



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

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

**POLIMORFISMOS *Rsa I* y *Hae III* EN EL
GEN N-ACETILGALACTOSAMINA-6-
SULFATO SULFATASA (GALNS) EN
SUJETOS SANOS Y EN PACIENTES
CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV
A DE LA POBLACION MEXICANA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

C. ELIA CONTRERAS ROGERO
GUADALAJARA, JAL. FEBRERO DE 1998

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por darme la vida por su apoyo durante mi carrera y por ser ella la mejor guía en mi vida.

A mi abue que siempre estuvo presente apoyandome.

A mis hermanas Edith, Esme y Alma por su ayuda incondicional en el transcurso de mi carrera.

A ti Agustín por tu cariño, paciencia y por tu gran amistad.

A mis tíos y primos por su ayuda y apoyo en todo momento.

A mi tutor Paty Gallegos por su enseñanza, amistad y ayuda para la realización de este trabajo.

Al Dr. José Sánchez Corona por la oportunidad que me dio de ingresar a este centro.

A mis compañeros del laboratorio de Medicina Molecular por su amistad.

A mis amigas Lili, Martha y Magaly por haberme ofrecido su amistad y apoyo desinteresado.



**POLIMORFISMOS *Rsa I* y *Hae III* EN EL
GEN N-ACETILGALACTOSAMINA-6-
SULFATO SULFATASA (GALNS) EN
SUJETOS SANOS Y EN PACIENTES
CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV
A DE LA POBLACION MEXICANA.**

El presente trabajo de tesis se realizó en la División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico Nacional de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco.

CIBOBA



ALUMNA:

Elia Contreras Rogero

Pasante de la carrera de Lic. En Biología

BIBLIOTECA CENTRAL

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Martha Patricia Gallegos Arreola

Técnico en Investigación, Candidato del SNI

Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

ASESOR

Dr. José Sánchez Corona

Investigador Titular, Investigador Nacional nivel II (SNI)

Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

M. en C. Silvia Esperanza Flores Martínez

Técnico en Investigación

Centro de Investigación Biomédica de Occidente

INDICE

I.- INTRODUCCION	4
II.- ANTECEDENTES	19
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV.- OBJETIVOS	23
V.- HIPOTESIS	25
VI.- MATERIAL Y METODOS	27
VII.- RESULTADOS	32
VIII.- DISCUSION	40
IX.- CONCLUSIONES	43
X.- BIBLIOGRAFIA	46
ANEXO	50
GLOSARIO	60

I.- INTRODUCCION

LAS MUCOPOLISACARIDOSIS

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que forman parte de los errores innatos del metabolismo, originadas por la deficiencia específica de enzimas lisosomales que participan en la degradación adecuada, hasta aminoazúcar y ácido urónico de los glucosaminoglucanos (GAGs). Éstos al no ser degradados se acumulan en los lisosomas y como consecuencia se produce un depósito anormal de GAGs en las células, tejidos y órganos, lo cual causa daño tisular progresivo que puede variar en severidad, desde alteraciones óseas y articulares, hasta la incompatibilidad con la vida.

De acuerdo a las características clínicas, radiológicas y bioquímicas de los pacientes con MPS se han identificado 6 tipos de MPS (I, II, III, IV, VI y VII) con algunos subtipos (tabla I). Las manifestaciones clínicas son variables y su curso es progresivo; entre las generales se encuentran: facie grotesca, retardo mental, opacidad corneal, infecciones en oído medio, sordera, alteraciones en sistema nervioso, problemas cardiacos, hernia umbilical, inguinal, hepatoesplenomegalía, rigidez articular, mano en garra, síndrome de túnel del carpo, talla baja, silla turca en forma de J y diferentes grados de disostosis múltiple. Las características Bioquímicas dependen de la deficiencia enzimática y la alteración de la vía metabólica específica. Dependiendo de la deficiencia enzimática, se encuentra bloqueado el catabolismo del dermatán sulfato (DS), heparán sulfato (HS) ó keratán sulfato (KS), individualmente o en combinación; el condroitín sulfato, también puede estar involucrado. Se han identificado 10 enzimas, cuyas deficiencias originan las MPS: 4 glucosidasas, 5 sulfatasas y una transferasa no hidrolítica (1 -3).

El desarrollo de los métodos bioquímicos y moleculares en las últimas décadas, ha permitido una mejor caracterización de las MPS, se ha reconocido alelismo, se han encontrado componentes genéticos, e identificado los defectos enzimáticos básicos de acuerdo a los cuales se les clasifica (1 - 4).

Aspectos Bioquímicos:

BIBLIOTECA CENTRAL

Los glucosaminoglucanos (GAGs) ó mucopolisacáridos ácidos constituyen el componente principal de la sustancia fundamental amorfa del tejido conectivo. Bioquímicamente son un grupo heterogéneo de polímeros lineales de elevado peso molecular, formados por dímeros de aminoazúcar y ácido urónico (*figura I*). El aminoazúcar puede ser N-acetil- β -D-glucosamina ó N-acetil- β -D-galactosamina (acetilados o sulfatados) y el ácido urónico puede ser ácido β -D-glucurónico ó α -L-idurónico.

Dependiendo de la secuencia del aminoazúcar, ácido urónico, tipo de enlace entre los disacáridos, por la longitud de la cadena que forman y por el número y localización de los grupos sulfatos que contiene se distinguen 7 tipos de GAGs denominados heparán, heparán sulfato, dermatán sulfato, keratán sulfato, condroitín-4-sulfato (Ch-4-S), condroitín-6-s (Ch-6-S) y ácido hialurónico (AH), todos excepto el AH contiene azúcares sulfatados y el KS es el único en el que el ácido urónico es reemplazado por la galactosa (*tabla II*).

Se encuentran unidos covalentemente a una proteína central de AH, que sirve de punto de anclaje de numerosas cadenas de polisacáridos, los cuales forman un agregado macromolecular llamado *proteoglucano* (*figura II*). Una de las funciones de los proteoglucanos es dar resistencia al cartílago y prevenir su calcificación, contribuir al mantenimiento de agua y balance de sal en el cuerpo, facilitar la difusión de metabolitos entre la sangre y los tejidos y al mismo tiempo sirve como barrera física para evitar la diseminación de partículas grandes como bacterias y otros microorganismos.

La síntesis de los GAGs ocurre en fibroblastos, células del músculo liso, células cebadas y mastocitos, en donde en primer lugar se elabora el núcleo de proteína de manera convencional, posteriormente se añaden las cadenas de carbohidratos, un azúcar cada vez, empezando por xilosa que se fija a serina, la sulfatación ocurre después de que el azúcar adecuado se enlaza en la cadena de crecimiento a medida que la proteína progresa desde los ribosomas, donde es sintetizada, hacia el exterior de la célula.

La degradación de los GAGs se lleva a cabo en los lisosomas de las células, que contienen más de 40 hidrolasas ácidas diferentes (*figura III*). En donde los proteoglucanos

son tomados por endocitosis y degradados. Las proteasas liberan moléculas de GAGs de la proteína central y los GAGs poliméricos son degradados por una serie de enzimas que incluyen endoglucosidasas, exoglucosidasas y sulfatasas. Los GAGs al no ser degradados se acumulan en diferentes tejidos que dependiendo del bloqueo enzimático ocasionan alteraciones fenotípicas que dan origen a las MPS. (1- 3, 6).

De acuerdo a la experiencia del grupo de la División de Medicina Molecular y Genética en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, en los últimos 8 años se han observado gran incidencia de MPS, por lo que es de interés, en orden sistemático el estudio a nivel clínico, bioquímico y molecular de este tipo de enfermedades. En la literatura existen reportes acerca de una serie de polimorfismos en el gen N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), utilizados como herramienta diagnóstica mediante el análisis de ligamiento, en familias caucásicas y japonesas con MPS IV A (7-9). Sin embargo en México no existen estudios de esta naturaleza, razón por la cual nos interesa analizar los 6 sitios polimórficos reportados por Tomatsu y Cols. (8), conocer en primera instancia la estructura génica de nuestra población, la estructura génica de un grupo de pacientes con MPS IV A, determinar la frecuencia de los 6 sitios polimórficos, comparar las frecuencias en ambos grupos, determinar la segregación de haplotipos en ambos grupos y posteriormente aplicar esta metodología en familias con MPS IV A de nuestra población. Razón por la cual en este trabajo de tesis se presentan los resultados obtenidos a partir de 2 (*Rsa I* y *Hae III*) de los 6 sitios polimórficos que se pretenden estudiar en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A de origen mexicano y en un futuro utilizarlos como parte de una herramienta diagnóstica por medio del análisis de ligamiento en familias con MPS IV A de origen mexicano.

MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A

Existen dos fenotipos de la MPS IV, el *subtipo A* que corresponde a la deficiencia de la enzima GALNS y se conoce como la forma *clásica* y El *subtipo B*, originado por la deficiencia de la enzima β -galactosidasa, antes conocido como forma *leve*.

La N-Acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS, E.C. 3.1.6.4.) es una enzima lisosomal que participa en la remoción de los grupos sulfatos de la N-acetilglucosamina del KS y Ch-6-S (*figura IV a y b*). Una disfunción en esta enzima trae como consecuencia la acumulación de GAGs parcialmente degradados en los lisosomas de las células, lo que origina la enfermedad denominada *mucopolisacaridosis IV A (MPS IV A o síndrome de Morquio)*. Se hereda de manera autosómica recesiva y presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde la forma severa hasta la forma ligera, caracterizándose por retardo en el crecimiento óseo, displasia esquelética, hiperlaxitud articular, hipoplasia odontoidea, coxa valga, tronco corto, opacidad corneal, hepatoesplenomegalia, fascie inusual, sin retardo mental, excesiva excreción urinaria de KS y Ch-6-S, a nivel del SNC se desarrolla mielopatía que puede ser aguda, subaguda o crónica en las formas graves y que se manifiesta por una parálisis que incapacita al paciente, la sobrevida depende de la gravedad, pero en general presentan un promedio de vida de 20 a 30 años de edad, pueden llegar a fallecer por complicaciones cardiopulmonares o por compresión del cordón cervical; la forma intermedia y ligera pueden tener un promedio de vida normal. La MPS IV A es aparentemente normal al nacimiento pero las manifestaciones severas son visibles en los primeros 3 años de vida (1-2,5).

Bioquímicamente es fácil distinguir entre los dos subtipos ya que cada una tiene diferente deficiencia enzimática. En cada paciente con posible mucopolisacaridosis debe comprobarse la excreción urinaria del glucosaminoglucano y la determinación de la falla enzimática. La actividad residual en la enzima refleja diferentes mutaciones alélicas en el gen de GALNS, lo cual se manifiesta en la capacidad del paciente para degradar los GAGs (1-2).

GEN GALNS

a) Estructura

El gen de la GALNS se ha localizado en el cromosoma 16q24.3, contiene un ADNc de 50 kb distribuidos en 14 exones (*figura V*), que originan un precursor glicopéptido de aproximadamente 120 kD, caracterizado por ser una proteína heterodimérica que después del proceso de maduración, originan una subunidad madura

de 40 kD y una forma activa de 15 kD, cuya función es la de hidrolizar los grupos éster sulfato de los extremos no reducidos del Ch-6-S y de la galactosa-6-sulfato del KS (5- 6).

b) Polimorfismos intragénicos

El reciente aislamiento del ADNc del gen GALNS ha hecho posible el análisis de aproximadamente 100 mutaciones en el gen GALNS en pacientes con MPS IV A, por medio de las técnicas de Southern blot, enzimas de restricción, polimorfismo conformacional de cadena sencilla y secuenciación. Así como de 8 marcadores ó polimorfismos intragénicos que contribuyen al entendimiento en las bases moleculares de de la MPS IV A (*figura IV*). Sin embargo, debido a que la MPS IV A se caracteriza por una gran heterogeneidad molecular, su diagnóstico es difícil y clínicamente es fácil confundir los fenotipos de MPS IV A y MPS IV B, además la cuantificación de la actividad enzimática no permite distinguir entre los subtipos severo, intermedio y ligero de la MPS IV A, por lo que es necesario recurrir a otras estrategias metodológicas entre ellas el análisis de polimorfismos intragénicos asociados a diferentes mutaciones en pacientes con MPS IV A que permiten establecer un diagnóstico preciso.

