles de ADN para realizar el proceso de secuenciación que se realizó de la siguiente manera.
9. Se marcaron 4 tubos eppendorf de 0.5 ml por muestra, con las letras A, C, G, T, a cada uno de éstos tubos, se le agregaron 2 μl de la mezcla de terminadores ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP correspondientes a cada tubo marcado.
10. En otro tubo eppendorf de 0.5 ml se preparó la siguiente mezcla de reacción:

MEZCLA DE REACCIÓN

COMPONENTE	CANTIDAD
ADN molde purificado	100 fMolar
Iniciador 3' γ^{G} o γ^{A}	2 μl
Cycling mix	4 μl
Agua inyectable	15 μl
Isótopo [$\alpha^{35}\text{S}$ dATP]	1 μl
TOTAL	30 μl

11. De ésta mezcla de reacción se agregaron 6 μl a cada uno de los tubos marcados y se agregó una gota de aceite mineral, posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

PASO	OCURRE	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95° C	3 minutos
2	Desnaturalización	95° C	1 minuto
3	Alineación de los iniciadores	60° C	1 minuto
4	Extensión	72° C	1 minuto
5	Extensión final	72° C	3 minutos
	Finalizar	4° C	

Los pasos 2, 3 y 4 se realizaron por 35 ciclos.

12. Una vez que finalizó el programa se agregó 4 μl de solución "stop" a cada tubo y se guardaron en el congelador a -20° C hasta que se realizó el corrimiento.

13. Se preparó el gel para el corrimiento de las muestras de la siguiente manera:

GEL DE POLIACRILAMIDA AL 7%

COMPONENTE	CANTIDAD
Urea	33.6 gr
Buffer TBE 10 X	8.0 ml
*Stock poliacrilamida al 40%	14.0 ml
Agua destilada	36.0 ml
AGITAR HASTA DISOLVER LA UREA Y FILTRAR	
TEMED	30 μ l
Persulfato de amonio	100 mg

*SOLUCIÓN STOCK DE POLIACRILAMIDA 40% RELACIÓN 19:1

COMPONENTE	CANTIDAD
Acilamida	38 gr
Bis-acrilamida	2 gr
AFORAR CON AGUA DESMINERALIZADA A 100 ml	

6. Los cristales de la cámara se sellaron con cinta y se les agregó 1 ml de Sigmacote por la cara interna, el gel se vació en el espacio de estos 2 cristales sellados y se dejó polimerizar, posteriormente se mantuvo en refrigeración y al día siguiente se realizó el corrimiento del gel, se utilizó buffer TBE 1X para el corrimiento.
7. Al día siguiente se realizó el precorrimiento del gel durante 40 min aproximadamente con 60 watts, 300 mA y 2000 volts, posteriormente se aplicaron las muestras y se corrió el gel con 60 watts.
8. Una vez terminado el corrimiento, se pasó el gel a un trozo de papel filtro y se cubrió con papel "cleanpack", se puso en un secador de geles marca Biorad modelo 583 a una temperatura de 80°C durante 2 horas con una bomba de vacío de 12 torr, posteriormente, ya seco el gel, se procedió a realizar el montaje de la autorradiografía.

Autorradiografía

Procedimiento:

1. Se le quitó el papel "cleanpack" al gel y se colocó sobre un cassette para rayos X. En el cuarto oscuro, se montó en una película de alta sensibilidad para autorradiografía (Hyperfilm- β -max marca Amersham o Fuji Medical marca FujiFilm), tomando la precaución que el lado de la emulsión quede en contacto con el gel. Se dejó a exposición durante 72 horas a -20°C .
2. La película se reveló de la siguiente manera:
 - a) Se sumergió durante 5 min en sol reveladora GBX (Kodak catálogo 1900943).
 - b) Se enjuagó con agua corriente y se pasó a un recipiente con sol fijadora GBX (Kodak catálogo 1901875) durante 5 min.
 - c) Se enjuagó con agua corriente y se dejó secar.
3. Se realizó la interpretación del gel, conforme se aplicaron las muestras A, C, G y T.

Interpretación: Marcar cada carril con la base correspondiente, al interpretar el corrimiento hay que considerar que las bandas mas alejadas del sitio de aplicación son las secuencias de nucleótidos de menor tamaño, mientras que las bandas mas cercanas al sitio de aplicación son las secuencias de nucleótidos de mayor tamaño. La lectura se inició de la parte inferior de la película considerando la distancia entre cada banda. La secuencia observada fue comparada con la mostrada en la Figura 9.

CUA



BIBLIOTECA CENTRAL

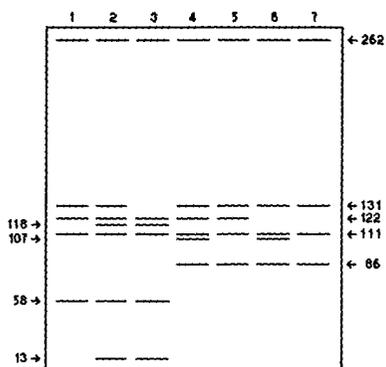
8. RESULTADOS

Para la detección de las mutaciones de la posición -202 C→T de la región promotora del gen γ^A y C→G de la región promotora del gen γ^G , con la enzima *Apa* I, se observó el patrón de digestión esperado (+/+) para la ausencia de ambas mutaciones, por lo tanto, no están presentes en ninguno de los individuos de las 3 familias estudiadas (Tabla 7). En la figura 11 se muestra el patrón de restricción esperado y una fotografía del gel con las digestiones realizadas.

En la búsqueda de la mutación T→C en la posición -198 de la región promotora del gen γ^G con la enzima *Mnl* I, se observó que no está presente (-/-) dicho cambio (Figura 12 A), según el patrón de restricción esperado. Sin embargo, en la búsqueda de la transición T→C en la posición -198 de la región promotora del gen γ^A , se observaron 4 patrones de corte no esperados en las muestras estudiadas (Tabla 7, Figura 12 B y C, Cuadro 1). Dichos patrones presentan la combinación de los siguientes fragmentos, la aparición de 2 segmentos, uno de 107 pb y otro de 86 pb, además de la desaparición de un fragmento de 122 pb.

La aparición de la banda correspondiente a 107 pb está asociada con el alelo *Ss* cd 39 y la banda de 86 pb con la ausencia de corte de *Xmn* I (Figura 12 C). La ausencia de la banda de 122 pb está asociada con la presencia del polimorfismo *Xmn* I (-/-) del promotor γ^G (Tabla 7).

