

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

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



**"Polimorfismos Stu I y Hap. II en el Gen de la  
N-Acetilgalactosamina-6-Sulfato Sulfatasa (Galns)  
en Población Mexicana y en Pacientes con  
Mucopolisacaridosis Tipo IV A"**

**T E S I S**

**PARA OBTENER LA LICENCIATURA EN**

**BIOLOGIA**

**P R E S E N T A :**

**Héctor López Zaragoza**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., OCTUBRE 1997.**



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

**C. HECTOR LOPEZ ZARAGOZA**  
**P R E S E N T E.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis " **POLIMORFISMOS Stu I y Hap II EN EL GEN DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA (GALNS) EN POBLACION MEXICANA Y EN PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A** " para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis a la **M. EN C. MARTHA PATRICIA GALLEGOS ARREOLA.**

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

Las Agujas, Zapopan, Jal., Abril 24 de 1997

  
**M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION**

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

c.c.p. M. en C. MARTHA P. GALLEGOS ARREOLA.- Director de Tesis.  
c.c.p. El expediente del alumno.  
AOB/JLNH/memn \*

**C.U.C.B.A**



**DIV. DE CS.**  
**BIOLÓGICAS Y**  
**AMBIENTALES**

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 él (la) pasante:

**LOPEZ ZARAGOZA HECTOR**

**Código 084129593 con el título POLIMORFISMOS *Stu I* Y *Hap II* EN EL GEN DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA (GALNS) EN POBLACION MEXICANA EN PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A.**

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 examen de tesis y profesional respectivos.

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

**ATENTAMENTE**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 01 de Septiembre de 1997.

**EL DIRECTOR DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
M.C. MARTHA PATRICIA GALLEGOS A.

5/9/97   
\_\_\_\_\_  
DRA. ANNE SANTERRE LUCAS

**EL ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSE SANCHEZ CORONA

  
\_\_\_\_\_  
DR. DANIEL VILLAGOMEZ ZAVALA

  
\_\_\_\_\_  
M.C. CARLOS ALVAREZ MOYA

**POLIMORFISMOS *Stu I* Y *Hap II* EN EL GEN N-  
ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO  
SULFATASA (GALNS) EN SUJETOS SANOS Y  
EN PACIENTES CON  
MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A DEL  
NOROCCIDENTE DE MEXICO**

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.

**ALUMNO:** **HECTOR LOPEZ ZARAGOZA**  
Pasante de la carrera de Lic. en Biología.

**DIRECTOR DE TESIS** **M. EN C. MARTHA PATRICIA GALLEGOS ARREOLA**  
Técnico en Investigación,  
Candidato a Investigador Nacional (SNI)  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

**ASESOR** **DR. JOSE SANCHEZ CORONA**  
Investigador Titular,  
Investigador Nacional nivel II del SNI  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

## **DETIATORIAS**

Este trabajo es dedicado a todos los pacientes con MPS IV A y sus familiares por su gran cooperación. Con fuerza y esperanza de mantener su constante lucha en la vida...

A la memoria de mis abuelos: María Guadalupe Barragan, Camilo Zaragoza y Clemente López, quienes me dieron ejemplo de fortaleza y repeto. Siempre han estado presentes.

A mi amiga Ileana León, que donde quiera que éste su sueño a ún vive.

A todo aquel que ayude, aún más en la investigación para compartir el conocimiento y humildad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Muy especialmente a mi director de tesis *M. en C. Martha Patricia Gallegos Arreola* por su apoyo incondicional y dedicación en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. José Sánchez Corona por la oportunidad que me brindo.

A mi tía y primos por la motivación y ayuda que cada día me ofrecen.

A todas las personas que apoyaron directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de grupo especialmente a : Yoali, Cristina, Tera, Carla, Luz, Isabel, Sandra, Xochitl, Rebeca, Efren y Gerardo por su valiosa amistad.

A Elia Contreras Rogero por su gran ayuda.

A mis padres y hermanos.

A mis sinodales por su colaboración.

A mis maestros por mostrarme el camino y sabiduría.

Al Dr. Fernando Alfaro, Alfonso Islas, Arturo Orozco y Salvador Velázquez por su gran apoyo y paciencia.

A mis compañeros del laboratorio del H.G.O.

A todo el personal del laboratorio de Medicina Molecular del C.I.B.O.

## INDICE

	Página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
ANTECEDENTES.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
OBJETIVOS .....	27
MATERIAL Y METODOS .....	28
RESULTADOS.....	33
DISCUSION .....	40
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFIA .....	48
ANEXO 1 .....	52
ANEXO 2 .....	62A
APENDICE DE ABREVIATURAS .....	73
GLOSARIO.....	76