En un estudio realizado por Rezui y cols en 1996 (11) sobre la heterogeneidad génica del gen GALNS, analizan la frecuencia de 6 sitios polimórficos ó RFLPs (por sus siglas en ingles, polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción), denominados de acuerdo a las enzimas de restricción que los detectan *Sty I* (alelos AA, Aa y aa), *Sph I* (alelos BB, Bb y bb), *Rsa I* (HH, Hh y hh), *Hae III* (CC, Cc y cc), *Stu I* (DD, Dd y dd) y *Hap II* (EE, Ee y ee).

Este estudio lo realizan en dos poblaciones, la población caucásica, (31 pacientes con MPS IV A y 138 controles) y la población japonesa (10 pacientes con MPS IV A y 50 controles). Un total de 27 haplotipos estuvieron presentes en ambas poblaciones. En la población caucásica se presentó en controles como en pacientes, el haplotipo ABHcde con mayor frecuencia. En contraste con la población japonesa en donde observan la presencia de 20 de los 27 haplotipos, siendo el más común en normales y en pacientes el haplotipo abhcDE. La probabilidad de heterocigotos para uno o más de los RFLPs en este estudio fue del 77 % (caucásicos: 77.27% y japoneses de 78.26%), esto indica que estos sitios son muy informativos para la detección de portadores, ya que no basta con las pruebas

enzimáticas debido a que se confunden los valores de los portadores con los normales. En conclusión 3 cuartas partes de los parientes de individuos afectados, resultaron informativos para el análisis de ligamiento de MPS IV A (3-11).

Los polimorfismos representan variaciones naturales en la secuencia del genoma que se encuentran en la población general y pueden emplearse como marcadores para rastrear genes mutados en familias afectadas con enfermedades genéticas. Así el diagnóstico molecular, utilizado en el análisis de segregación familiar de los polimorfismos, es posible por las características que presentan, su utilidad es expresada como el grado de informatividad y varía de acuerdo con el grupo poblacional estudiado (7-11).

El grado de informatividad se define como el porcentaje de heterocigocidad en la población para dicho polimorfismo, el cual tiene un valor máximo del 50% en un sistema bialélico que poseen dos alelos definidos por la presencia o ausencia del sitio de restricción. Cuando se encuentra un valor de heterocigocidad cercano a este valor, se incrementa la probabilidad de encontrar ambos alelos dentro de una familia.

En el caso del gen de la GALNS se han reportado varios marcadores multialélicos generados en algunos casos por la presencia de repeticiones variables y otros por el reconocimiento de enzimas de restricción como el polimorfismo *Rsa I*, en donde han reportado una heterocigocidad de 0.46 en japoneses y 0.47 en caucásicos y el polimorfismo *Hae III* con una heterocigocidad de 0.21 en japoneses y de 0.18 en caucásicos (8, 10 - 12).

Tabla I

TIPOS DE MPS

TIPO	EPONIMO	CLINICA	HERENCIA	ENZIMA DEFICIENTE	GAGs AFECTADOS
MPS I H	Hurler	Inicio antes de los 10 años, disostosis múltiple, retardo mental, organomegalia alteraciones cardiacas, fallecimiento en la infancia.	AR	α -L-iduronidasa	DS, HS
MPS I S	Scheie	Contracturas articulares, opacidad corneal, inteligencia y esperanza de vida normal.	AR	α -L-iduronidasa	DS, HS
MPS I H/S	Hurler/Scheie	Fenotipo intermedio entre la MPS I H y I S.	AR	α -L-iduronidasa	DS, HS
MPS II A	Hunter A	Disostosis múltiple, organomegalia, retardo mental, muerte antes de los 15 años.	LXR	Iduronato sulfatasa	DS, HS
MPS II B	Hunter B	Inteligencia normal, talla corta, sobrevida de 20 a 60 años.	LXR	Iduronato sulfatasa	DS, HS
MPS III A	Sanfilippo A	Deterioro mental profundo, hiperactividad, manifestaciones somáticas moderadas.	AR	Heparán-N-sulfatasa (sulfaminidasa)	HS
MPS III B	Sanfilippo B	Similar a la III A	AR	α -N-acetil glucosaminidasa	HS
MPS III C	Sanfilippo C	Similar a la III A	AR	Acetil CoA: a-glucosamina-N-acetil transferasa	HS
MPS III D	Sanfilippo D	Similar a la III A	AR	N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa	HS
MPS IV A	Morquio A	Platispondilia, escoliosis grave opacidad corneal, hipoplasia del esmalte dental, se conocen formas intermedias.	AR	N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa	KS Ch-6-S
MPS IV B	Morquio B	Similar a la MPS IV A	AR	β -galactosidasa	KS
MPS VI	Maroteaux - Lamy	Disostosis múltiple, opacidad corneal, inteligencia normal, sobrevida hasta la adolescencia en la forma severa. Se conocen formas intermedias.	AR	N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa (Arisulfatasa B)	DS
MPS VII	Sly	Disostosis múltiple, hepatoesplenomegalia, amplio espectro de severidad.	AR	β -glucuronidasa	DS, HS Ch-4-S Ch-6-S

GAGs = Glucosaminoglicanos HS = Heparán Sulfato Ch-4-S = Condrotin 4 Sulfato AR = Autosómico recesivo
 DS = Dermátin Sulfato KS = Keratán Sulfato

Figura I

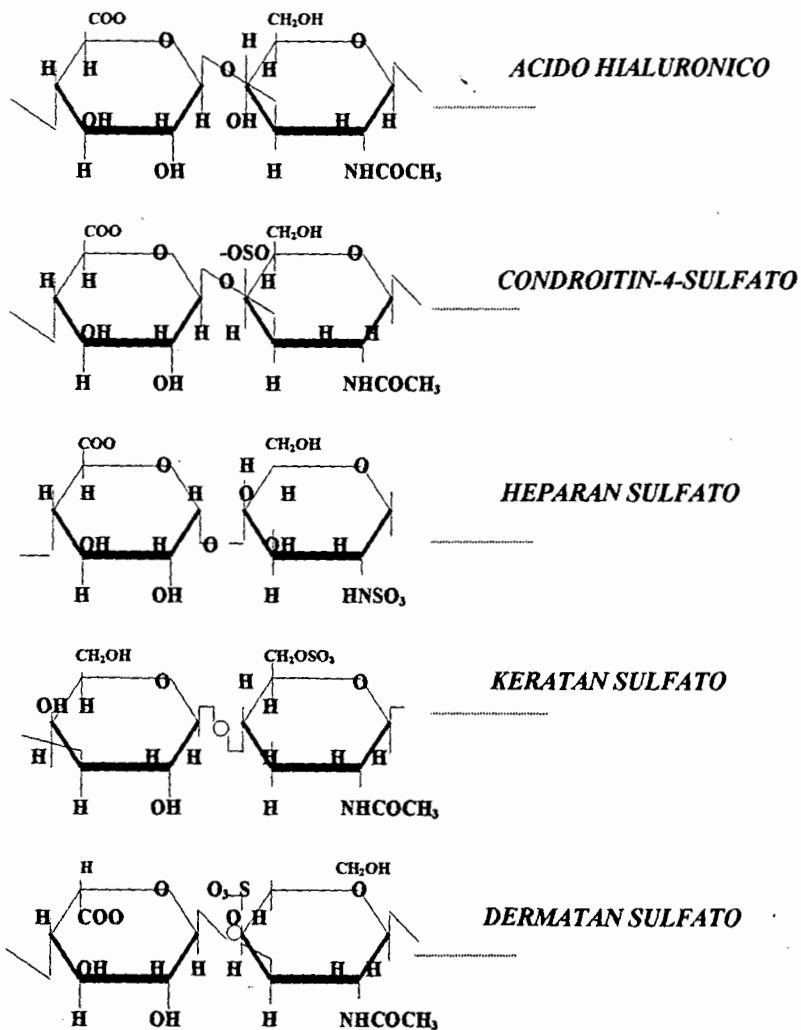


Tabla II

DISTRIBUCION Y COMPOSICION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS

NOMBRE	AMINO-AZUCAR	ACIDO URONICO	SULFATO	URONICO	ENLACE HEXOSA-MINIDICO	ENLACE A PROTEINA	LOCALIZACION
Acido hialurónico	N-acetil glucosamina	Acido-D glucurónico		β 1-3	β 1-4		Humor vitreo Líquido sinovial Cordón umbilical Piel
Condroitín 4 sulfato	N-acetil galactosamina	Acido-D glucurónico	O-SO ₄	β 1-3	β 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Cartilago Hueso Aorta
Condroitín 6 sulfato	N-acetil galactosamina	Acido-D glucurónico	O-SO ₄	β 1-3	β 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Cartilago Hueso Válvulas del corazón Sangre
Dermatán sulfato	N-acetil galactosamina	Acido-L idurónico Acido-D glucurónico	O-SO ₄ N-SO ₄	α 1-3	β 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Piel Válvulas del corazón Pulmón Tendón
Heparán sulfato	N-acetil glucosamina	Acido-D glucurónico ó Acido-L idurónico	N-SO ₄ O-SO ₄	β 1-4 α 1-4	α 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Aorta Higado Pulmón
Heparina	N-acetil glucosamina	Acido-D glucurónico ó Acido-L idurónico	N-SO ₄ O-SO ₄	β 1-4 α 1-4	α 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Mastocitos
Keratán Sulfato	(I) N-acetil glucosamina (II) N-acetil galactosamina ó N-acetil glucosamina	Galactosa Galactosa	O-SO ₄ O-SO ₄	β 1-4 β 1-4	β 1-3 β 1-3	N-acetil glucosamina-Asp-NH N-acetil galactosamina-Ser N-acetil galactosamina-Thr	Córnea Núcleos pulposos