Los patrones observados son mostrados en el Cuadro 1, con el siguiente orden: el carril 1 es el patrón esperado para un individuo normal, el carril 2 es el patrón esperado para un individuo heterocigoto para la mutación T→C -198, el carril 3 es el patrón esperado para un individuo homocigoto para dicha mutación, los patrones no esperados son del carril 4 al 7, el carril 4 presenta bandas de 122, 107 y 86 pb, el carril 5 presenta bandas de 122 y 86 pb y ausencia de la banda de 107 pb, el carril 6 presenta bandas de 107 y 86 pb y ausencia de la banda de 122 pb, el carril 7 presenta la banda de 86 pb y ausencia de las bandas de 122 y 107 pb.



Cuadro 1. Patrones observados con la enzima de restricción *Mnl* I.

El polimorfismo identificado por la enzima *Xmn* I, debido a la sustitución T→C en la posición -158 de la región promotora del gen γ^G , fue observado en todos los miembros de las familias 1 y 3, así como en 5 personas de la familia 2. Con base en el patrón de restricción esperado, 7 individuos son homocigotos (-/-) para el polimorfismo, 9 son heterocigotos (+/-) y 1 homocigoto (+/+) para la secuencia normal (Tabla 7, Figura 10).

Tabla 7. Resultados de las digestiones con las enzimas de restricción *Apa* I, *Mnl* I y *Xmn* I.

FAMILIA	INDIVIDUO	<i>Apa</i> I γ^G C→G γ^A C→T -202	<i>Mnl</i> I γ^G T→C γ^A T→C -198	<i>Xmn</i> I γ^G T→C -158	<i>Mnl</i> I banda de 122 pb	tal- β	Hb F %
1	I-2	+/+	-/-	+/-	presente	tal β	2.2
	II-1	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	11.7
	II-2	+/+	-/-	+/-	presente	-	1.7
	II-5	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	16.5
	II-7	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	3.1
	II-8	+/+	-/-	+/-	presente	-	1.5
	III-1	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	4.0
	III-2	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	51.6
2	I-1	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	3.1
	I-2	+/+	-/-	+/+	presente	-	1.5
	II-1	+/+	-/-	+/-	presente	tal β	7.4
	II-2	+/+	-/-	+/-	presente	tal β	9.9
	II-3	+/+	-/-	+/-	presente	-	1.0
	II-4	+/+	-/-	+/-	presente	-	2.1
3	I-1	+/+	-/-	+/-	presente	-	2.5
	I-2	+/+	-/-	-/-	ausente	tal β	6.1
	II-1	+/+	-/-	+/-	presente	tal β	3.9

+ = Presencia de corte

- = Ausencia de corte

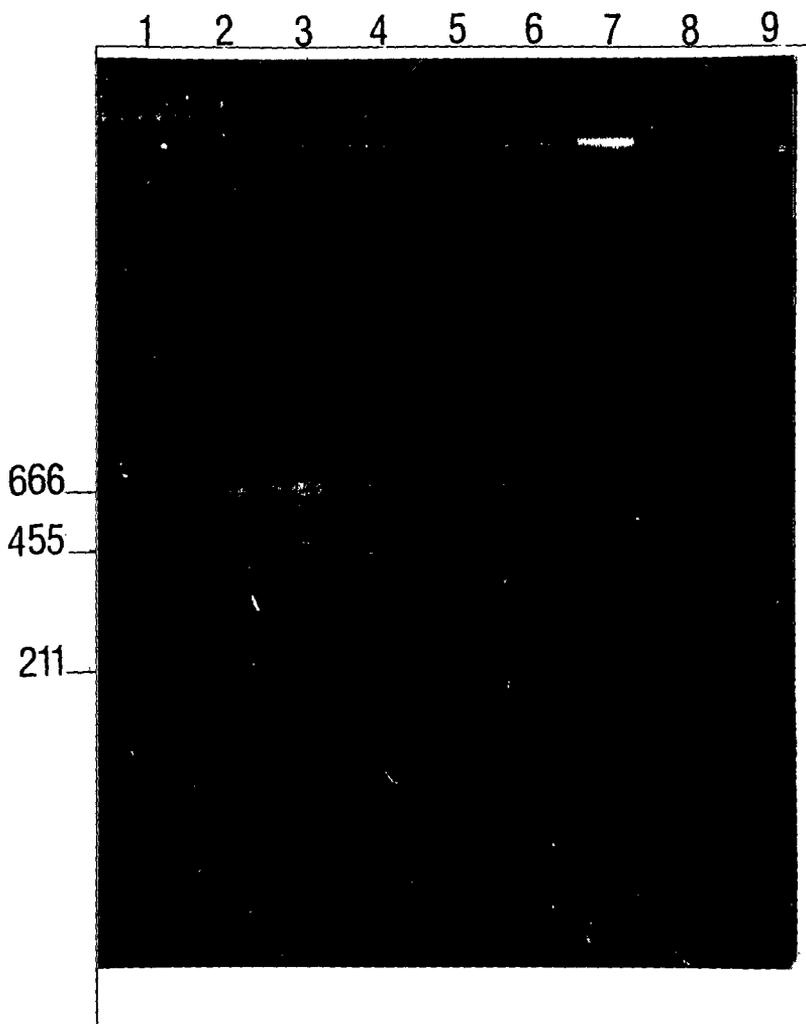


Figura 10. Fotografía en gel de agarosa al 2% que muestra la digestión realizada con la enzima *Xmn* I. Carril 1: marcador escalera de 100 pb. Carriles 2 al 9: miembros de la familia 1 en el siguiente orden II-7 (-/-), II-1 (-/-), II-2 (+/-), II-5 (-/-), I-2 (+/-), II-8 (+/-), III-1 (-/-) y III-2 (-/-).