## RESUMEN

La N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS, E.C.3.1.6.4.) enzima lisosomal que participa en la degradación de los glucosaminoglucanos keratan sulfato (KS) y condroitín-6-sulfato (Ch-6-S), una disfunción en esta enzima trae como consecuencia la acumulación de KS y Ch-6-S en los lisosomas de las células, lo que produce síntomas de un desorden típico de almacenamiento lisosomal denominado MPS IVA ó síndrome de Morquio, se caracteriza por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van de la forma ligera a la severa, retardo en el crecimiento óseo, displasia esquelética, hiperlaxitud articular, tronco corto, hepatoesplenomegalía, opacidad corneal y facies inusuales sin retardo mental. El reciente aislamiento del ADNc del gen de la GALNS ha hecho posible el análisis de mutaciones responsables de la MPS IV A, así como de un gran número de polimorfismos intragénicos. Diferentes estudios poblacionales han demostrado que las poblaciones pueden ser diferentes en sus frecuencias génicas para determinados marcadores genéticos por lo que hay necesidad de contar con descripciones poblacionales de la región. El objetivo del trabajo fue describir las frecuencias de los polimorfismos *Stu I* y *Hap II* en sujetos sanos no relacionados y pacientes con MPS IV A (Noroccidente de México) y comparar nuestros resultados con los reportados en la literatura. Estos polimorfismos han sido utilizados como herramienta diagnóstica mediante el análisis de ligamiento en familias con MPS IV A (Hum Genet, 1995. 95:257-264) en población japonesa y caucásica (Cuadro). El producto de la reacción en cadena de la polimerasa para el polimorfismo *Stu I* es un segmento de 295 pb que comprende el exón 13 del gen GALNS, contiene un sitio polimórfico para la enzima *Stu I* originado por una transversión en la última base del codón de Glu (444) cuya presencia resulta en fragmentos de 138 y 157 pb después de la digestión. El polimorfismo *Hap II* es un segmento de 323 pb que comprende el exón 14 de dicho gen, contiene un sitio polimórfico para la enzima *Hap II* cuya presencia resulta en fragmentos de 120 + 203 pb para el alelo 1 y 95 + 108 + 120 pb para el alelo 2 después de la digestión. Nuestros resultados mostraron la utilidad de los polimorfismos *Stu I* en el gen GALNS con una heterocigocidad (H) del 47 % en población normal y del 48 % en pacientes con MPS IV A y para el polimorfismo *Hap II* mostró una H del 35 % en la población normal y del 48 % en

pacientes con MPS IV A. Las diferencias entre la población de este estudio y la de los japoneses ejemplifican la necesidad de contar con descripciones de cada región. La evaluación de las frecuencias alélicas para ambos polimorfismos en este estudio y en el descrito previamente por Tomatsu et. al (Hum Genet, 1995. 95:257-264) permiten concluir que su heterocigocidad (H) es suficiente para estudios de ligamiento en familias con MPS IV A. Más aún el valor de H para ambos polimorfismos en esta muestra de mexicanos es cercano al máximo posible para un sistema de dos alelos.



# 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) (*ver anexo I*). Los GAGs al no ser degradados se acumulan en los lisosomas y como consecuencia se produce un depósito anormal en 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 se han identificado 6 tipos de MPS (I, II, III, IV, VI y VII) con algunos subtipos (*cuadro I*). Las características pueden ser comunes e incluyen curso progresivo crónico, afección multisistémica, organomegalia y anomalías faciales (1, 2 y 3).

Las características diferenciales de las MPS dependen de la deficiencia enzimática y la alteración de la vía metabólica específica. Dependiendo de la deficiencia enzimática, se han encontrado bloqueados el catabolismo del dermatán sulfato (DS), heparán sulfato

(HS) ó keratán sulfato (KS), individualmente o en combinación; el condroitín sulfato, también puede estar involucrado. Además se han identificado 10 enzimas, cuyas deficiencias originan las MPS: 4 glucosidasas, 5 sulfatasas y una transferasa no hidrolítica ( ver *anexo I* ). El desarrollo de diversos métodos bioquímicos en las últimas décadas, ha permitido un mejor conocimiento de las MPS, esto ha dado lugar a que en la clasificación actual, la MPS V se encuentre vacante ya que se demostró que la MPS V ó síndrome de Scheie se trataba de una misma MPS , la MPS I (1, 2 y 3).

Las manifestaciones clínicas de las MPS son variables y su curso es progresivo; las más generales son ( 1, 2 y 3 ): **facies grotesca o gargólica, hirsutismo, alteraciones oculares:** opacidad corneal, hipertelorismo, glaucoma, retinitis pigmentaria presentes en la MPS I, II y III; **alteraciones auditivas:** infecciones frecuentes del oído medio, sordera neurosensorial, conductiva o mixta; **alteraciones en el sistema respiratorio:** la rigidez de la caja torácica y el estrechamiento de las vías aéreas superiores por depósito de GAGs llevan a problemas de insuficiencia respiratoria, infecciones recurrentes de las vías respiratorias altas y bajas, neumonía obstructiva (hipertrofia adenoidea) y restrictiva; **alteraciones en el sistema cardiovascular:** el depósito de GAGs en músculo liso de la arteria lleva a la proliferación de las células y a la excesiva producción de colágeno y elastina. Puede involucrar las válvulas cardíacas dando estenosis y regurgitación; **alteraciones abdominales:** hernia umbilical, inguinal o ambas, hepato y esplenomegalia. En la mayoría de las MPS hay