Gal: Galactosa

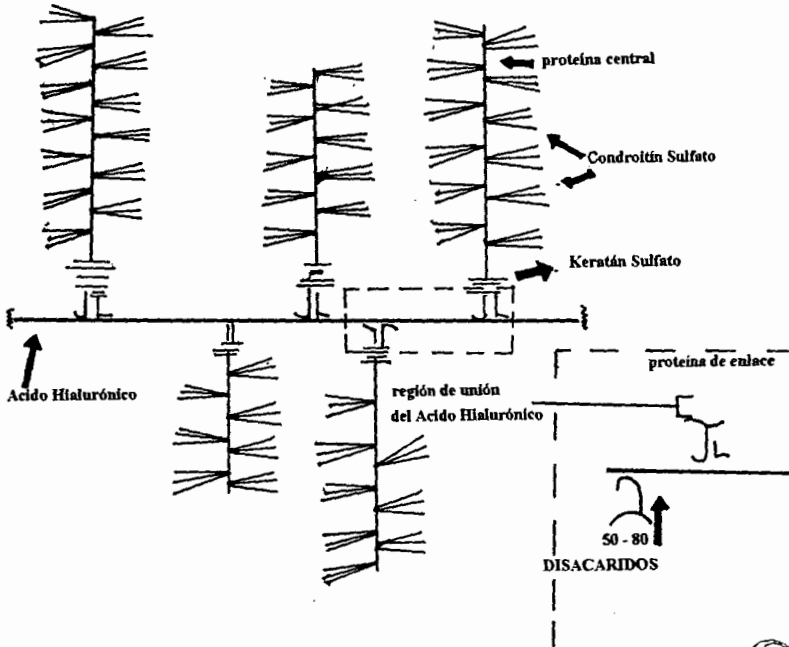
Xil: Xilosa

Ser: Serina

Asp: Acido Aspártico

Thr: Treonina

Figura II



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Figura III

BIBLIOTECA CENTRAL

DEGRADACION DE LOS GAGs EN LOS LISOSOMAS DE LA CELULA

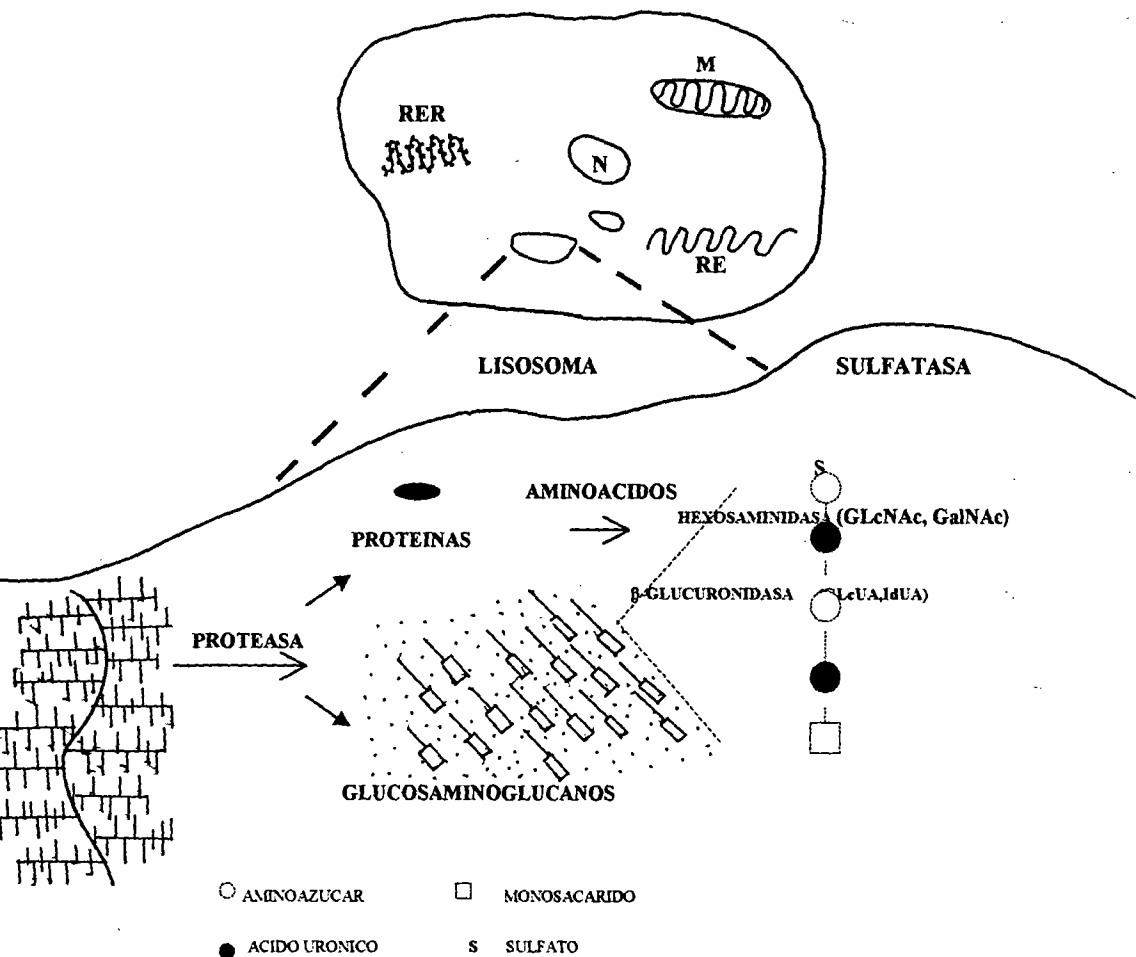


Figura IV

a) DEGRADACION DEL KERATAN SULFATO

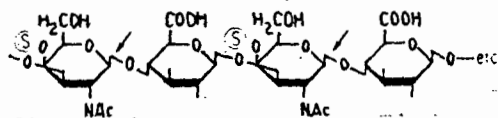
ENZIMA:	FUNCION:	DEFICIENTE EN:
galactosa-6-sulfatasa	Remueve los grupos sulfato de la galactosa	MPS IV A
β -galactosidasa	Remueve residuos de galactosa	MPS IV B
N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa	Remueve los grupos sulfato de la N-acetil glucosamina	MPS III D
β -hexosaminidasa A y B	Remueve los residuos de la N-acetil glucosamina, los cuales son catalizados por la isoenzima A ó B	GM2 A y B Sandhoff Tay Sachs
	Remueve la N-acetil glucosamina-6-sulfato.	GM2 A y B Tay Sachs
VIA ALTERNA		
β .hexosaminidasa A	Remueve los residuos de la N-acetilglucosamina	

MPS III D: Mucopolisacaridosis tipo II D.
MPS IV A: Mucopolisacaridosis tipo IV A.
MPS IV B: Mucopolisacaridosis tipo IV B.

GM2 A: Gangliosidosis tipo 2, subtipo A.
GM2 B: Gangliosidosis tipo 2, subtipo B.

b) DEGRADACION DE CONDROITIN SULFATO

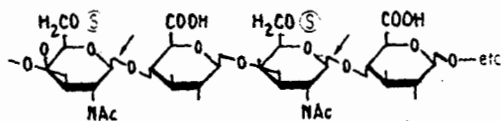
ENZIMA:	FUNCION:	DEFICIENTE EN:
---------	----------	----------------



N-acetil-galactosa-6-sulfatasa

Remueve los grupos sulfato de la posición 6 de la N acetil galactosamina

MPS IV A



N-acetil galactosamina 4-sulfatasa (arilsulfatasa B)

Remueve los grupos sulfato de la posición 4 de la N-acetil galactosamina.

MPS VI

MPS IV A: Mucopolisacaridosis tipo IV A.

MPS VI: Mucopolisacaridosis tipo VI.

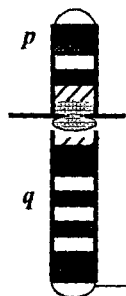
Figura V

GEN GALNS

CUCPA

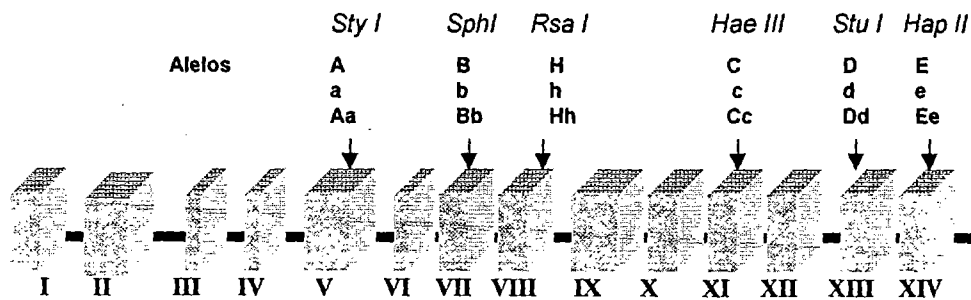
BIBLIOTECA CENTRAL

Cromosoma 16



24.3

POLIMORFISMOS



II.- ANTECEDENTES

CONTEXTO HISTORICO

El primer caso de MPS IV fue descrito por un grupo franco-canadiense en base a fotografías clínicas tomadas por Osler en 1897. Morquio en 1929 observó en 4 miembros de una familia de suecos opacidad corneal, enfermedad valvular aortica y excreción de KS. Entre 1929 y 1959, una variedad de desordenes esqueléticos fueron atribuidos a esta categoría.

Greenberg, Gadbois y McKusick de 1968 a 1973 identificaron 49 casos de síndrome de Morquio (a partir de 28 familias) en la provincia de Quebec. Hussels y McKusick en 1974 describen el caso de una mujer afectada con dos niños normales. Matalon en el mismo año concluye que la deficiencia enzimática involucrada es la enzima 6 sulfatasa, que degrada los residuos de KS y Ch-6-S. Levin en 1975 describió las anomalías orales en 12 casos, los dientes maxilares anteriores eran espaciosos y extendidos, los posteriores disminuidos con forma punteada. El esmalte tenía la dureza normal, pero algunos pacientes presentaban orificios. El paladar era ancho y plano. Holzgreve en 1981, describe la existencia de la forma leve en MPS IV A. Beck en 1986 sugiere que hay formas severas, intermedias y leves y una misma enzima deficiente (N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa). Al mismo tiempo propone la división de MPS IV A en 3 sub-grupos: clásica, intermedia y leve. Cahane en 1990, Reporta la frecuencia relativa de 1 en 216,412 nacidos vivos en Columbia Británica. Beck en 1992, realizó un diagnóstico de MPS IV A en un paciente de 23 semanas de gestación. El ultrasonido mostró ascitis moderada y el keratan sulfato estuvo presente en líquido amniótico. El diagnóstico fue confirmado después del término de embarazo. Tomatsu en 1991, clonó y secuenció el ADNc a partir de placenta humana del gen GALNS, al realizar un estudio comparativo con diferentes sulfatasas la secuencia de amino ácidos mostró un alto grado de homología con otras sulfatasas tales como Arisulfatasas humanas A,B y C, e iduronato-2-sulfatasa. Tomatsu en 1992, identificó 4 mutaciones exónicas en el ADNc de cuatro pacientes con forma severa del síndrome de Morquio. también demostró la localización del gen en el cromosoma 16q24.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El grado de información que ofrece un polimorfismo específico varía de acuerdo con la población estudiada, razón por la cual nos interesa conocer la frecuencia de los polimorfismos intragénicos *Rsa I* y *Hae III* del gen GALNS en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A de origen Mexicano. Tomando como base aquellos marcadores con mayor informatividad en otras poblaciones.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

IV.- OBJETIVOS

UNIVERSIDAD



BIBLIOTECA CENTRAL

General

Determinar la frecuencia de los polimorfismos intragénicos *Rsa I* y *Hae III* en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A en población mexicana.

Particular

Comparar las frecuencias de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* en sujetos sanos y pacientes con MPS IV A de la población mexicana con las frecuencias reportadas en otras dos poblaciones.

V.-HIPOTESIS

Las frecuencias de los polimorfismos intragénicos *Rsa I* y *Hae III* del gen GALNS en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A mexicanos son diferentes a los reportados en la población japonesa y caucásica.

VI.- MATERIAL Y METODOS

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Se colectaron muestras de sangre periférica a partir de 102 sujetos sanos para los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* (60 fueron estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y 42 donadores del banco de sangre del CMNO) y 10 pacientes con diagnóstico de MPS IV A (provenientes de los Servicios del Hospital de Pediatría del CMNO, DIF, Hospital Civil y Secretaria de Salud y Bienestar Social). Ambos grupos fueron enviados al laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS

Al grupo de sujetos sanos y a los familiares de los pacientes con MPS IV A se les proporcionó información acerca del estudio; al grupo de médicos de los Hospitales participantes, una hoja para la captación de datos clínico-radiológicos del paciente con diagnóstico de MPS IV A.