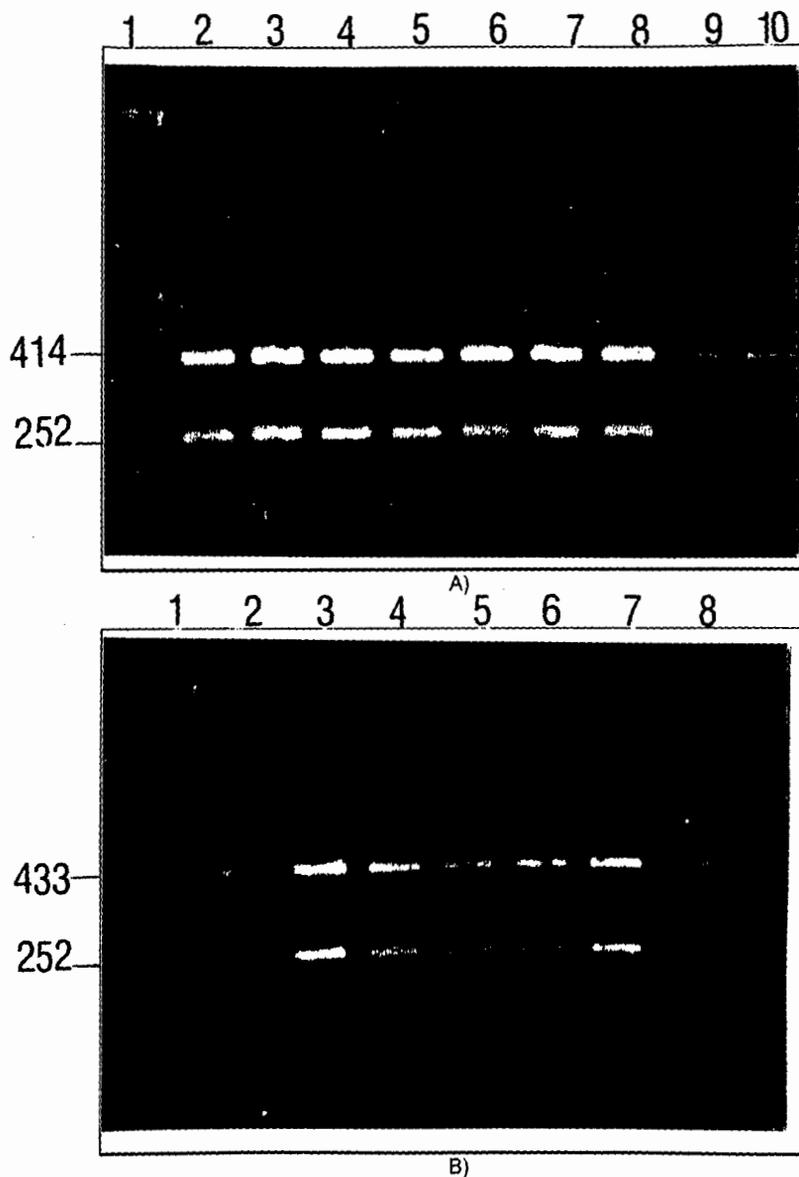
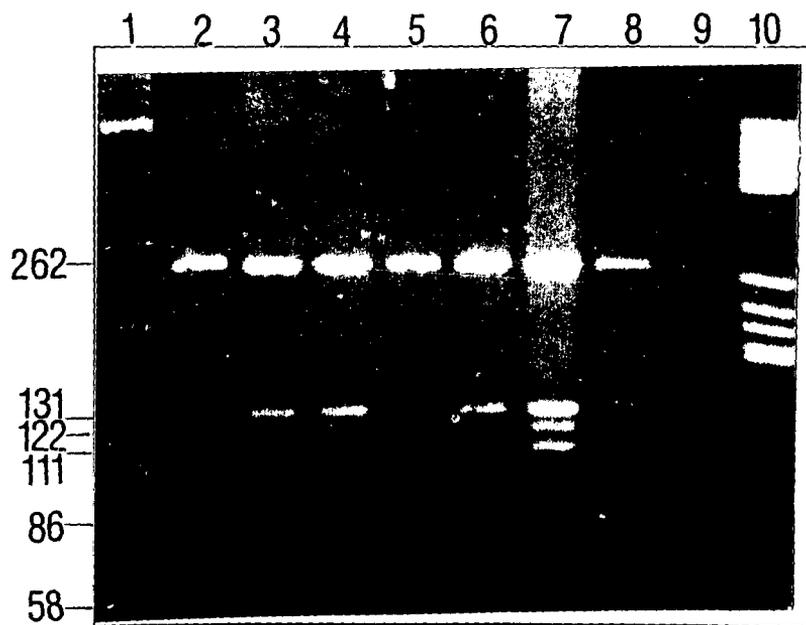
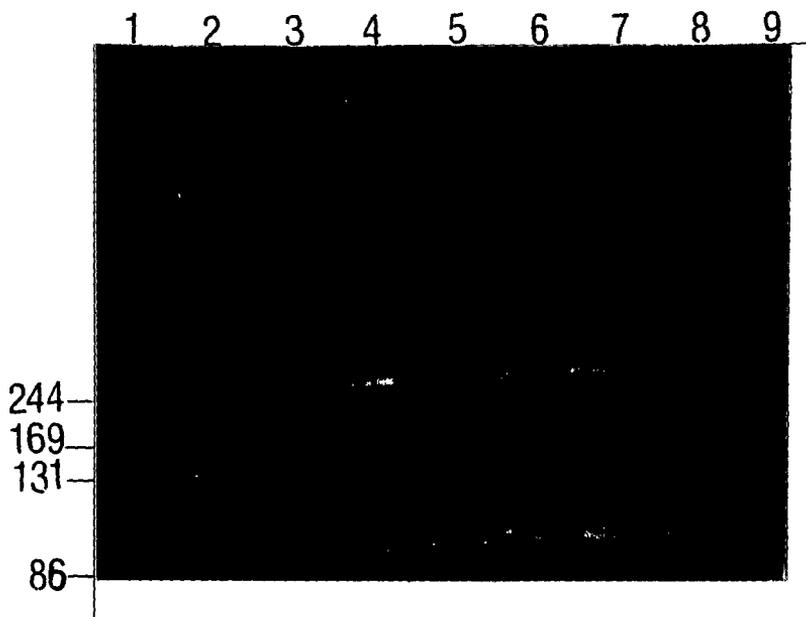
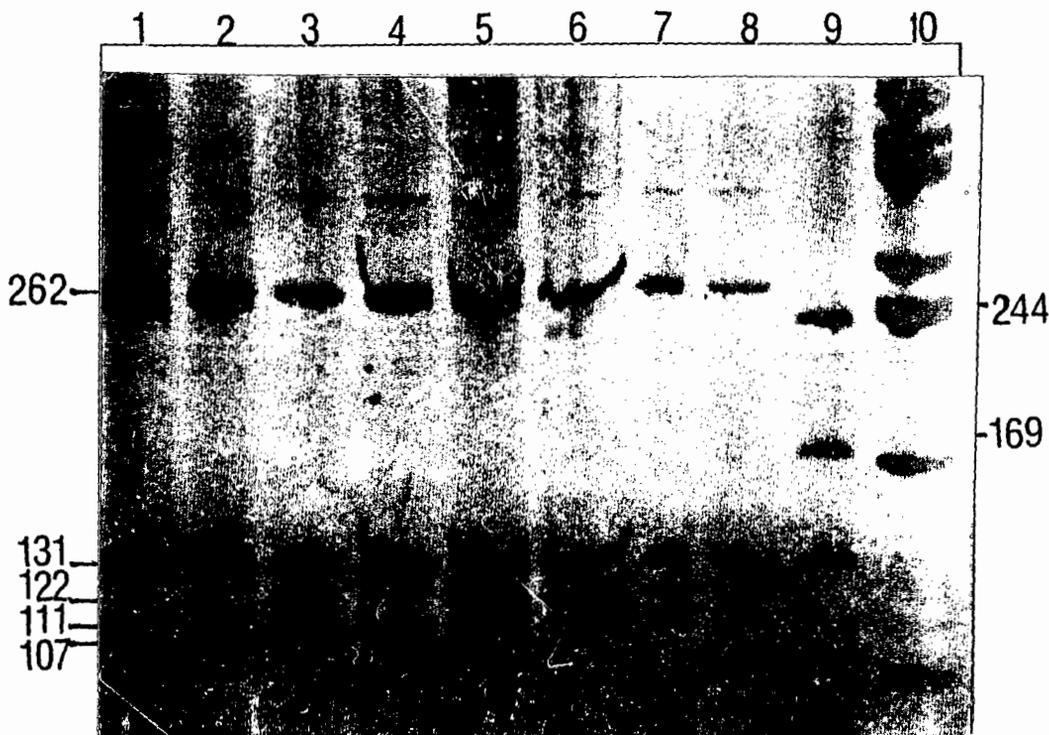