crecimiento visceral por depósito de GAGs incompletamente degradados en el parénquima y en las células retículoendoteliales; **alteraciones del sistema nervioso central:** engrosamiento de las meninges que conduce a una hidrocefalia comunicante, paquimeningitis, mielopatías, trastornos de la conducta y atrofia cortical. El depósito de GAGs y lípidos en las células cerebrales lleva al deterioro mental y neurológico; **alteraciones esqueléticas:** rigidez y contractura articular, mano en garra, síndrome de túnel del carpo, talla baja, subluxación atlantoaxial, silla turca en forma de "J " y diferentes grados de disostosis múltiple como: costillas ovoideas, aumentan del espacio intercostal, displasia vertebral, xifosis, escoliosis, hipoplasia acetabular e iliaco, huesos largos y cortos, irregularidades metafisiarias e hipoplasia de apófisis odontoides; **otros tejidos:** se aprecian inclusiones metacromáticas y vacuolares en los leucocitos circulantes y en las células de la médula ósea.

La incorporación y avance de métodos bioquímicos y moleculares han 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, ya que la mayoría de las veces los fenotipos son similares y la única forma de diferenciarlos son bioquímicamente ( 4 ).



Cuadro I

## TIPOS DE MPS

TIPO	EPONIMO	CLINICA	HERENCIA	ENZIMA DEFICIENTE	<sup>1</sup> GAGs AFECTADOS
MPS I H	Hurler	Inicio antes de los 10 años, disostosis múltiple, retardo mental, organomegalia alteraciones cardiacas, fallecimiento en la infancia.	<sup>7</sup> AR	$\alpha$ -L-iduronidasa	<sup>2</sup> DS, <sup>3</sup> HS
MPS I S	Scheie	Contracturas articulares, opacidad corneal, inteligencia y esperanza de vida normal.	<sup>7</sup> AR	$\alpha$ -L-iduronidasa	<sup>2</sup> DS, <sup>3</sup> HS
MPS I H/S	Hurler/Scheie	Fenotipo intermedio entre la MPS I H y I S.	<sup>7</sup> AR	$\alpha$ -L-iduronidasa	<sup>2</sup> DS, <sup>3</sup> HS
MPS II A	Hunter A	Disostosis múltiple, organomegalia, retardo mental, muerte antes de los 15 años.	<sup>8</sup> LXR	Iduronato sulfatasa	<sup>2</sup> DS, <sup>3</sup> HS
MPS II B	Hunter B	Inteligencia normal, talla corta, sobrevida de 20 a 60 años.	<sup>8</sup> LXR	Iduronato sulfatasa	<sup>2</sup> DS, <sup>3</sup> HS
MPS III A	Sanfilippo A	Deterioro mental profundo, hiperactividad, manifestaciones somáticas moderadas.	<sup>7</sup> AR	Heparán-N-sulfatasa (sulfaminidasa)	<sup>3</sup> HS
MPS III B	Sanfilippo B	Similar a la III A	<sup>7</sup> AR	$\alpha$ -N-acetil glucosaminidasa	<sup>3</sup> HS
MPS III C	Sanfilippo C	Similar a la III A	<sup>7</sup> AR	Acetil CoA: $\alpha$ -glucosamina-N-acetil transferasa	<sup>3</sup> HS
MPS III D	Sanfilippo D	Similar a la III A	<sup>7</sup> AR	N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa	<sup>3</sup> HS
MPS IV A	Morquio A	Platispondilia, escoliosis grave opacidad corneal, hipoplasia del esmalte dental, se conocen formas intermedias.	<sup>7</sup> AR	N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa	<sup>4</sup> KS <sup>5</sup> Ch-6-S
MPS IV B	Morquio B	Similar a la MPS IV A	<sup>7</sup> AR	$\beta$ -galactosidasa	<sup>4</sup> KS
MPS VI	Maroteaux - Lamy	Disostosis múltiple, opacidad corneal, inteligencia normal, sobrevida hasta la adolescencia en la forma severa. Se conocen formas intermedias.	<sup>7</sup> AR	N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa (Arisulfatasa B)	<sup>2</sup> DS
MPS VII	Sly	Disostosis múltiple, hepatoesplenomegalia, amplio espectro de severidad.	<sup>7</sup> AR	$\beta$ -glucuronidasa	<sup>2</sup> DS, <sup>3</sup> HS <sup>6</sup> Ch-4-S <sup>5</sup> Ch-6-S

<sup>1</sup>GAGs = Glucosaminoglucanos<sup>4</sup>KS= Keratán sulfato<sup>7</sup>AR= Autosómico recesivo<sup>2</sup>DS= Dermatán Sulfato<sup>5</sup>Ch-6-S = Condroitín 6 sulfato<sup>8</sup>LX= Ligado al X<sup>3</sup>HS = Heparán sulfato<sup>6</sup>Ch-4-S=Condroitín4 sulfato

## MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV

Existen dos fenotipos de la MPS IV ( *cuadro 1* ) el *subtipo A* que corresponde a la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) conocido como la forma *clásica* y el *subtipo B*, originado por la deficiencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, antes conocida como forma *leve*; actualmente se pueden reconocer diferentes grados de severidad en cada una de ellas (1, 2 y 5).