En ambos grupos se realizó la extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre periférica (3-5 ml) por medio del método de Gustincich (14), se cuantificó y determinó la pureza del mismo (15) y por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) fueron amplificados dos exones del gen GALNS, el exón VIII que contiene el polimorfismo *Rsa I* y el exón XI que contiene el polimorfismo *Hae III* (8, 11).

a) Polimorfismo *Rsa I*

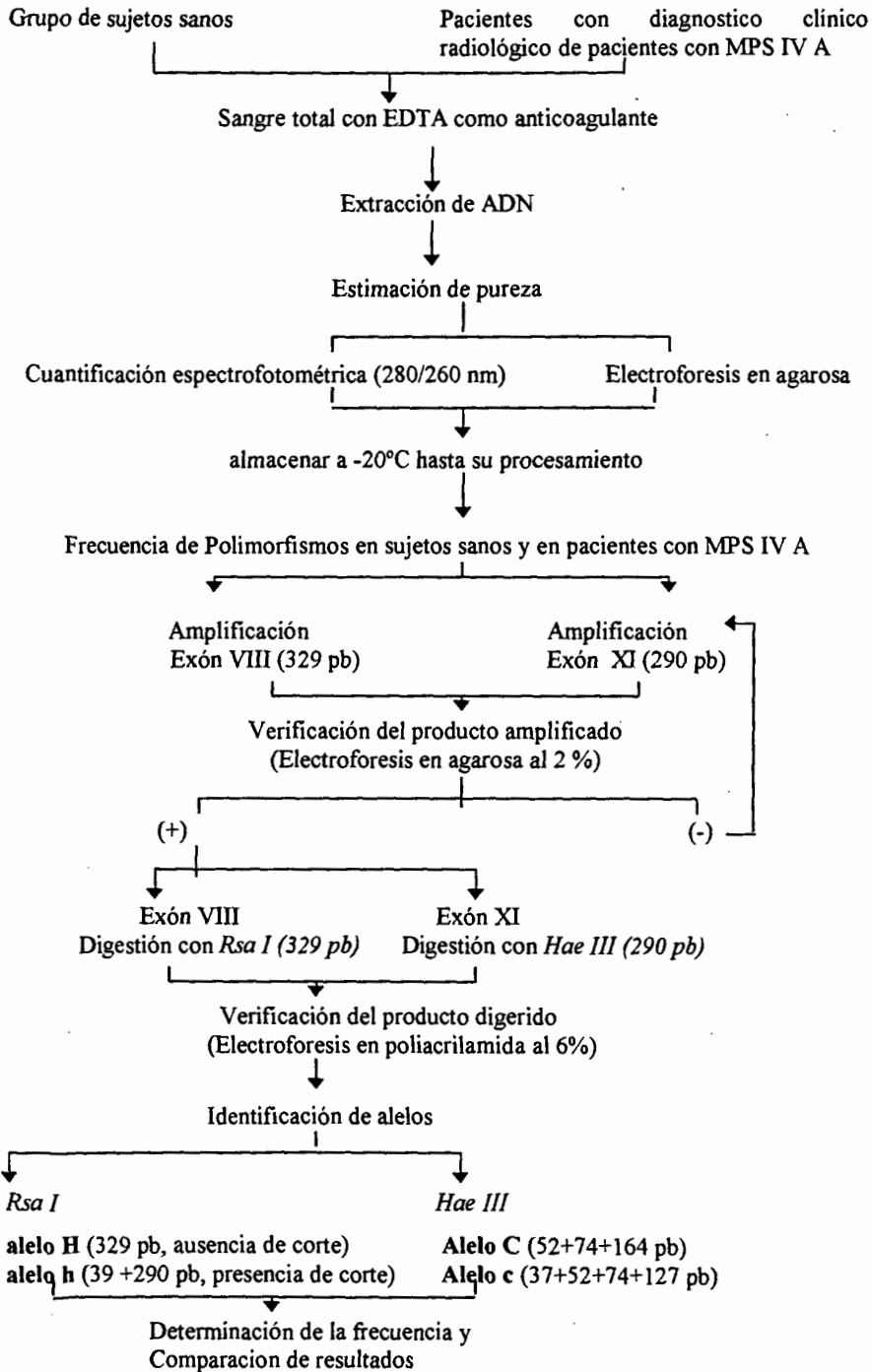
El segmento amplificado de 329 pares de bases (pb) para polimorfismo *Rsa I*, contiene un sitio de reconocimiento para la enzima *Rsa I*, originado por un cambio (transversion) de timina por citocina en el nucleótido 90 del exón VIII. Este sitio de reconocimiento produce fragmentos de 290 y 39 pb después de la digestión (8, 11, 15).

b) Polimorfismo *Hae III*

El producto de la RCP del exón XI fue un segmento de 290 pb, contiene varios sitios de reconocimiento para la enzima *Hae III*, cuya presencia resulta en fragmentos de 52 + 74 + 164 y 37 + 52 + 74 + 127 pb después de la digestión (8,11,15).

Los detalles Metodológicos se presentan en el anexo y una forma simplificada del procedimiento metodológico se presenta en el siguiente diagrama de flujo:

Diagrama de flujo



ANÁLISIS DE DATOS:

Para determinar la frecuencia de los polimorfismos intragénicos *Rsa I* y *Hae III* en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A, se estimó la frecuencia de los alelos por medio del método de conteo génico para calcular la heterocigocidad (16, 17), la ley de equilibrio de Hardy Weinberg y prueba exacta X^2 (18).

1.- Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas.

Las frecuencias genotípicas y alélicas se determinaron mediante el conteo del número de individuos perteneciente a un genotipo dado, para los polimorfismos *Rsa I* (*H* y *h*) y *Hae III* (*C* y *c*) se observaron 3 genotipos para cada polimorfismo:

Genotipo HH (homocigoto para la ausencia del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción) *.

Genotipo hh (homocigota para la presencia del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción) **.

Genotipo Hh (heterocigota con la presencia de ambos alelos) ***.

Genotipo CC (*).

Genotipo cc (**).

Genotipo Cc (***)

A partir del conteo de genotipos mediante una relación de porcentaje, se determinaron las frecuencias de los alelos para cada polimorfismo en la muestra total analizada

2.- Heterocigocidad de los marcadores.

La informatividad de cada polimorfismo fue determinada mediante el porcentaje de la heterocigocidad (H), donde $H = 2pq$ ($p =$ alelo *H* o *C*, $q =$ alelo *h* o *c*).

3.- Prueba exacta de X^2

Se realizó por medio de distintas comparaciones entre grupos, de acuerdo al programa RXC-MS.DOS: este programa se basa en el cálculo de probabilidades a partir de tablas de contingencia 2x2, aún cuando los valores sean muy

pequeños (menor a 5), este genera un mínimo de 1,000 pruebas al azar, con los valores observados y elaborará el análisis de X^2 , G-estadístico y el error estándar de las simulaciones. Para el presente estudio se establecieron 10,000 simulaciones, considerado como número altamente confiable. Los valores mayores a 0.05 indican que los datos tienen la probabilidad de ocurrir mayor al 5%, esto significa, que las diferencias son debidas al azar y los grupos comparados pueden considerarse semejantes.

4.- *Equilibrio de Hardy-Weinberg.*

Se compararon los genotipos observados y los esperados de ambos polimorfismos, verificando si existía equilibrio de Hardy-Weinberg.

VII.- RESULTADOS

Se analizaron un total de 204 cromosomas a partir del grupo de 102 sujetos sanos para ambos polimorfismos *Rsa I* y *Hae III*; y 20 cromosomas del grupo de 10 pacientes con diagnóstico de MPS IV A.

Se calcularon las frecuencias génicas de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* en la población mexicana y en el grupo de pacientes con MPS IV A, la distribución genotípica observada se comparó con la esperada de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg (los tres genotipos entre sí, los homocigotos contra los heterocigotos y la prueba exacta χ^2), así como, las frecuencias génicas de ambos polimorfismos contra los reportados en japoneses y caucásicos.

Se investigó la presencia de 4 alelos para los 2 polimorfismos, en ambos grupos de estudio (*figura VI a y b*).

El análisis de comparaciones entre las distintas poblaciones se realizó por medio de ensayos de χ^2 entre el total de los alelos de cada población para ambos polimorfismos.

FRECUENCIAS GENICAS

1.- Grupo de Individuos sanos

a) Polimorfismo *Rsa I*

36 individuos (72 cromosomas) resultaron homocigotos para el alelo H, 12 (24 cromosomas) para el alelo h y 54 heterocigotos para el alelo Hh (54 cromosomas H y 54 cromosomas h). La frecuencia génica fue de 0.62 para el alelo H y de 0.38 para el alelo h, y una heterocigocidad esperada de 0.47 (cuadro I).

b) Polimorfismo *Hae III*.

No se observó el genotipo homocigoto para el alelo C, 73 (146 cromosomas) individuos resultaron homocigotos para el alelo c y 29 (29 cromosomas para el alelo C y 29 cromosomas para el alelo c) heterocigotos para el alelo Cc. La frecuencia génica resultó de 0.14 para el alelo C, 0.86 para el alelo c y la heterocigocidad esperada fue de 0.24 (cuadro II).

c) Análisis de Hardy Weinberg

Al comparar las frecuencias alélicas observadas contra las esperadas en los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* mediante el análisis estadístico de χ^2 , se comprobó que ambos polimorfismos se encuentran en equilibrio de ligamiento en la población mexicana, al no demostrar diferencias estadísticamente significativas

2.- Grupo de pacientes

A partir de 10 pacientes con MPS IV A (20 cromosomas) fueron establecidas las frecuencias génicas de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* en el gen GALNS

a) polimorfismo *Rsa I*

3 fueron homocigotos para el alelo H (6 cromosomas), 5 heterocigotos para el alelo Hh (5 cromosomas H y 5 cromosomas h) y 2 homocigotos para el alelo h (4 cromosomas h). La frecuencia génica fue de 0.55 para el alelo H y 0.45 para el alelo h, con una heterocigocidad de 0.50 (cuadro III a y IV)

b) polimorfismo *Hae III*

No se observó el genotipo homocigoto para el alelo CC, 4 resultaron heterocigotos para el alelo Cc (4 cromosomas C y 4 cromosomas c) y 6 fueron homocigotos para el alelo cc (12 cromosomas c). La frecuencia génica para el alelo C fue de 0.20, para el alelo c fue de 0.80 y la heterocigocidad calculada de 0.32 (cuadro III b y IV)

c) Análisis de Hardy Weinberg

Al comparar las frecuencias alélicas observadas contra las esperadas en los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* mediante el análisis estadístico de X^2 , se comprobó que ambos polimorfismos se encuentran en equilibrio de ligamiento en el grupo de pacientes, al no demostrar diferencias estadísticamente significativas

COMPARACIONES ENTRE GRUPOS

1.- Población normal contra grupo de pacientes mexicanos

Al realizar el análisis estadístico de X^2 entre la población normal y los pacientes con MPS IV A mexicanos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos polimorfismos, lo que significa que están en equilibrio de ligamiento en ambos grupos.

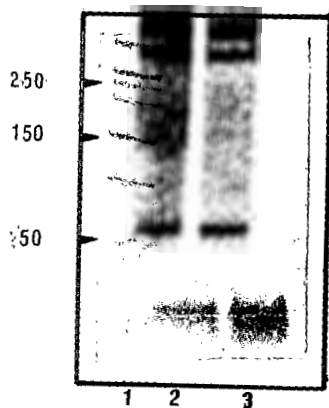
2.- comparación de frecuencias genéticas de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* entre la población normal mexicana, japonesa y caucásica.

Al comparar las frecuencias génicas de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* en la población normal mexicana con la población normal Japonesa y Caucásica, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la población japonesa y mexicana con una $p < 0.05$ para el polimorfismo *Rsa I* y la población caucásica contra la mexicana, resultaron semejantes al no encontrar diferencias estadísticamente significativas para el polimorfismo *Rsa I*. Para el polimorfismo *Hae III* la comparación

entre las tres poblaciones no mostró diferencias estadísticamente significativas. Lo que significa que son poblaciones semejantes en este polimorfismo (*Cuadro V*).

3.- comparación de frecuencias génicas de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* entre pacientes mexicanos contra japoneses y caucásicos.

Al comparar los pacientes con MPS IV A mexicanos contra japoneses, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ambos polimorfismos.