Figura 11. Fotografías de geles de agarosa al 2% que muestran las digestiones realizadas con la enzima *Apa* I. A) Región promotora γ^G . Carril 1: Marcador escalera de 100 pb. Carriles 2 al 7: miembros de la familia 2 en el siguiente orden II-3, II-2, II-1, II-4, I-2 y I-1. Carriles 8 al 10: miembros de la familia 3 en el siguiente orden I-2, I-1 y II-1. B) Región promotora γ^A . Carril 1: Marcador escalera de 100 pb. Carriles 2 al 8: miembros de la familia 1 en el siguiente orden II-7, II-1, II-2, II-5, I-2, II-8 y III-1.





C)

Figura 12. Fotografías que muestran las digestiones realizadas con la enzima *Mnl* I. A) Región promotora γ^G , gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador escalera de 100 pb. Carriles 2 al 9: miembros de la familia 1 en el siguiente orden II-7, II-1, II-2, II-5, I-2, II-8, III-1 y III-2. B) Región promotora γ^A , gel de agarosa al 4%. Carril 1: Marcador escalera de 100 pb. Carriles 2 al 9: miembros de la familia 1 en el siguiente orden II-7, II-1, II-2, II-5, I-2, II-8, III-1 y III-2. Carril 10: Marcador pBR 322 *Hae* III. C) Región promotora γ^A , gel de poliacrilamida 10% y glicerol 10%. Carriles 1 al 8: miembros de la familia 1 en el siguiente orden II-7, II-1, II-2, II-5, I-2, II-8, III-1 y III-2. Carril 9: Muestra de la Región promotora γ^G . Carril 10: Marcador pUC 18.

Los resultados obtenidos mediante PCCS, no muestran diferencias entre los productos de la región promotora del gen γ^A en las muestras de los 17 individuos estudiados (Figura 13).

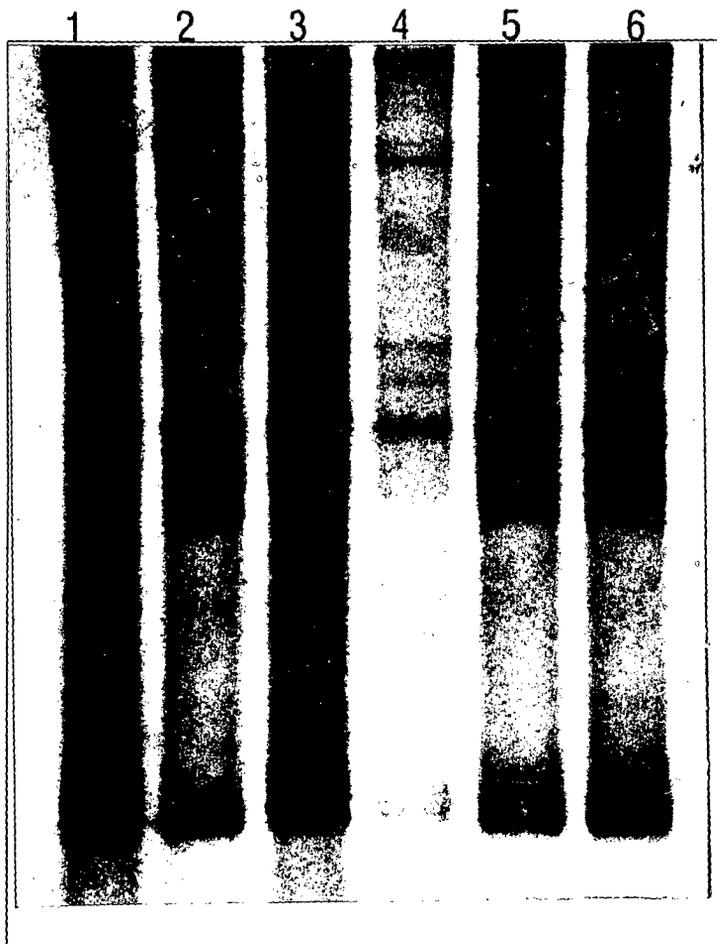


Figura 13. Fotografía en gel de poliacrilamida que muestra el resultado del Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla realizado en la región promotora γ^A . Carriles 1 al 6: miembros de la familia 1 en el siguiente orden II-3, II-2, II-1, II-5, I-2 y II-8.

La secuenciación de ADN de la región promotora γ^G y de la región promotora γ^A , permitió una lectura confiable desde las posiciones -80 hasta -210 de ambas regiones promotoras.