**MUCOPOLISACARIDOSIS IV A:** 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 sulfato de los GAGs KS y Ch-6-S (*ver anexo 1*). 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)*. Morquio describió la primera familia de origen Uruguayo con este fenotipo en 1929 y desde entonces ha sufrido cambios en su clasificación. No se conoce su frecuencia en particular, pero se ha estimado una frecuencia general de 1/100,000 nacidos vivos.

La MPS IV A es aparentemente normal al nacimiento pero las manifestaciones severas son visibles en los primeros 3 años de vida se caracteriza por heredarse en forma autosómica recesiva y por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde la forma severa hasta la forma ligera, con retardo en el

crecimiento óseo, displasia esquelética, hiperlaxitud articular, hipoplasia odontoidea, coxa valga, tronco corto, opacidad corneal, hepatoesplenomegalia, facies inusuales, sin retardo mental, excesiva excreción urinaria de KS y Ch-6-S. A nivel del sistema nervioso central se desarrolla una mielopatía que se manifiesta por una parálisis que incapacita más al paciente, dependiendo de la severidad del paciente esta mielopatía puede ser aguda, subaguda o crónica en las formas graves. La sobrevida depende de la gravedad del paciente, pero en general presentan un promedio de vida de 20 a 30 años de edad en las formas graves, la forma intermedia y ligera pueden llegar a tener un promedio de vida normal. Los pacientes fallecen por complicaciones cardiopulmonares o por compresión del cordón cervical (1, 2 y 5).

Bioquímicamente es fácil distinguir entre los dos subtipos ya que cada uno tiene diferente deficiencia enzimática y por consecuencia diferente excreción de GAGs urinarios (*tabla 1*). En cada paciente con posible MPS debe comprobarse la excreción urinaria del GAGs y se debe efectuar 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).

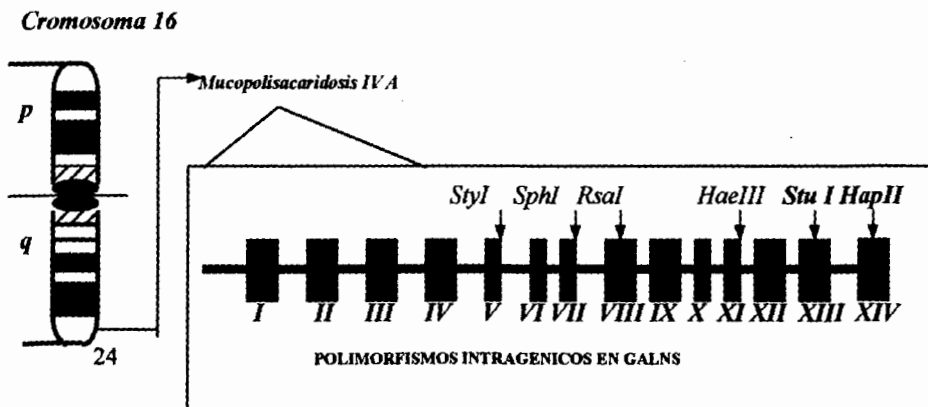


## GEN DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA (GALNS).

Ha sido localizado en el cromosoma 16 *brazo q banda 24.3*, determinado por estudios de hibridación *in situ*, contiene un DNac de 35 kb distribuidos en 14 exones y 13 intrones que dan origen a un precursor glicopéptido de 120 kD; se caracteriza por ser una enzima heterodimérica que después de la hidrólisis del péptido señal y la modificación de carbohidratos producen una subunidad madura de 40 kD y una forma activa de 15 kD (5, 6).

El reciente aislamiento del DNac del gen GALNS ha hecho posible el análisis de numerosas mutaciones responsables de la MPS IV A, así como de un gran número de marcadores génicos o polimorfismos intragénicos asociados a diferentes mutaciones en pacientes con MPS IV A que contribuyen al entendimiento en las bases de la heterogeneidad clínica en pacientes con esta enfermedad ( *figura 1* ).

*Figura 1*



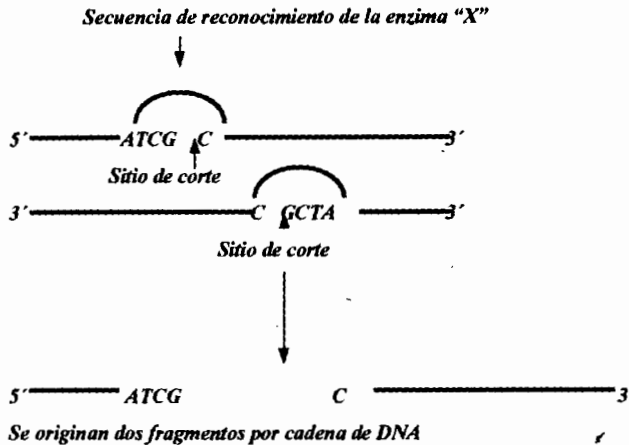
(modificado de Tomatsu y Cols. *Hum Mol Genet*, 1995).