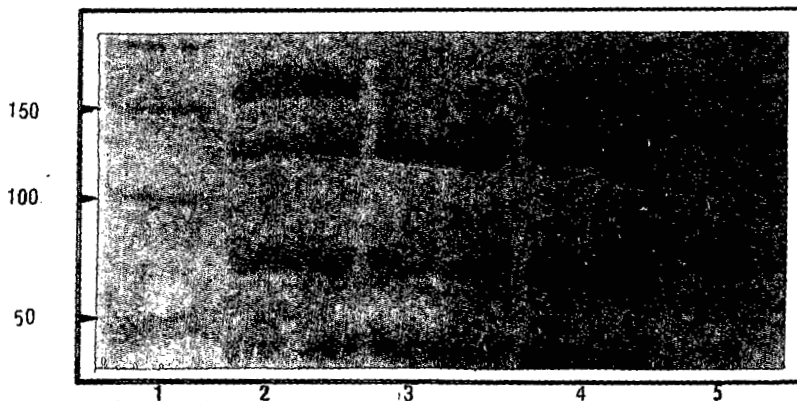
Figura VI**a) POLIMORFISMO *Rsa I***

1.- Marcador de peso molecular 50 pb

2 y 3.- Heterocigotos: Hh

H = 390 pb

h = 39 + 290 pb

b) POLIMORFISMO *Hae III*

1.- Marcador de peso molecular 50 pb

2 y 4.- Heterocigotos (Cc)

3 y 5.- Homocigotos (cc)

C = 52 + 74 + 164 pb

c = 37 + 52 + 74 + 127 pb

Cuadro I**Frecuencia del polimorfismo *Rsa I* en población normal mexicana**

Tipo	Genotipos				Alelos			
	Observados		Esperados		Número		Frecuencia	
	número	frecuencia	número	frecuencia	H	h	H	h
HH	36	0.35	39	0.38	72	0	0.62 ^(126/204)	----
hh	12	0.12	15	0.15	0	24	----	0.38 ^(78/204)
Hh	54	0.53	48	0.47	54	54		
Total	102	1.00	102	1.00	126	78		1.00

$$\text{Heterocigidad } (2pq; p=\text{alelo H}, q=\text{alelo h}: 2(0.62)(0.38)= 0.47)$$

alelo H = 329 pb

alelo h = 290 +39 pb

Cuadro II**Frecuencia del polimorfismo *Hae III* en población normal mexicana**

Tipo	Genotipos				Alelos			
	Observados		Esperados		Número		Frecuencia	
	número	frecuencia	número	frecuencia	C	c	C	c
CC	0	0.0	2	0.02	0	0	0.14 ^(29/204)	----
cc	73	0.72	75	0.74	0	146	----	0.86 ^(175/204)
Cc	29	0.28	25	0.24	29	29		
Total	102	1.00	102	1.00	29	175		1.00

$$\text{Heterocigidad } (2pq; p=\text{alelo H}, q=\text{alelo h}: 2(0.14)(0.86)= 0.24)$$

alelo C = 52 + 74 +164 pb

alelo c = 37 + 52 + 74 +127 pb

Cuadro III

Frecuencia de los polimorfismos *Rsa I* y *Hae III* en pacientes con MPS IV A mexicanosa) *Rsa I*

Genotipos					Alelos			
Tipo	Observados		Esperados		Número		Frecuencia	
	número	frecuencia	número	frecuencia	H	h	H	h
HH	3	0.30	3	0.30	6	0	0.55 ^(11/20)	---
hh	2	0.20	2	0.20	0	4	---	0.45 ^(9/20)
Hh	5	0.50	5	0.50	5	5		
Total	10	1.00	10	1.00	11	9		1.00
<i>Heterocigocidad (2pq; p=alelo H, q=alelo h)</i>					<i>2(0.55)(0.45)</i>		0.50	

alelo H = 329 pb

alelo h = 290 +39 pb

b) *Hae III*

Genotipos					Alelos			
Tipo	Observados		Esperados		Número		Frecuencia	
	número	frecuencia	número	frecuencia	C	c	C	c
CC	0	0.00	0	0.00	0	0	0.20 ^(4/20)	---
cc	6	0.60	8	0.81	0	12	---	0.80 ^(16/20)
Cc	4	0.40	2	0.19	4	4		
Total	10	1.00	10	1.00	4	16		1.00
<i>Heterocigocidad (2pq; p=alelo H, q=alelo h)</i>					<i>2(0.20)(0.80)</i>		0.32	

alelo C = 52 + 74 +164 pb

alelo c = 37 + 52 + 74 +127 pb

Cuadro IV

Genotipos individuales en pacientes con MPS IV A

1.- HH/cc	6.- Hh/Cc
2.- HH/cc	7.- Hh/Cc
3.- Hh/cc	8.- hh/cc
4.- Hh/cc	9.- HH/Cc
5.- hhCc	10.- Hh/cc

1-10 pacientes con MPS IV A mexicanos, haplotipos de los polimorfismos RsaI y Hae III

Cuadro V

Comparación entre las frecuencias de los polimorfismos Rsa I y Hae III entre la población Mexicana, Caucásica y Japonesa.

Polimorfismo	Mexicanos			Caucásicos vs Mexicanos			Japoneses vs Mexicanos			
	Normales	MPS IVA	X^2	P	Normales	X^2	P	Normales	X^2	P
<i>Rsa I</i>										
Alelo H	0.62	0.55	0.0000	n.s.	0.64	0.1431	n.s.	0.35	19.296	<0.05
Alelo h	0.38	0.45			0.36			0.65		
H	0.47	0.50			0.46			0.46		
<i>Hae III</i>										
Alelo C	0.14	0.20	0.0000	n.s.	0.10	0.2823	n.s.	0.12	0.2823	n.s.
Alelo c	0.86	0.80			0.90			0.88		
H	0.24	0.32			0.18			0.21		

H = heterocigocidad
n.s. = no significativo

VIII.- D I S C U S I O N

- El presente estudio nos ha permitido sentar las bases para definir una estrategia diagnóstica en nuestra población. Así la combinación de los 2 sitios polimórficos, intragénicos detectados de manera sencilla por enzimas de restricción en el gen GALNS proveen una poderosa herramienta para el análisis de genotipos en MPS IV A, así como para el análisis de ligamiento. Estos RFLPs también pueden utilizarse para la detección de portadores y diagnóstico prenatal en familias informativas cuya mutación específica no haya sido aún identificada.

- El análisis de comparación entre la población normal contra los pacientes con MPS IV A mexicanos no mostró diferencias estadísticamente significativas. Esta falta de significancia entre los dos grupos de estudios probablemente se debe al tamaño de la muestra, que no refleja la variabilidad genética de la población mexicana, aunque las muestras de ambos grupos fueran colectadas al azar como representativas de la población general.

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los resultados reportados para la población normal y pacientes con MPS IV A Japonés (8).

- Los marcadores intragénicos constituyen una herramienta muy importante para la definición del surgimiento de nuevas mutaciones, por ello es necesario realizar un estudio de otros polimorfismos (Sty I, Sph I, Stu I y Hap II) intragénicos en GALNS, así como realizar el análisis de segregación de haplotipos en población normal y en pacientes con MPS IV A, ya que por medio de los haplotipos se puede determinar el origen independiente de la mutación o de algún ancestro común, lo que además permitirá identificar las diferencias étnicas entre las poblaciones, como lo indican nuestros resultados al realizar el análisis comparativo con respecto a la población japonesa y caucásica.

- Los pacientes mexicanos con mucopolisacaridosis tipo IV A mostraron la misma segregación de los alelos H y c, de los polimorfismos Rsa I y Hae III en el gen de GALNS compados con los pacientes japoneses, lo que sugiere, que probablemente hay un origen común de mutaciones en MPS IV A.
- Las diferencias observadas al comparar las frecuencias del polimorfismo Rsa I (alelo H, h) de la población normal mexicana con la población normal japonesa, es una evidencia de la necesidad de contar con descripciones poblacionales, además apoyan la hipótesis de la heterogeneidad en MPS IV A, que resulta en diferentes tipos de mutaciones originadas independientemente en diferentes poblaciones.
- Nuestros resultados muestran que estos polimorfismos son promisorios en el diagnóstico de pacientes con MPS IV A, por lo que próximamente serán aplicados en familias afectadas en nuestra población. En este sentido, este trabajo representa un avance considerable respecto al enfoque diagnóstico utilizado por otros grupos en nuestro País, que utilizan solamente pruebas bioquímicas como la cuantificación de glucosaminoglucanos urinarios para la identificación de este tipo de pacientes.



IX.- CONCLUSIONES

- Se establecieron los polimorfismos intragénicos Rsa I y Hae III del gen GALNS en población normal y en pacientes mucopolisacaridosis tipo IV A, Mexicanos, así como la descripción de su frecuencia.
- Las diferencias en cuanto a frecuencias del polimorfismo Rsa I (alelo H, h) observadas al comparar la población normal mexicana y Japonesa, ejemplifica la necesidad de contar con descripciones poblacionales propias.
- Se comprobó la utilidad del polimorfismo Rsa I en el gen GALNS en nuestra población con una heterocigocidad del 47 % en población normal y del 50% en pacientes con MPS IV A.
- El polimorfismo Hae III mostró una heterocigocidad del 24% en la población normal, y en pacientes con MPS IVA del 32 %, lo que nos indica que este polimorfismo es medianamente informativo por si solo, por lo que existe la necesidad de realizar los otros polimorfismos (Sty I, Sph I, Stu I y Hap II) descritos en el gen GALNS, para observar si en combinación con otros alelos nos muestra su informatividad.
- Tomatsu y cols. en 1995 observaron gran incidencia de los alelos H y c de los polimorfismo Rsa I y Hae III respectivamente en el gen de GALNS en pacientes japoneses con mucopolisacaridosis tipo IV A, e hipotetizan que existen alelos principales asociados a algún tipo de mutaciones presente en dicho gen en este tipo de pacientes. Datos que fueron corroborados en el presente estudio en pacientes mexicanos con MPS IV A, al observar también la segregación del alelo A y B en la mayoría de los pacientes.
- La evaluación de las frecuencias alélicas para ambos polimorfismos en este estudio y en el descrito previamente por Tomatsu permiten concluir que su heterocigocidad (H) es suficiente para estudios de ligamiento en familias con mucopolisacaridosis tipo IV A.
- Es necesario analizar las frecuencias génicas de otros polimorfismos intragénicos en el gen GALNS, así como establecer la segregación de

haplotipos, con el fin de incrementar la utilidad diagnóstica (en pacientes con MPS IV A) de los marcadores intragénicos.

- Además estos polimorfismos son de gran utilidad como marcador poblacional para pruebas de paternidad y diagnóstico forense.
- Esta estrategia es sumamente valiosa, ya que es una técnica fácil, rápida, confiable de amplia aplicabilidad para estudios poblacionales y de análisis del origen de nuevas mutaciones.
- La detección y caracterización de diferentes polimorfismos en sujetos sanos de diferentes grupos étnicos muestra la heterogeneidad genética en el gen GALNS, provee medios para el diagnóstico prenatal y detección de portadores en familias con miembros afectados cuya mutación no ha sido identificada.