El proceso de secuenciación del fragmento de 666 pb correspondiente a la región promotora del gen globínico γ^G , permitió confirmar la presencia del polimorfismo *Xmn* I producido por la transición T→C en la posición -158 de la región promotora del gen globínico γ^G identificada previamente por digestión enzimática en los individuos correspondientes (Tabla 8, Figura 14). El análisis de las secuencias obtenidas en las muestras de los 5 pacientes permitió descartar la presencia de mutaciones puntuales.

El análisis de las secuencias realizadas en el segmento de 685 pb correspondiente a la región promotora del gen globínico γ^A , mostró una transversión C→G en la posición -147 en las muestras de los pacientes II-3 de la familia 2 y I-2 de la familia 3 (Tabla 7, Figura 15). Los 3 pacientes restantes muestran que la secuencia de nucleótidos es normal.

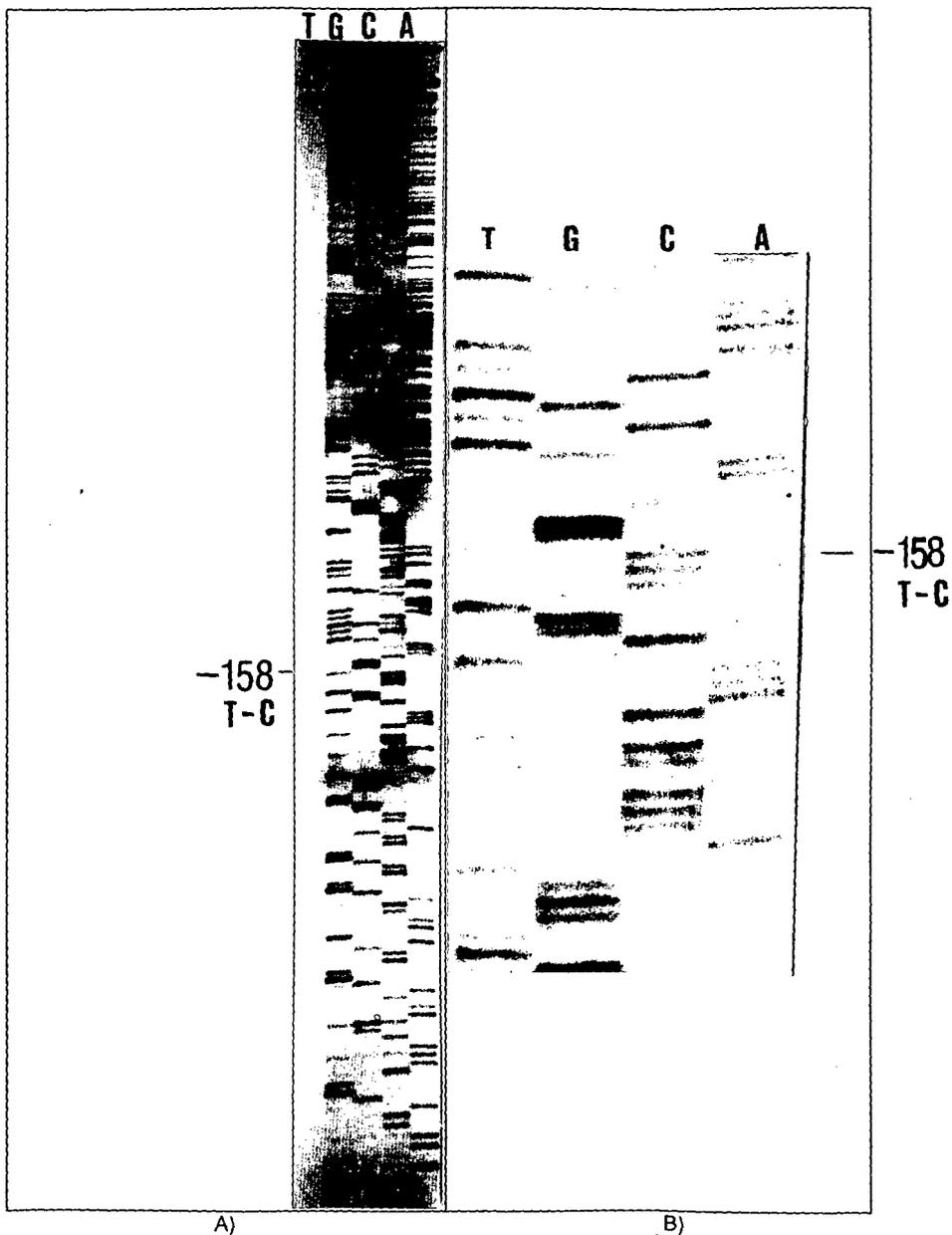


Figura 14. Secuencia de nucleótidos realizada en la región promotora γ^G . A) Miembro II-7 de la familia 1. B) Miembro II-5 de la familia 1.