Diferentes estudios en la literatura sobre la frecuencia de polimorfismos intragénicos en el gen de la GALNS ( *figura 1* ) en población normal y en pacientes con MPS IV A de origen japonés y caucásico, reportaron un total de 27 combinaciones a partir de los polimorfismos intragénicos Sty I, Sph I, Rsa I Hae III Stu I y Hap II (haplotipos), 18 de los cuales, estuvieron presentes en caucásicos, siendo la combinación **ABHcde** la más común tanto en alelos mutantes como en normales; 20 combinaciones en la población japonesa, siendo la combinación **abhCDE** la que se presentó con mayor frecuencia en alelos normales y mutantes. Estos estudios demuestran una gran heterogeneidad genética en el gen GALNS en ambos grupos. Dentro de estas dos poblaciones existe una gran probabilidad de manifestarse la MPS IV A con una frecuencia del 77 %. En caucásicos del 77.27% y 78.26% en japoneses (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 y 11).

Las poblaciones pueden ser diferentes en sus frecuencias génicas para determinados marcadores genéticos por lo que hay necesidad de contar con descripciones poblacionales de cada región, razón por la cual en el presente estudio se analizaron las frecuencias del polimorfismo *Stu I* en el exón 13 y *Hap II* en el exón 14; nombre que reciben por tener un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Stu I* y *Hap II* respectivamente ( *figura II* ), en sujetos sanos no relacionados y en pacientes con MPS IV A a partir de una muestra seleccionada del Noroccidente de México, estos marcadores polimórficos han sido utilizados como herramienta diagnóstica

mediante el análisis de ligamiento, en familias con MPS IV A en la población caucásica y japonesa, por otra parte son una herramienta útil para estudios de paternidad y medicina forense (7, 8, 9, 10 y 11).

**Figura II**



*(Thompson and Thompson, Genetics in Medicine, 1991)*



BIBLIOTECA CENTRAL

## MARCADORES GENICOS.

Los cromosomas se encuentran formados por moléculas lineales de DNA bicatenario, tienen una longitud aproximada de 3 mil millones de pares de bases (pb), en comparación un gen abarca aproximadamente 10,000 pb, si correlacionamos la herencia de un segmento concreto de DNA ("marcador") con la herencia de una enfermedad, puede localizarse el gen mutado, hasta en una distancia de 1 a 2 millones de pb, es decir, menos de la milésima parte del

genoma humano. Con este grado de precisión, el gen se encuentra al alcance de las técnicas de Biología Molecular, lo que facilita clonar y examinar su actividad. La identificación de un marcador génico estrechamente ligado a una enfermedad permite, además, seguir la herencia del gen que causa dicha enfermedad. Esto abre la vía al desarrollo de una técnica sencilla para la detección de portadores asintomáticos y portadores de una enfermedad (12).

La estrategia básica, conocida como análisis de ligamiento, constituye una de las herramientas más antiguas de la genética clásica. Un nuevo impulso, gracias a las posibilidades que ofrecen las nuevas técnicas de la biología molecular, facilitan el acceso a una amplia gama de marcadores génicos como: los polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés:). Actualmente por medio del análisis de ligamiento se conocen múltiples marcadores génicos para varios genes causantes de enfermedades. Mediante el comportamiento del DNA a través de un gel de agarosa (sometido previamente a enzimas de restricción) el análisis de segregación de muchos marcadores RFLP en familias sanas, se han determinado las posiciones relativas en el marco físico del cromosoma (12).

La base fundamental del ligamiento es la herencia de los genes de cada pareja cromosómica en donde, un gen procede de la madre y el otro del padre. En una de las etapas de la meiosis, los cromosomas homólogos se recombinan o entrecruzan y permutan segmentos de

igual longitud, por lo que, los cromosomas que reciben las células germinales suelen estar formados por fragmentos de los dos cromosomas parentales. Gracias a la recombinación podemos detectar el ligamiento existente entre un marcador y una enfermedad. Por ejemplo, si en una familia afectada los individuos que desarrollan la enfermedad heredan el marcador (segmento de DNA que siempre se hereda junto con el gen mutante), estos se encuentran en el mismo cromosoma, y muy próximos. Se dice entonces que el marcador y el gen patógeno están ligados (12).

Para relacionar la herencia de un marcador con una enfermedad deben cumplirse la siguiente condición: el marcador debe detectarse fácilmente y en la población este marcador deberá presentarse en varias formas (12).

Los genes que determinan ciertas enzimas y otras proteínas poseen múltiples alelos, que se manifiestan en el polimorfismo proteico; la presencia de versiones distintas y detectables de la proteína que determina cada gen (12). El poder resolutivo de la nueva estrategia de ligamiento radica en el alto nivel de polimorfismo normal que contiene la secuencia de pares de bases que forman el DNA. Entre las secuencias de dos cromosomas homólogos se observa, en promedio una diferencia cada 200 a 500 pb. Las herramientas de la biología molecular que responden al nombre de enzimas de restricción, facilitan dicha detección. Cualquier variación de la secuencia de DNA que cree o elimine un sitio de restricción alterará la longitud del fragmento o