CUBA



BIBLIOTECA CENTRAL

X.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mucopolysaccharidoses type I. PC - GDB and OMIM, Genetic Disease Data/The Johns Hopkins University, Cedars-Sinai Medical Center/UCLA, Jackson Labs Informatics. 1995.
- 2.- Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, de. The Metabolic Basis of Inherited Diseases, 7th de. McGraw-Hill, New York 1995, pp 2465-2494.
- 3.- McKusick VA, Neufeld EF. Mendelian Inheritance in Man. 10 de. Baltimore, The Johns Hopkins, University Press, 1992.
- 4.- Sierra JJ, Villaseñor ZJ. Criterios diagnósticos y terapéuticos en las mucopolisacaridosis. Criterios Pediátricos, 1988; 4: 25 - 28.
- 5.- Tomatsu S, Fukuda, Cooper A, Wraith JE, Rezvi GM, Yamagishi A, Yamada N, Kato Z, Isagai K, Sukegawa K, Kondo N, Shuzuki Y, Shimoshawa N, Orii T. Mucopolysaccharidoses IV A: Identification of six novel mutations among non-Japanese patients. Hum Mol Genet, 1995, 4:741-743.
- 6.- Masuno M, Tomatsu S, Nakashima Y, Fukuda S, Masue M, Sukegawa K, Orii T. Mucopolysaccharidoses IV A: Assignment of the human n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene to chromosome 16q24. Genomics, 1993, 16:777-778.
- 7.- Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A, Wraith JE, Yamagishi A, Kato Z, Yamada N, Isagai K, Sukegawa K, Shuzuki Y, Shimoshawa N, Kondo N, Orii T. Fifteen polymorphisms in the N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene: diagnostic implication in Morquio disease. Hum Mut., 1996, (en prensa).
- 8.- Iwata H, Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, Rezvi GM, Ogawa T, Hori T, Nakashima Y, Yamagishi A, Sukegawa K, Shimoshawa N, Shuzuki Y, Kondo N, Orii T. Mucopolysaccharidoses IV A: polymorphic haplotypes and informative RFLPs in the Japanese population. Hum Genet, 1995, 95:257-264.

- 9.- Tomatsu S, Fukuda S, Iwata H, Ogawa T, Sukegawa K, Orii T. Polymorphism in the GALNS gene. 1994b, *Hum Mol Genet*, 3:1208.
- 10.- Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, Hori T, Nakashima Y, Sukegawa K, Kondo N, Orii T. Polymerase reaction detection of two novel human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS), gene polymorphisms by single strand conformation polymorphisms analysis or by Sty and Stu I cleavages. 1995e, *Hum Genet* 95:234-244.
- 11.- Rezvi GM, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Cooper A, Wraith JE, Iwata H, Kato Z, Yamada N, Sukegawa K, Shimoshawa N, Shuzuki Y, Kondo N, Orii T. Mucopolysaccharidoses IV A: a comparative study of polymorphic DNA haplotypes in the Caucasian and Japanese populations. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1996, 19: 301-308.
- 12.- Thompson and Thompson. *Genetics in Medicine*. Fifth edition, Saunders company, Philadelphia, 1991.
- 13.- Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 1985 69: 201-205
- 14.- Gustincich S, Carmici O, Del Sal G, Mamfiolelli G, Schneider C. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 1991; 11, 744.
- 15.- Sambrook J.: *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor. New York. 1989.
- 16.- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992, 48:361-372
- 17.- Chakraborty R, Jin L, Zhong Y, Budowle B. Nondetectability of restriction fragments and tests of independence of alleles within and between VNTR loci scored by RFLP analysis. *Am J Hum Genet* 1993, 53(Suppl):785.

- 18.- Roff DA, Bentzen P. The satatistical analysis of mitochondrial DNA polymorphism: X^2 and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol* 1989, 6:539-545.
- 19.- Sanguinetti C, Dias NE, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery PCR products separate on polyacrilamide gels. 1994, *BioTechniques* 17:915-918.

CUCBA



ORGANIZACION CENTRAL

ANEXO

EXTRACCION DE ADN GENOMICO

Existen diferentes protocolos para la extracción del ADN genómico. La mayoría se caracterizan por el empleo de detergentes y solventes orgánicos que lisan los núcleos de las células y eliminan las proteínas adheridas al ADN, seguidos por la precipitación de este con sales y alcoholes (15).

Micrométodo de extracción de ADN por CTAB/DTAB:

Método rápido de extracción de ADN partiendo de poco material biológico. Descrito por Gustincich en 1991, se basa en el empleo de dos detergentes, Bromuro de dodecil trimetil amonio (DTAB) y el bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB). El DTAB lisa las células blanco y el CTAB detergente catiónico se une al ADN para precipitarlo (14).

Procedimiento:

- Tomar 300 µl de sangre periférica con EDTA al 10 % como anticoagulante y colocarla en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Añadir 600 µl de buffer de lisis DTAB.
- Incubar durante 5 min. a 65°C.
- Retirar el tubo de la incubación e inmediatamente añadir 900 µl de cloroformo, tapar bien el tubo y agitar vigorosamente durante 5 min.
- Centrifugar 10 min a 14,000 rpm. En esta etapa se formaran tres capas: La capa inferior corresponde al cloroformo, la capa intermedia corresponde a la lisis celular y en la capa superior acuosa se encuentra el ADN.
- Transferir a un tubo nuevo, la capa superior acuosa con una pipeta de punta estéril (cuidadosamente).
- Adicionar 100 µl de CTAB y 1000 µl de agua inyectable y agitar suavemente.
- En este paso se pueden refrigerar los tubos a 4°C durante 5 min. para agilizar la precipitación del ADN (paso opcional).
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- Desechar el sobrenadante y recuperar el botón de ADN, añadir 100 µl de NaCl 1.2 M más 1 ml de etanol absoluto frío.
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado, añadir 1000 µl de etanol al 70%,
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante.
- Repetir este paso 3 veces.
- Eliminar completamente el etanol.

- Resuspender el ADN en buffer TE, agitar suavemente y refrigerar a 4°C hasta su procesamiento.

Preparación de Soluciones:

Buffer de Lisis DTAB

DTAB	8%	(8g/0.1L)
Tris (PM 121.1 g)	0.1 M, pH8.6	(1.21g/0.1L)
NaCl (PM 58.44 g)	1.2 M	(7g/0.1L)
EDTA (PM 372.2g)	0.5 M	(1.86g/0.1L)

Disolver el Tris y ajustar a pH de 8.6 con HCl, en $\frac{1}{4}$ del volumen final, adicional el DTAB, el NaCl y esterilizar en autoclave.

Buffer CTAB

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

Disolver ambas sales en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

Solución NaCl 1.2 M

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

Disolver la sal en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

Buffer TE

Tris (PM 121.1 g)	0.01 M, pH8	(0.121g/0.1L)
EDTA (PM 372.2g)	0.001 M	(0.0186g/0.1L)

Disolver el Tris y ajustar a pH de 8 con HCl, en $\frac{1}{4}$ del volumen final, adicional el EDTA y esterilizar en autoclave (14).

CUANTIFICACION DE ADN.

Para estimar la cantidad del ADN genómico y verificar su pureza se determina la densidad óptica a 260 nm y 280 nm por medio de un espectrofotómetro. Una relación de densidad óptica 260/280 nm mayor de 2.0 indica que el ADN tiene una pureza adecuada; mientras que si es menor de 2.0, se debe de considerar contaminación de la muestra, principalmente por sales o proteínas (15).

Procedimiento:

- Colocar 5 μ l de la muestra de ADN en una celda de cuarzo conteniendo 1 ml de agua destilada, mezclar suavemente y leer a 260 y 280 nm.
- Mediante la aplicación de la siguiente fórmula se determina la concentración del ADN:

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

* 50 es el coeficiente de extinción molar de 50 ng/ml de ADN que tienen la máxima absorbancia de 1.0 unidad de D.O. a 260 nm.

- Para determinar la pureza del ADN, se aplica la relación D.O.260 nm/D.O. 280 nm que debe ser de 2.0 en adelante para considerarse satisfactoria, cuando esta relación no es mayor a 2.0, se procede a limpiar el ADN, precipitándolo nuevamente mediante la adición de un volumen de etanol al 100% (frío), seguida la centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min y posteriormente la adición de un volumen de etanol al 70% para eliminar el resto de sales adheridas al ADN (15).

VERIFICACION DEL ADN.

La electroforesis a través de geles de agarosa o poliacrilamida es un método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, por lo que es un método alterno para determinar su integridad. En el corrimiento electroforético se utiliza como control una muestra de ADN de concentración conocida, la presencia en el gel de una banda nítida es indicativo de que el ADN aislado tiene una pureza adecuada, mientras que si se observa un barrido o un patrón de varias bandas indica contaminación por sales y degradación del ADN respectivamente (*figura IV*) (15).

Procedimiento:

- Aplicar 2 μ l de ADN genómico en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X.
- Mezclar la muestra de ADN con 3 μ l de jugo azul 6X.
- Utilizar TBE 1X como buffer de corrimiento con un voltaje constante (60V) durante 1hr 30 min. o hasta que el colorante con mayor peso molecular (xilencianol) haya migrado 3 cm a partir del punto de aplicación.
- Teñir el gel sumergiéndolo en solución***bromuro de etidio** 0.5 mg/ml durante 5 min, enjuagar y visualizar el ADN con un transiluminador de UV.

*El bromuro de etidio es un compuesto que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases del ADN, cuando éste se encuentra en doble cadena y fluoresce cuando incide en él luz ultravioleta. Estas propiedades son aprovechadas para la visualización de ADN que se ha sometido previamente a un corrimiento electroforético (15).

Preparación de Soluciones:

Gel de agarosa al 1%: Pesar la agarosa de acuerdo al volúmen del molde a utilizar, para una concentración del 1%, adicionar TBE 1X y fundir la agarosa con calor hasta observar una solución cristalina. Bajar la temperatura hasta 55°C y verter al molde evitando la formación de burbujas, reposar por lo menos 30 min a temperatura ambiente para que la agarosa pueda gelificar.

Buffer TBE 10X:

EDTA	(PM 372.2 g)	0.02 M	(40 ml de sol 5M/1L)
Tris base	(PM 121.1g)	0.89 M	(108.0g/1L)
Acido Bórico	(PM 61.844)	0.89 M	(55.04 g/1L)

Jugo Azul 6 X:

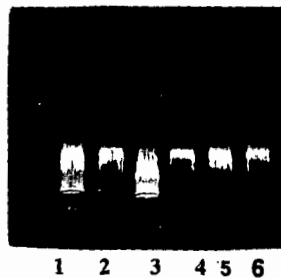
Azul de bromofenol	0.25% (25 mg/10 ml)
Xilencianol	0.25% (25mg/ 10 ml)
Glicerol	30% (3 ml/ 10ml)

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

Solución de Bromuro de Etidio: Para la tinción de los geles se prepara una solución stock (100X), a una concentración de 0.5 mg/ml disueltos en agua desmineralizada colocandolo en un frasco color ambar protegido de la luz. La solución de uso contiene 1 ml del stock por cada 100 ml de TBE 1X. El bromuro de etidio es un compuesto **CARCINOGENICO**, por lo que se debe de tener gran cuidado al utilizarlo, usando guantes y cubrebocas.

Figura IV

Electroforesis de ADN genómico



1 y 3 gran cantidad de ADN contaminado con sales
2, 4, 5 y 6 ADN aceptable.

POLIMORFISMOS *Rsa I* y *Hae III*

BIBLIOTECA CENTRAL

a) RCP

La RCP es un método de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, por medio del cual un segmento de ADN ó ARN específico, es amplificado, lo que permite el análisis de secuencias cortas a partir de cantidades muy pequeñas de ADN ó ARN sin necesidad de clonación (15). Esta metodología involucra: Taq polimerasa, enzima que sirve para sintetizar la cadena ADN complementaria al molde; Buffer para la enzima, como medio necesario para el funcionamiento de la enzima; cloruro de magnesio, catalizador de la enzima; dimucleótidos trifosfatados, (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); dos iniciadores, que flanquean el fragmento de ADN por ser amplificado; ADN genómico que sirve como molde y Agua para ajustar al volumen deseado. Así como ciclos repetidos de desnaturalización a 94°C con el fin de separar la doble cadena de ADN, Alineamiento a 60°C para que los iniciadores, una vez desnaturalizadas las cadenas de ADN puedan hibridar con sus secuencias complementarias y la Extensión, para que la enzima Taq ADN polimerasa copiera las cadenas de ADN por medio de la adición de los dinucleótidos trifosfatados correspondientes. El resultado fue la acumulación exponencial de fragmentos de ADN genómico específicos, aproximadamente 2^n , donde n es el número de ciclos de amplificación realizados (15).