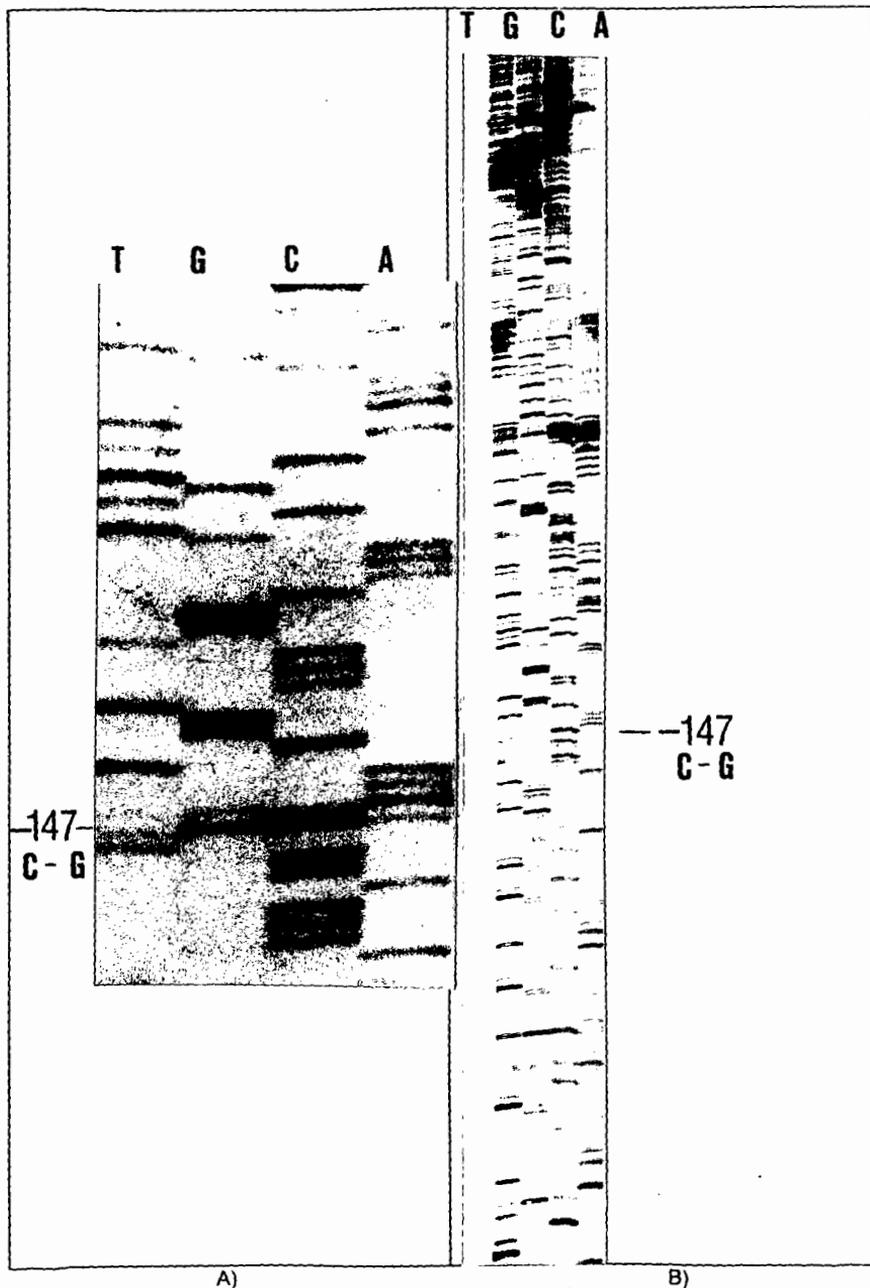


Figura 15. Secuencia de nucleótidos de la región promotora γ^A . A) Miembro II-3 de la familia 2. B) Miembro I-2 de la familia 3.

9. DISCUSIÓN

La búsqueda de mutaciones como causa de los incrementos de *Hb F* observado en los miembros portadores de tal β se realizó considerando primero las mutaciones previamente descritas en la literatura. La mutación C→G en la posición -202 del promotor γ^G se reporta con niveles de 15 a 25% de *Hb F* y la sustitución C→T en la misma posición pero en el promotor γ^A con valores de 2 a 4% de *Hb F* en heterocigotos (Wood, 1993). Estas mutaciones fueron analizadas en el presente trabajo por medio de la enzima *Apa I*; los resultados observados descartan la presencia de dichas sustituciones en las personas estudiadas (Tabla 7).

La mutación T→C en la posición -198 del gen γ^A se reporta con niveles de 3 a 10%, pero esta misma sustitución en el promotor γ^G no ha sido reportada. Dicha sustitución en las 2 regiones promotoras de los genes γ^A y γ^G también fue buscada mediante digestión enzimática con *Mnl I*, los resultados obtenidos muestran que: a) ésta mutación no está presente en ninguno de los 17 individuos estudiados, tanto para el promotor de γ^G como para el de γ^A y b) existen 4 patrones de digestión diferentes a los esperados para el promotor de γ^A , en los cuales se observa la presencia de 2 fragmentos no esperados, uno de aproximadamente 107 pb y otro de 86 pb y la ausencia del fragmento de 122 pb. Es importante señalar que la ausencia de la banda de 122 pb ocurre en las muestras que son homocigotas (-/-) para el polimorfismo *Xmn I* (Tabla 7, Figura 12 B y C).

Con el fin de explicar éstas variaciones, se analizó la secuencia de nucleótidos ya reportada (Figura 9), en busca de secuencias que por un cambio de base sean reconocidas por la enzima *Mnl I*. En la secuencia correspondiente al segmento de 122 pb, es posible que un cambio de A→G en la posición 24 forme un sitio de reconocimiento para la enzima *Mnl I*, y corte este fragmento en dos pedazos, uno de 86 pb y otro de 36 pb. De ésta manera se explicaría la desaparición de la banda de 122 pb en los homocigotos para el polimorfismo *Xmn I* (-/-) y la presencia de la banda de 86 pb en los 16 pacientes homocigotos

o heterocigotos para el polimorfismo *Xmn* I, aún cuando éste polimorfismo no ha sido reportado, sería conveniente realizar una búsqueda en otros pacientes con el fin de conocer si el polimorfismo se observa en población general.

La presencia del segmento de 107 pb puede ser explicada por la presencia de una deleción de 4 bases 5' -AGCA- 3' de la posición -225 a -222 que se localiza en la banda de 111 pb y su presencia formaría un segmento de 107 pb, ésta deleción es considerada un polimorfismo asociado al alelo Ss cd 39 en población italiana (Lanclos, 1989), como observamos en las familias 1 y 2, aparece un fragmento de aproximadamente 108 pb y dichas familias tienen el alelo Ss cd 39.

El análisis de la secuencia de nucleótidos realizada en el presente trabajo no permitió corroborar la transición A→G de la posición 24 debido a que el iniciador está ubicado a 2 nucleótidos del extremo 3' del iniciador (Figura 9). La presencia del polimorfismo por deleción de 4 bases sólo fue sugerida en una muestra, pero la baja intensidad de las bandas y el alto grado de empaquetamiento, impide confirmar su presencia en las otras secuencias realizadas.

En relación a la sustitución C→G en la posición -147 del promotor γ^A pudiera ser una variación rara que no tiene efecto en los niveles de Hb F observados debido a que el individuo II-3 de la familia 2 no presenta ninguna anomalía hematológica. Esta sustitución se localiza 3 nucleótidos después de la secuencia 5' -CACCC- 3' utilizada como secuencia de unión del factor transcripcional CP1 (Wood, 1993).