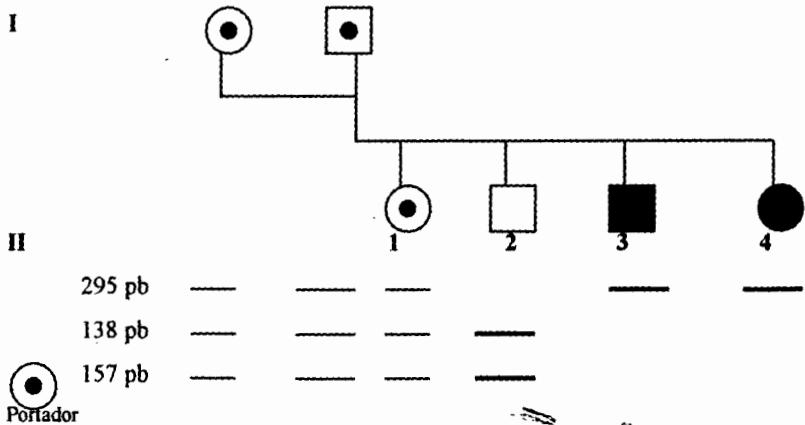
fragmentos de DNA resultantes. La variación origina un polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción, esto es, un RFLP (5-6). El **RFLP** se define como un marcador en potencia. Una enzima de restricción, sin embargo, puede detectar millones de sitios de corte por todo el DNA humano. Para detectar un RFLP es preciso encontrar una sonda que sea complementaria a una zona de DNA cercana al sitio de corte de la enzima de restricción. Este marcador de DNA, definido como RFLP, se encuentra, en una u otra forma en todos los individuos, padezcan o no la enfermedad (12).

El valor de cualquier marcador depende en gran medida de cuantas variantes del mismo posea la población. Entre más versiones existan, más probable será que un individuo que porte un gen que da origen a una enfermedad presente dos alelos distintos en el locus de interés. Cuando esto ocurre, puede detectarse la recombinación entre el marcador y la enfermedad en los descendientes. Muchos RFLP tienen su origen en el cambio de una sola base o en la adición o delección de unos pocos pares de bases en el sitio de reconocimiento de la enzima restricción. Este tipo de variación ejerce un efecto sencillo, esto es, el sitio de restricción aparece o está ausente. El RFLP, en este caso, presenta sólo dos formas, que al menos la mitad de la población sea homocigota para el locus marcador, es decir, tendrá la misma variante en ambos cromosomas homólogos. Para diagnosticar la presencia de un gen patógeno en un posible portador, es preciso analizar antes el DNA de otros miembros de la familia, sanos o enfermos. El objetivo de dicho análisis consiste en determinar que alelo marcador (o alelos, en

el caso de una enfermedad recesiva) se herede con la enfermedad en esa familia. la presencia del alelo con marcador indica que el progenitor presenta el riesgo de transmitir la enfermedad (7, 8, 9, 10, 11 y 12).

**Polimorfismo:** se define a la presencia de dos o más genotipos alternativos en una población normal. Estos polimorfismos representan variaciones naturales en la secuencia del genoma que se encuentran en la población general y pueden emplearse como marcadores (*figura III*) para rastrear genes mutados dentro de las familias afectadas con algún síndrome genético (7, 8, 9, 10 y 11).

**Figura III**



Ejemplo hipotético del empleo del polimorfismo *Stu I* utilizado para el diagnóstico de familias con MPS IV A. En este caso el fragmento de 138 y 157 pb (tiene el sitio de corte para la enzima *Stu I*) se encuentra asociado con el gen sano y el fragmento de 295 pb esta asociado con el gen mutado.

Generalmente se encuentran asociados a mutaciones responsables de ciertas patologías genéticas, como es en el caso de la MPS tipo IV A de ahí la importancia de este estudio. En base a los antecedentes reportados en la literatura sobre la gran heterogeneidad génica que existe en el gen GALNS en la población japonesa y caucásica, no podemos extrapolar las frecuencias génicas de ciertos marcadores polimórficos reportadas en la población japonesa y caucásica, ya que cada población es diferente (8).

Un concepto importante que emerge a partir de varios ejemplos de variación genética y polimorfismos es el alto grado de diversidad individual que existe entre los miembros de una población, distintos genotipos se reflejan en cientos de polimorfismos que se heredan independientemente por lo que existen cientos de combinaciones entre las distintas poblaciones (8).

En la actualidad se conocen diversos polimorfismos intragénicos en el gen de la GALNS, cuya utilidad, es expresada como grado de informatividad y varía de acuerdo al grupo poblacional estudiado (8, 9, 10 y 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 ( en el caso de los polimorfismos por longitud de los fragmentos de restricción ó RFLPs) 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 microsátelites de repeticiones variables ó número de repeticiones variables en tandem ( VNTRs por sus siglas en inglés) y en otros por el reconocimiento de enzimas de restricción como es el caso de los polimorfismos *Stu I* y *Hap II* los cuales han demostrado ser una herramienta diagnóstica para la detección de pacientes con MPS IV A en población japonesa y caucásica. Para el sitio *Stu I* en la población japonesa se ha reportado una heterocigocidad\* del 0.49 y de 0.44 para el sitio *Hap II*. Para la población caucásica se ha reportado una heterocigocidad de 0.36 para el sitio *Stu I* y de 0.47 para el sitio *Hap II*.( 8, 10 y 12 ).