Polimorfismo *Rsa I*

Se amplificó un segmento de 329 pb, que contiene el exón VIII del gen GALNS, mediante el uso de los iniciadores OMF 125 5'-GCCAGTTTCACTGTGGTCTGTGAAG-3' Y OMF126 5'-CACTCTCGCTGACACGCTGGCTGT-3'. Este fragmento presenta un sitio de corte para la enzima *Rsa I*, que resulta en fragmentos de 290 y 39 pb después de la digestión, denominado alelo h. Cuando la región amplificada no tiene el reconocimiento para el sitio de corte, se le reconoce como alelo H.

Polimorfismo *Hae III*

Para el polimorfismo *Hae III* en el exón XI del gen GALNS, se amplificó un segmento de 290 pb, mediante el uso de los iniciadores OMF 129 5'-GTAAAGTATCAACCAAGACCTCACG-3' Y OMF 130 5'-CTCAGGGCCACG TCTGATAGAGATC-3'. Este fragmento contiene un sitio de reconocimiento para la enzima *Hae III*, que resulta en fragmentos de 52 +74 +164 (alelo C) y 37 +52 +74 +127 pb (alelo c), después de la digestión.

Las condiciones de amplificación se presentan en el siguiente cuadro:

Reactivos	<i>Rsa I</i>		<i>Hae III</i>	
	Concentración final	Por tubo (μ l)	Concentración final	Por tubo (μ l)
Buffer 10X	1X	1.5	1X	1.5
Iniciador 1 (50pmol/ μ l)	0.5 pmol	0.36	0.5 pmol	0.36
Iniciador 2 (50pmol/ μ l)	0.5 pmol	0.36	0.5 pmol	0.36
dNTPs (10 mM)	200 μ M	0.3	200 μ M	0.3
MgCl ₂ (30 mM)	1.5 mM	0.75	1.5 mM	0.75
ADN templado(100ng/ μ l)	250 ng	2.0	250 ng	2.0
Agua	QBP	9.63	QBP	9.63
Taq polimerasa (5U/ μ l)	2.5 U	0.1	2.5 U	0.1
Aceite mineral	-----	1 gota	-----	1 gota
TOTAL		15 μ l		15 μ l

Una vez agregado el aceite mineral a cada tubo, fueron centrifugados 10 seg y sometidos al siguiente programa de amplificación:

Desnaturalización Inicial	10 min a 94°C	
Desnaturalización	60 seg a 94°C	} 40 ciclos
Alineamiento	60 seg a 60°C	
Extensión	60 seg a 72°C	
Extensión final	10 min a 72°C	

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Verificación de los productos amplificados.

Los fragmentos amplificados para ambos polimorfismos, fueron verificados en geles de agarosa al 2% (2 gr/100 ml) buffer TBE IX (15).

DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción hidrolizan el ADN de doble cadena en sitios específicos dentro ó adyacente a una secuencia particular, conocida como sitio de reconocimiento. Estas reconocen secuencias que tienen de 4 o más nucleótidos de longitud generalmente palindrómicas. Algunas hidrolizan la doble hebra de ADN exactamente

en el eje de simetría generando fragmentos con extremos romos, otras hidrolizan el ADN en sitios similares pero opuestos al eje de simetría, creando fragmentos con extremos pegajosos (8-11, 15).

Polimorfismo Rsa I

Procedimiento:

- Colocar 5 µl de producto amplificado del exón VIII en un tubo Ependorff (0.5 ml), 0.5 µl de enzima *Rsa I* (5 U), 2.5 µl de buffer de la enzima (10X) y 17.0 µl de agua, para una reacción final de 25 µl, centrifugar durante 8 seg y colocar los tubos a 37 °C durante 4 h.

POLIMORFISMO Hae III

Procedimiento:

- Colocar 5 µl de producto amplificado del exón XI en un tubo Ependorff (0.5 ml), 0.5 µl de enzima *Hae III* (5 U), 2.5 µl de buffer de la enzima (10X) y 17.0 µl de agua, para una reacción final de 25 µl, centrifugar 8 seg y colocar los tubos a 37 °C durante 4 h. (8-11, 15)

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DIGERIDOS

Los patrones de digestión de cada sitio polimórfico se obtuvieron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % (15).

a) Electroforesis:

Los ácidos nucleicos son compuestos polieléctricos, cargados negativamente por lo que se pueden separar por la acción de un campo eléctrico. La movilización de una molécula en un campo eléctrico depende de dos fuerzas, la de atracción y la de resistencia. La fuerza de atracción está en función del número de cargas por molécula, del signo de la carga neta, el grado de disociación según el pH, la magnitud del campo eléctrico y del tiempo de exposición a dicho campo. La resistencia que se opone a la movilidad de la molécula se relaciona con el tamaño y la forma de la molécula, la solubilidad de la misma y de las propiedades absorbentes del medio que sirve como vehículo (15).

b) Geles de poliacrilamida

La poliacrilamida en combinación con la *NN'*metilen-bis-acrilamida se polimerizan para producir un gel de matriz rígida e inerte, este gel actúa como un tamiz de moléculas de diferentes peso. La polimerización de los geles se lleva a cabo por la adición de catalizadores como el tetrametiletilendiamina (TEMED, 0.05% v/v) y el

persulfato de amonio (PSA, 0.05% a 1% p/v). La matriz del gel se encuentra directamente relacionada con la concentración de la acrilamida, de manera tal que al aumentar la concentración de acrilamida en forma gradual desde un 5% hasta un 12%, el tamaño del poro disminuye y las moléculas se desplazan lentamente (15).

Gel de poli(acrilamida) al 6 %

- Colocar en un matraz las siguientes soluciones: 7 ml de poli(acrilamida) -bis-acrilamida (29gr acrilamida: 1gr de bis-acrilamida en 100 ml de agua), 3.5 ml de buffer TBE 1X (10X), 29.9 ml de agua, 35 μ l de TEMED y 500 μ l de PSA (persulfato de amonio, 10%) agitar durante 10 seg, verter la solución en los moldes de vidrio para la formación del gel, cuidando de no formar burbujas, inmediatamente después colocar el peine para formar los pozos de aplicación, dejando polimerizar durante 30 min. Después de este tiempo se retira el peine con cuidado de no dañar el gel, el gel se lava a chorro de agua para retirar el resto de poli(acrilamida), Se monta en la cámara de electroforesis, realizando un precorrimiento de 20 minutos antes de aplicar las muestras.
- Mezclar 10 μ l de la muestra problema con 5 μ l de jugo azul, colocar cada una de las muestras en el gel y poner 2 μ l de marcador de peso molecular con el fin de tener una referencia (escalera de 50 pb) de nuestros productos amplificados.
- Correr a 150 V durante 3 horas en buffer TBE 1X, y teñirlo en solución de plata para identificar los diferentes alelos de los productos digeridos (15).

c) Tinción con nitrato de plata.

- Fijar el gel de poli(acrilamida), a través de la **SOLUCION FIJADORA** (etanol al 10 % y ácido acético al 0.5 %) durante 10 minutos.
- Eliminar la solución fijadora, (se debe tener cuidado de no tocar el gel con las manos) y adicionar la **SOLUCION DE TINCION** (nitrato de plata 0.2 % en solución fijadora, preparada al momento) durante 5 minutos.
- Eliminar la solución de tinción (no tocar el gel con la mano) y adicionar agua destilada para eliminar el resto de nitrato de plata, durante 2 minutos (agitar constantemente).
- Eliminar el agua y adicionar **SOLUCION REVELADORA** (hidróxido de sodio al 3%, formaldehído al 0.5 %), agitar constantemente hasta la aparición de las bandas (5 — 15 minutos).
- Eliminar la solución reveladora y enjuagar con agua corriente varias veces (tener cuidado de no tocar con las manos estas soluciones).
- Colocar el gel sobre un papel filtro de poro grueso, cubrir con plástico Saran-Wrape sólo por el lado del gel.
- Deshidratar el gel en un secador de geles durante 1 hora a 80°C (17).

Preparación de soluciones

SOLUCION FIJADORA

Etol absoluto al 10 % ----- 100 ml

Acido acético 0.5 % ----- 5 ml

Aforar a un litro con agua destilada,

SOLUCION DE NITRATO DE PLATA

Nitrato de plata 0.2 % ----- 0.2 gramos

Aforar con 100 ml de solución fijadora.

SOLUCION REVELADORA

Hidróxido de sodio 3 % ----- 30 gramos

Formaldehído al 0.5 % ----- 5 ml

Aforar a un litro con agua desmineralizada (19).

G L O S A R I O

Acido desoxirribonucleico (ADN): Material genético primario de todas las células. Polinucleótido que contiene como residuo de azúcar a desoxirribosa.

Acido ribonucleico (ARN): Polinucleótido en el que el residuo de azúcar es la ribosa, contiene Uracilo en lugar de Timina a diferencia del ADN.

Acido urónico: Polímero formado por unidades alternas de ácido glucurónico y N-acetil-D-glucosamina que predomina en el tejido conectivo.

Adenina: Base púrica que se une siempre a la timina por medio de dos puentes de hidrógeno en la doble hélice del ADN.

ADN complementario (ADNc): ADN sintetizado a partir de una copia de ARN templado por medio de la transcriptasa reversa.

ADN desnaturalizado: Propiedad que tiene el ADN de pasar de doble hélice a un estado lineal por la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen a las dos hebras complementarias.

Alelo: Forma alternativa de un gen. Cada uno con una secuencia de nucleótidos única, se reconocen generalmente por los fenotipos y por la comparación de la secuencia de nucleótidos, un simple alelo para cada locus es heredado separadamente de cada padre (ejemplo: en el locus para el color de ojos el alelo podría resultar en ojos color azul o café)

Alelo dominante: Rasgo correspondiente que se manifiesta en todos los heterocigotos.

Alelismo múltiple: Existencia de varios alelos conocidos de un gen.

Aminoácido: Compuesto orgánico que presenta un radical amino (-NH₂) y uno carboxilo -ácido- (-COOH), cualquier clase de las 20 moléculas que se combinan para formar las proteínas en un organismo. La secuencia de aminoácidos en una proteína y por consecuencia la función de la proteína son determinadas por el código genético.

Aminoazúcar: Constituyente del ácido hialurónico. Ejemplos: D-glucosamina, D-galactosamina, D-manosamina.

Amplificación: Producción de muchas copias a partir de una *muestra* de ADN. Incremento de la dosis de un gen específico al producir un número de copias sobre el ADN extracromosómico.

Autosómico: Cromosoma no sexual

Base nitrogenada: Clase de moléculas que forman parte importante de los ácidos nucleicos (A, C, G y T), constituidas por un anillo que contiene nitrógeno; son puentes de hidrógeno entre estas bases los que mantienen unidas las dos cadenas de una doble hélice de ADN.

Bialélico: Relacionado a dos alelos.

Bromuro de etidio: Molécula que puede intercalarse entre las bases cuando el ADN se encuentra en doble hélice y fluoresce al incidir sobre él un rayo de luz ultravioleta.

Catabolismo: Perteneciente a una reacción enzimática que lleva a la ruptura de una molécula biológica compleja en componentes simples, que puede dar energía en forma de ATP o para ser utilizados en reacciones anabólicas subsiguientes.

Catión: Ión cargado positivamente

Centrifugación: Técnica sencilla que permite separar moléculas afines.

Chi cuadrada (χ^2): Procedimiento estadístico que se emplea para determinar si las diferencias entre conjuntos de frecuencia observadas exceden a las que se esperaría por azar si los conjuntos se extrajeran de forma aleatoria de una población grande.

Clona: Grupo de células que descienden todas de una célula ancestral.

Codón: Secuencia de tres nucleótidos en el ADN o ARN que codifican para un aminoácido específico o para la terminación de la síntesis de un polipéptido.

Coefficiente de correlación: Medida estadística del grado de relación entre los distintos valores de dos variables.