El polimorfismo *Xmn* I ha sido asociado con los incrementos de Hb F observados en pacientes con tal β y Hb S (Efremov, 1994), los incrementos solo son observados en estado de estrés eritropoyético. Los estudios de expresión temporal sugieren que incrementa de 4 a 5 veces los valores normales (Lanclos, 1989). El mecanismo por el cual se alcanzan incrementos en la Hb Fetal de los individuos portadores del polimorfismo *Xmn* I no es conocido completamente pero se sugiere que la presencia de C en -158 tiene

como consecuencia la activación del promotor γ^G , lograda probablemente por cambio en la configuración del ADN que influye en la unión de 2 factores de transcripción que se localizan casi equidistantes a -158. La secuencia 5' - CACCC- 3' ubicada en -144 a -140 es utilizada como sitio de unión del factor transcripcional eritropoyético conocido como CP1 y la secuencia 5' - ATGCAAAT- 3' localizada de -175 a -182 es utilizada como sitio de unión para los factores transcripcionales OCT-1 u OTF (Wood, 1993). Estos dos factores son importantes para la formación del complejo transcripcional implicado en la expresión de los genes globínicos humanos.

Con base en el valor promedio de *Hb F* (1.5%) obtenido de individuos normales por nuestro laboratorio (Villalobos-Arámula, 1993), un incremento de 5 veces el valor promedio sería de 7.5%, por lo tanto es posible explicar los valores de *Hb F* observados en 13 de los pacientes analizados en el presente trabajo por la presencia del polimorfismo *Xmn I* (el caso III-2 con valores de 51.6% no se considera en este análisis ya que al momento del estudio contaba con menos de 1 año de edad) (Tabla 7). Los 3 restantes (II-1 y II-5 de la familia 1 y II-2 de la familia 2) pudieran presentar algún factor externo a los genes globínicos β que permita incrementos mayores a 7.5% al combinarse con el *Xmn I*. Se han descrito al menos 2 loci génicos implicados en los incrementos de *Hb F* localizados en 6q22-q24 y Xp22.2-p22.3 (Craig, 1996b), por lo que existe la posibilidad de que éstas 3 personas estén coheredando alguno de éstos factores y sean la causa de los valores superiores a 7.5% de *Hb F*.

10. CONCLUSIONES

1. Los valores incrementados de *Hb F* observados en los miembros de 3 familias mexicanas con $\alpha\text{-}\beta$ no son originados por mutaciones puntuales que originan Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal tipo no delecional, según los resultados obtenidos mediante digestiones enzimáticas y secuenciación de nucleótidos.
2. Los valores incrementados se explican por la presencia del polimorfismo *Xmn I* del promotor γ^G en aquellos individuos con valores de *Hb F* menores al 7%, pero en aquellos individuos con valores mayores al 7% no lo explica completamente, es posible que estos valores estén dados por un determinante genético que sea externo al gen globínico β .
3. Al realizar la búsqueda de la mutación T→C en -198 de la región promotora del gen γ^A con la enzima *Mnl I* se encontraron 2 polimorfismos: el primero es producido por el cambio A→G en la posición +24 que aún no ha sido descrito en la literatura y no causa patología, sería conveniente realizar una búsqueda en otros pacientes para establecer su frecuencia en la población general. El segundo polimorfismo es causado por la deleción de 4 bases 5' - AGCA- 3' de la posición -225 a -222 y esta asociado al alelo Ss cd 39.

11. BIBLIOGRAFIA

Assendelff, GB, Hanscombe, O., Grosveld, F. and Greaves, DR. The β -globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in tissue-specific manner. *Cell* 56: 969-977, 1989.

Bank, A. The synthesis of globin. En: *Hematology*. Williams, WJ., Beutler, E., Erslev, AJ. and Lichtman, MA. (Eds) Cap. 12: 94-99. Edit. Mc Graw-Hill. EUA, 1990.

Bunn, HF. and Forget, BG. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. W.B. Saunders Company. USA, 1986.

Coleman, MB., Adams III, JG., Steinberg, MH., Plonczynski, MW., Harell, AH., Castro, O. and Winter, WP. $\gamma^G \gamma^A$ (β^+) Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin: the G gamma -158, C \rightarrow T mutation in cis to the -175 T \rightarrow C mutation of the A gamma globin gene results in increased G gamma-globin synthesis. *Am J Hematol* 42: 186-190, 1993.

Colombo, B., Guerchicoff-Svarch, E. and Martínez-Antuña, G. Síndromes Talasémicos. En: *Genética y Clínica de las Hemoglobinas Humanas*. Cap. 6: 226. Edit. Pueblo y Educación. Cuba, 1993.

Craig, JE., Sherin, SM., Barnetson, R. and Thein, SL. The molecular basis of HPFH in a british family identified by heteroduplex formation. *Br J Haematol* 84: 106-110, 1993.

Craig, JE., Sampietro, M., Oscier, DG., Contreras, M. and Thein, SL. Myelodysplastic syndrome with karyotype abnormality is associated with elevated F-cell Production. *Br J Haematol* 93: 601-605, 1996a.

Craig, JE., Rochette, J., Fisher, CA., Weatherall, DJ., Marc, S., Mark Lathrop, G., Demenais, F. and Thein, SL. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by regressive approach. *Nat Gen* 12: 58-64, 1996b.

Dimovski, AJ., Efremov, DG., Gu, LH. and Huisman, THJ. The relative levels of β^A and β^S mRNAs in Hb S heterozygotes and in patients with *Hb S- β^+ thalassaemia* or *Hb S- β^+ -HPFH* combinations. *Br J Haematol* 87: 353-356, 1994.

Efremov, DG., Dimovski, AJ., Sukarova, E., Schiliro, G., Zisovski, N., Efremov, GD., Burrone, OR. and Huisman, THJ. γ -mRNA and Hb F levels in β -thalassaemia. *Br J Haematol* 88: 311-317, 1994.

Grosveld, F., Dillon, N. and Higgs, D. The regulation of human globin gene expression. En: *Clinical haematology international practice and research. The Haemoglobinopathies*. Higgs, DR. and Weatherall, DJ. (Eds) Cap. 2: 31-56. Edit. Bailliere Tindall. W.B. saunders Company. England, 1993.

Huisman, THJ. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. En: *Clinical haematology international practice and research. The Haemoglobinopathies*. Higgs, DR. and Weatherall, DJ. (Eds) Cap. 1: 1-30. Edit. Bailliere Tindall. W.B. Saunders Company. England, 1993.

Huisman, THJ., Carver, MFH. and Efremov, GD. A syllabus of human hemoglobin variants. Published by the sickle cell anemia foundation Augusta, GA, USA, 1996.