Condrotín sulfato: Polímero formado por unidades alternas de ácido glucurónico y derivados sulfato de N-acetil-D-galactosamina, se encuentra en cartilago, tendón, hueso, estructuras válvulares, pared de vasos sanguíneos y saliva.

Cromosoma: Estructura filiforme localizada en el núcleo de la célula, que contiene los genes en una secuencia lineal; molécula completa de ADN que comprende el genoma de una célula procariótica; molécula de ADN en complejo con histonas u otras proteínas asociadas en las células eucarióticas. Estructura de replicación genética de las células que contiene la secuencia de nucleótidos y el rearrreglo lineal de genes.

Dermatán sulfato: Compuesto por unidades alternas de α -L-idurónico y L-N-acetil-D-galactosamina 4 sulfato, un constituyente orgánico de la sustancia fundamental amorfa del tejido conectivo.

Desequilibrio de ligamiento: Asociación no aleatoria de los alelos de diferentes loci en una población.

Desnaturalización: Separación de las dos cadenas de una hélice doble de ADN o alteración intensa de la estructura de cualquier molécula compleja sin rotura de los enlaces principales de su cadena.

Desviación estándar: La raíz cuadrada de la varianza.

Diversidad: Diferencia, variedad. Abundancia de cosas distintas.

Doble hélice: Estructura del ADN, propuesta por primera vez por Watson y Crick con dos hélices entrelazadas que se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno entre pares de bases.

Electroforesis: Técnica para separar dentro de un gel, mediante un campo eléctrico, los distintos componentes de una mezcla de moléculas (proteínas o moléculas de ADN o ARN).

Enzima: Moléculas de proteínas o complejos moleculares que catalizan reacciones bioquímicas.

Enzima de restricción: Endonucleasa que reconoce secuencias específicas de ADN. Endonucleasa que reconoce una secuencia de nucleótidos del ADN como *diana* específica y corta en esos puntos ambas cadenas de la doble hélice; existe un gran número de estas enzimas que son empleadas de manera rutinaria en ingeniería genética.

Equilibrio de Hardy-Weinberg: Distribución estabilizada de las frecuencias de los genotipos AA, Aa y aa en los valores respectivos p^2 , $2pq$ y q^2 (donde p y q son las frecuencias de los alelos A y a) consecuencia de los cruzamientos al azar, en ausencia de la mutación, migración, selección natural y deriva génica aleatoria.

Estadística: Parámetro cuantitativo característico de una población, como la media, por ejemplo.

Extremo cohesivo: Bandas sencillas y secuencias de nucleótidos de bases complementarias en los extremos opuestos de una molécula de ADN.

Exón: Cualquier tramo no intrónico de la secuencia codificadora de un gen; conjuntamente, los exones forman el ARNm y se traducen a proteína.

Fenotipo: Forma que toma un carácter o conjunto de caracteres. Manifestación externa observable de un genotipo concreto. Apariencia o propiedades observables de un organismo.

Frecuencia alélica: Medida de frecuencia de un alelo en una población; la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que son de un tipo concreto, (frecuencia génica). Se puede utilizar como índice de afinidades biológicas entre las poblaciones.

Gen: Unidad fundamental, física y funcional, de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente; tramo de ADN compuesto de una región que se transcribe o una secuencia reguladora que hace posible la transcripción. Unidad de función genética; puede especificar un polipéptido, una molécula de RNA o puede jugar un papel en la regulación de la actividad génica.

Gen estructural: Gen que codifica para un polipéptido o una molécula de ARN de transferencia o ribosomal.

Gen dominante: Comúnmente se describe con este término el gen que se expresa en un heterocigoto, pero más concreta al carácter que se expresa en la F1 cuando se cruzan dos cepas de descendencia pura que difieren únicamente por ese carácter.

Gen recesivo: Gen que solamente se expresa cuando es homocigoto (es decir aa).

Genética: El estudio de los genes a través de su variación. El estudio de la herencia.

Genética de la herencia: Estudio de los mecanismos implicados en el paso de un gen de una generación a la siguiente.

Genoma: Contenido génico de una célula u organismo.

Genotipo: Composición alélica específica de una célula, bien referida al total del genoma o más comúnmente a un gen o conjunto de genes.

Genética molecular: Estudio de los procesos moleculares que subyacen en la estructura y funcionamiento de los genes.

Glucosaminoglucanos: Grupo heterogéneo de polímeros lineales de elevado peso molecular, con más de 100 unidades monoméricas, están constituidos por unidades repetidas de dímeros, formados por aminoazúcar y ácido urónico.

Glucosidasas: Enzimas que proceden de diversas fuentes y con frecuencias son específicas de ciertos tipos de enlaces glucosídicos y también por su naturaleza anomérica.

Guanina: Base púrica que se une siempre a la citocina por medio de tres puentes de hidrógeno

Haploide: Organismo o célula que tiene un solo juego de cromosomas.

Haplotipo: Combinación cromosómica particular de alelos que se encuentran cercanamente ligados a un loci. Aún cuando pocos loci fueran polimórficos, el número posible de haplotipos es muy grande. Para un sistema de 10 sitios polimórficos en el ADN en un sistema de dos alelos es $2^{10} = 1024$ haplotipos. Las frecuencias de

cada haplotipo son comúnmente diferentes y no representan un simple producto de las frecuencias de los alelos debido al fuerte desequilibrio de ligamiento.

Heparán sulfato: Tipo de glucosaminoglucano, formado por unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido idurónico.

Herencia: Similitud biológica entre progenitores y descendientes

Heterocigocidad: Medida de la variabilidad genética de una población respecto a un locus concreto, se define como la proporción de heterocigotos para dicho locus.

Heterocigoto: Individuo con un par génico de alelos diferentes. Célula u organismo que tienen alelos diferentes de un gen en un par de cromosomas homólogos (ejemplo Aa).

Homocigoto: Individuo con un par génico de alelos idénticos. Célula u organismo que tiene alelos idénticos de un gen en un par de cromosomas homólogos (ejemplo AA o aa)

Intragénico: posición dentro de un gen

Intron: Secuencia no codificadora en el ADN que separa los exónes de un gen.

Keratán sulfato: Polímero formado por β -D-galactosa y N-acetil-D-galactosamina-4-sulfato, un constituyente orgánico de la sustancia fundamental extracelular del tejido conectivo.

Ligamiento: Los genes en el mismo cromosoma se dice que están encadenados o ligados a medida que tienden a ser heredados juntos. Agrupación de genes en un mismo cromosoma.

Loci: Posición de grupo de genes en un cromosoma.

Locus génico: Posición de un gen en un cromosoma.

Macromolécula: Polímero de un gran tamaño como ADN, una proteína o un polisacárido.

Marcadores genéticos: Alelos empleados como instrumento experimental para seguir la pista de un individuo, un tejido, una célula, un núcleo, un cromosoma o un gen.

Media: Media aritmética.

Medio ambiente: Conjunto de todas las condiciones externas al genoma que puede afectar su estructura y su expresión.

Metabolismo: Conjunto de reacciones químicas que se producen en una célula viva.

Molde: Plantilla que sirve para dar forma a la estructura o secuencia de otra molécula; ejemplo, la secuencia de nucleótidos del ADN actúa como molde en la síntesis de la secuencia de nucleótidos del ARN durante la transcripción.

Mucopolisacaridosis: Grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias originadas por la deficiencia de enzimas lisosomales.

Mucopolisacaridosis tipo IVA: Enfermedad hereditaria originada por la deficiencia de la enzima GALNS, se caracteriza por tener un amplio espectro de variabilidad clínica desde muy severa hasta la aparición casi normal de los dos fenotipos que se conocen.

Mutación: Cambio repentino heredable en el genotipo de un organismo.

Mutación Génica: Mutación puntual que resulta de cambios en estructura de un gen

Nucleótido: Nucleósido con un grupo fosfato unido.

Nucleósido: Una de las cuatro bases nitrogenadas unida a una molécula de ribosa o desoxirribosa.

Pirimidina: Cierta clase de bases nitrogenadas; en el ADN, las bases pirimidínicas son citocina y timina.

Poliacrilamida: Material utilizado en la preparación de los geles electroforéticos que sirven para la separación de mezclas de macromoléculas.

Polimorfismo: Presencia en una población o entre poblaciones de varias formas fenotípicas debidas a distintos alelos de un gen o a distintos homólogos de un cromosoma.

Polimorfismo equilibrado: polimorfismo genético estable que se mantiene por selección natural.

Polipéptido: Compuesto formado de dos o más aminoácidos.

Polisacárido: Polímero biológico constituido por unidades de azúcares, por ejemplo el almidón, Celulosa, GAGs.

Portador: Individuo que lleva un alelo mutante que no lo expresa, fenotípicamente, debido a la presencia de un alelo compañero dominante; así, un individuo de genotipo Aa es portador de a, si hay dominancia completa de A sobre a.

Proteína: Complejo molecular formado por una o más cadenas polipeptídicas plegadas o superplegadas.

Puente de hidrógeno: Enlace débil que se establece al compartir un electrón con un átomo de hidrógeno; los puentes de hidrógeno son importantes en la determinación de la especificidad de los emparejamientos de bases de los ácidos nucleicos y en la determinación de la forma tridimensional de las proteínas.

Purina: Cierta clase de bases nitrogenadas, en el ADN las bases púricas son Adenina y Guanina.

Reacción en cadena de la polimerasa: Técnica de amplificación génica in vitro, en donde interviene una enzima que sintetiza el ADN, ADN genómico utilizado como molde, dNTPs, cloruro de magnesio como catalizador, Buffer de la enzima, dos iniciadores que delimitan la región a amplificar (para poder aplicar esta técnica es necesario que se conozca la secuencia completa del gen), mediante ciclos repetidos de desnaturalización del ADN, alineamiento de los iniciadores y extensión de la cadena de ADN.

RFLPs: técnica en la que se emplean polimorfismos en la longitud de fragmentos por restricción como loci de referencia para la identificación de genes conocidos o de otros loci.

Segregación: Citológicamente, separación de estructuras homólogas. Genéticamente separación de dos fenotipos correspondientes a los dos alelos de un gen, bien a individuos distintos (segregación meiotica), a deferentes tejidos (segregación mitotica).

Síto: Posición de una mutación dentro de un gen

Sustitución de base: Reemplazo de una base (o par de bases).

Taq polimerasa: enzima responsable de la síntesis de ADN in vitro a partir de dinucleótidos trifosfatados a partir de un molde de ADN que sirve como templado.

Timina: Base pirimidica que se aparee con la adenina



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

C. ELIA CONTRERAS ROGERO
P R E S E N T E.

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de TESIS " FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN LOS EXONES VIII Y XI DEL GEN DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA (GALNS) EN SUJETOS SANOS Y EN PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A EN POBLACION MEXICANA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la M.C. MARTHA PATRICIA GALLEGOS ARREOLA y como Asesor a la M.C. SILVIA ESPERANZA FLORES MARTINEZ.

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

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ENERO 26 DE 1998

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

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

COMITE DE
TITULACION



c.c.p. M.C. MARTHA P. GALLEGOS ARREOLA.- Director del trabajo.
c.c.p. M.C. SILVIA E. FLORES MARTINEZ.- Asesor del trabajo.
c.c.p. El expediente del alumno.

AOB/JLNH/memn*

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DR. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS
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:

CONTRERAS ROGERO ELIA Código 193183479 con el titulo:

FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Rsa Y Y Hae III EN EL GEN DE LA N-
ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA (GALNS) EN SUJETOS
SANOS Y EN PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A.


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

ATENTAMENTE


Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 10 de diciembre de 1997.

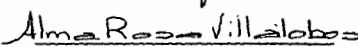
EL DIRECTOR DE TESIS


M. en C. Martha Patricia Gallegos A.


Dra. Anne Santerre Lucas.

EL ASESOR


M. en C. José Sánchez Corona.


Dra. Alma Rosa Villalobos A.


M. en C. Patricia Castro