Ibarra, B., Romero, F., Carrillo, C. y Delgado, JL. Genética y Hematología. En: Genética Clínica. Guizar-Vázquez, J. (Ed). Cap. 26: 493-494. Edit. El Manual Moderno. México, 1994.

Ibarra, B., Perea, F.J. y Villalobos-Arámula, A.R. Alelos talasémicos en mestizos mexicanos. Rev Invest Clin 47: 127-131, 1995.

Katsube, T. and Fukumaki, Y. A role for the distal CCAAT box of the γ -globin gene in Hb switching. J Biochem 117: 68-76, 1995.

Lanclos, KD., Michael, SK., Gu, YC., Howard, EF., Stoming, TE. and Huisman, THJ. Transient chloramphenicol acetyltransferase expression of the G_γ globin gene 5' - flanking regions containing substitutions of C→T at position -158, G→A at position -161, and T→A at position -175 in K562 cells. Bioch et Biophys Acta 1008: 109-112, 1989.

Li, Q., Zhou, B., Powers, P., Envert and Stomatoyannopoulos, G. β -globin locus activation region: conservation of organization, structure and function. Proc Natl Acad Sci USA 87: 8207-8211, 1990.

Miller, SA., Dykes, DD. and Polesky, HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. Nucleic Acids Res 16 (3): 1215-216, 1988.

Motum, Pl., Deng, ZM., Huong, L. and Trent, RJ. The australian type of nondeletional G_γ -HPFH has a C→G substitution at nucleotide -114 of the G_γ gene. Br J Haematol 86: 219-221, 1994.

Pissard, S., Mirad, A., Beuzard, Y. and Romeo, PH. A new type of hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) : HPFH Tunisia β^+ (+C -200) G_{γ} . Br J Haematol 95: 67-72, 1996.

Pistidda, P., Frogheri, L., Oggiano, L., Guiso, L., Manca, L., Dore, F., Masala, B., Gilman, JG., and Longinotti, M. Fetal hemoglobin expression in compound heterozygotes for -117 (G→A) A_{γ} HPFH and β^039 nonsense thalassemia. Am J Hematol 49: 267-270, 1995.

Pistidda, P., Frogheri, L., Guiso, L., Manca, L., Dore, F., Mura, L., and Longinotti, M. Maximal gamma-globin expression in the compound heterozygous state for -175 T→C Gamma-HPFH and beta degree 39 nonsense thalassemia: A case study. Eur J Haematol 58: 320-325, 1997.

Radwell, VW. Proteínas: Mioglobina y Hemoglobina. En: Bioquímica de Harper. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Radwell, V.W. (Eds) Cap. 6: 40-49. Edit. El Manual Moderno. México, 1988.

Ranney, HM. and Sharma, V. Structure and function of hemoglobin. En: Hematology. Williams, WJ., Beutler, E., Erslev, AJ. and Lichtman, MA. (Eds) Cap. 37: 377-388. Edit. Mc Graw-Hill. EUA, 1990.

Sanguinetti, CJ., Dias-Neto, E. and Simpson, JGA. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17: 915-918, 1994.

Thein, SL. β -Thalassaemia. En: Clinical haematology international practice and research. The Haemoglobinopathies. Higgs, DR. and Weatherall, DJ. (Eds) Cap. 6: 151-176. Edit. Bailliere Tindall. W.B. Saunders Company. England, 1993.

Townes, TM. and Behringer, RR. Human globin locus activation region (LAR): role in temporal control. Trends Genet. 6: 219-233, 1990.

Villalobos-Arámula, A. Expresión de genes globínicos fetales en adultos con enfermedades hematológicas. Tesis Profesional de Maestría en Genética Humana, Univ. de Guadalajara, 1993

Villalobos-Arámula, A.R., Bustos, R., Casas Castañeda, M., Gutiérrez, M. E., Perea, F.J., Thein, SL. e Ibarra, B. β -thalassemia and β^A globin gene haplotypes in Mexican Mestizos. Hum Genet 99: 498-500, 1997.

Weatherall, DJ. The thalasseмии. En: Hematology. Williams, WJ., Beutler, E., Erslev, AJ. and Lichtman, MA. (Eds) Cap. 50: 510-539. Edit. Mc Graw-Hill. EUA, 1990.

Weatherall, DJ., Clegg, JB., Higgs, DR. and Wood, WG. The Hemoglobinopathies. En: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver, CR., Beaudet, AL., Sly, WS. and Valle, D. (Eds) Cap. 113: 3417-3484. Edit. Mc Graw-Hill. USA, 1995.

Winichagoon, P., Fucharoen, S., Wilairat, P., Chihara, K. and Fukumaki, Y. Nondeletional type of Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin: molecular characterization of three unrelated Thai HPHF. Br J Haematol 87: 797-804, 1994.

Wood, WG. Increased Hb F in adult life. En: Clinical haematology international practice and research. The haemoglobinopathies. Higgs, DR. and Weatherall, DJ. (Eds) Cap. 7: 177-214. Edit. Bailliere Tindall. W.B. Saunders Company. England, 1993.



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

C. SANCHEZ LOPEZ JOSEFINA YOALY
P R E S E N T E.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de TESIS " **PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL EN TRES FAMILIAS MEXICANAS CON TALASEMIA BETA** " para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al **M. C. FRANCISCO JAVIER PEREA DIAZ.**

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
"AÑO HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA"
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO 17 DE 1997

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

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

c.c.p. **M.C. FRANCISCO JAVIER PEREZ D.-** Director 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
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES.

PRESENTE.

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

SANCHEZ LOPEZ JOSEFINA YOALY Código 193804007 con el título: **PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL EN TRES FAMILIAS CON TALASEMIA BETA.**

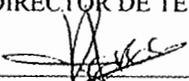
Considerando que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámen de tesis profesional y respectivos.

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

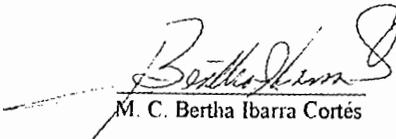
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 28 de Enero de 1998.

ATENTAMENTE

EL DIRECTOR DE TESIS

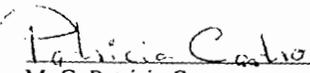

M. C. Fco. Javier Perea Diaz

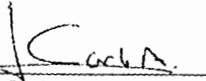
ASESORES


M. C. Bertha Ibarra Cortés


M. C. Maricela Casas Castañeda

SINODALES


M. C. Patricia Castro


M. C. Carlos Alvarez Moya


M. C. Sergio Scheminsky