- el grado máximo de heterocigocidad es del 50% ó 0.5 en un sistema de dos alelos, esto indica que mientras este valor se encuentra cercano al 50 % es altamente informativo y confiable.

### ***Características de los polimorfismos:***

- su presencia es independiente de la naturaleza de la mutación, por lo que son la alternativa ideal en entidades de gran heterogeneidad mutacional.
- no son afectados por la amplia variación fenotípica individual.
- los polimorfismos ideales son los intragénicos pues minimizan la probabilidad de recombinación con el sitio de la mutación. La probabilidad de que un marcador esté ligado con el sitio de mutación

por un evento de recombinación está en función del tamaño del gen ( 8,12 y 13).

El grado de informatividad que ofrece un polimorfismo específico varía de acuerdo con la población, de manera que un enfoque en el que se analicen distintos polimorfismos, constituye una estrategia capaz de incrementar la informatividad relativa de cada polimorfismo en forma individual, la tecnología del DNA recombinante y metodologías tales como la reacción en cadena de la polimerasa, el empleo de enzimas de restricción y la identificación de regiones altamente polimórficas, entre otras constituye una herramienta poderosa de gran utilidad para que un primer nivel de asesoramiento pueda lograr resultados altamente confiables en poco tiempo y a costo relativamente bajo (13).

El diagnóstico preciso de la MPS IV A requiere de la cuantificación y caracterización de GAGs urinarios, la cuantificación de la actividad enzimática e idealmente de la caracterización de la lesión a nivel del DNA. Sin embargo para el uso racional de recursos es importante un estudio sistemático de menor a mayor complejidad en pacientes con diagnóstico de MPS IV A. Polimorfismos intragénicos en el gen GALNS han sido utilizados como herramienta diagnóstica mediante el análisis de ligamiento en familias con MPS IV A en población caucásica y japonesa, razón por la cual nos interesa en primera instancia determinar las frecuencias de los polimorfismos *Stu I* y *Hap II* en sujetos sanos no relacionados y en pacientes con MPS IV A a partir de una muestra seleccionada del Noroccidente de México.

Este estudio nos proporcionará información acerca de la distribución genotípica con respecto al gen GALNS en sujetos sanos y en pacientes con MPS IVA de nuestra población, así como la identificación de alelos de los polimorfismos Stu I y Hap II característicos de la población normal y de los pacientes con MPS IV A y la comparación de nuestros resultados con los de la población japonesa y caucásica que nos darán la pauta para aplicar esta herramienta diagnóstica en las familias mexicanas con MPS IV A, así mismo seleccionar la combinación de alelos característicos de nuestra población que se encuentren asociados a una mutación en particular en pacientes con MPS IV A y en un futuro poder caracterizar dicha mutación.

## ANTECEDENTES

### CONTEXTO HISTORICO

A principios de este siglo fueron reconocidos los dos primeros tipos de MPS: el primer caso fue delineado, por el *Dr. John Thompson*, en Edinburgo (1900), quién le dio el nombre de enfermedad Johnny McL's (1 y 12). En 1917 *Charles Hunter* describe un reporte detallado de uno de los 3 hermanos estudiados por Thompson, cuyas características hereditarias concordaban con la forma ligada al X, dándole el nombre que hoy conocemos como el síndrome de Hunter. Dos años más tarde (1919) *Gerteud Hurler* describe 2 casos más no emparentados que se caracterizaban por retraso mental, opacidad corneal y deformidades óseas. Desde entonces a estos pacientes les fueron asignados varios nombres, entre los que destacan: disostosis múltiple, condrostiodisplasias, osteoartropatías, osteocondrodistrofías y gargolismos ( designación poco afortunada, debido a que sus características faciales recordaban a las gárgolas grotescas que adornaban las construcciones medievales ). Posteriormente se observó hepatoesplenomegalia asociada a las alteraciones esqueléticas, dándoles el nombre erróneo de lipocondrodistrofias, abandonándose éste, al comprobarse que no se acumulaban lípidos. El reconocimiento de diferentes cuadros clínicos, llevó al uso de epónimos (1 y 2). En 1952 *Brante* introdujo el término de mucopolisacaridosis para designar la alteración en estos pacientes y

**McKusick** en 1965 los clasificó en 6 diferentes grupos. En 1965 **Danes y Bearn** descubrieron que la acumulación celular de GAGs en fibroblastos cultivados. En 1970 **Fratanton, Hall y Neufeld** demostraron diferencias bioquímicas por medio de estudios de complementación en cultivos mixtos de fibroblastos en el síndrome de Hurler (AR) y Hunter (Ligado al X lo que) trajo como consecuencia que el aislamiento e identificación de un factor correctivo en el medio que abriera la posibilidad para clarificar los mecanismos normales de la degradación de GAGs y la diferenciación de la MPS III, MPS I y MPS II, se hizo posible ( 1, 2 y 12).

## MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV

El primer caso del Síndrome de Morquio descrito por un grupo Franco-Canadiense fue en base a las fotografías clínicas tomadas por **Osler (1897)**. Quién describió dos casos de hermano y hermana afectados contrastándolos con cretinismo. Las condiciones descritas simultáneas e independientes por **Morquio (1929; Montevideo y Uruguay)** y por **Brailsford (1929; Birmingham, Inglaterra)**, fueron las entidades las cuales se reconocían los casos de opacidad corneal, enfermedad valvular aórtica y la excreción del keratán sulfato, **Morquio** observó estos trastornos en 4 miembros de una familia de suecos. Entre 1929 y 1959, una miscelánea de desordenes esqueléticos fueron atribuidos a la categoría de Morquio que incluían enfermedades múltiples como displasias espándiloepifisiaria e hipoplasias odontoides.

**Greenberg (1968) y Gadbois (1973)** identificaron 48 casos del síndrome de Morquio (a partir de 27 familias) en la provincia de Quebec, cuyos estudios bioquímicos de GAGs urinarios mostraron valores normales. La excreción del keratan sulfato tuvo un aumento de 2 a 3 veces por arriba de lo normal. **McKusick (1972)**, también mostró la excreción de keratan sulfato y condroitín 6 sulfato en un joven de 14 años de edad y en su hermana de 7 años. **Hussels (1974) y McKusick (1976)** describieron el caso de una mujer afectada con dos niños normales. **Matalon, (1974)** concluye que la deficiencia enzimática es la 6 sulfatasa que degrada los residuos de KS y Ch-6-S. **Levin (1975)** describió las anormalidades clásicas orales en 12 casos, los maxilares anteriores eran espaciosos y extendidos, los posteriores disminuidos con forma punteada. El esmalte presentaba una dureza normal, pero en algunos pacientes presentaban orificios. El paladar era ancho y plano. **DiFerrante (1978)** atribuye a la N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa la causa de la MPS IV A. **Holzgreve (1981)**, describe la existencia de una forma leve de MPS IV A. **Guiney y Stevenson (1982)**, describen una mujer con deficiencia de N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa quien sobrevivió a la edad de 67 años. Después de padecer varios días apnea, se encontró muerta en cama. **Fujimoto y Horwitz (1983)** estudiaron dos descendientes consanguíneos con una forma leve del síndrome de Morquio. **Hecht (1984)** presenta una enfermedad bilateral desconocida y le da el nombre erróneo de Legg-Perthes, en un paciente de 14 años de edad, con tronco corto, geno-valgo, opacidad corneal y cambios faciales; radiográficamente con platispondilia leve, desvío de la primera vértebra lumbar anterior y una mínima hipoplasia

odóntoidea. En cuanto a la actividad enzimática de N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa fue indetectable en leucocitos y baja en fibroblastos. La detección de keratán sulfato en orina fue de 22.9 mg/del volumen total (lo normal fue menor de 2 mg en volumen total). **Glossl (1984)** describe que los fibroblastos de algunos pacientes con MPS IV A mostraron deficiencia de la glicoproteínas neuraminidasa (sialidasa; acilneuraminil hidrolasa). **Beck (1986)** sugiere que hay formas severas, intermediarias 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, intermediaria y leve **Neufeld (1987)** propuso que éste desorden estaba determinada por la galactosa-6-sulfatasa (N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa). **Gibson (1987)** purificó y caracterizó la enzima. **Nelson y Kinirons (1988)** describieron características dentales típicas de la MPS IV A en 12 pacientes estudiados. **Cahane (1990)** describió dos casos de hermanos a la edad de 30 años quienes desarrollaron glaucoma. En Columbia Británica entre 1952 y 1986, 6 casos de MPS IV A fueron observados dando una frecuencia relativa de 1 en 216,412 nacidos vivos. **Beck (1992)** realizó un diagnóstico de MPS IV A en un paciente de 23 semanas de gestación. El ultrasonido mostró ascitis moderada y el keratán sulfato estuvo presente en líquido amniótico. El diagnóstico fué confirmado después del término de embarazo. **Tomatsu (1991)** clonó y secuenció el DNAC a partir de placenta humana del gen GALNS, éste contiene 1,566 nucleotidos los cuales codifican para un polipéptido de 522 residuos de aminoácidos, con un péptido señal de 26 aminoácidos y un polipéptido maduro de 496 residuos de aminoácidos incluyendo 2 sitios de unión a aspargina

y 2 sitios potenciales de glucosilación. 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, glucosamina-6-sulfatasa e iduronato-2-sulfatasa. **Wiedemann (1992)** proporcionó un esquema biográfico de Luis Morquio (1867-1935) de Montevideo. **Tomatsu (1992)** identificó 4 mutaciones exónicas diferentes en el DNAC de cuatro pacientes con forma severa del síndrome de Morquio y a dos hermanos con forma leve. También demostró por medio de la técnica de hibridación *in situ*, que el gen de GALNS estaba localizado en el cromosoma 16q24. **Becker (1993)** con la misma técnica de hibridación *in situ* descubrió la localización exacta del gen en 16q24.3 confirmando estos experimentos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Por el interés de analizar el genoma de pacientes con MPS IV A, **Nakashima (1994)** analizó la estructura del gen GALNS humano cuya longitud aproximada es de 50 kb, contiene 14 exones y una región promotora pequeña denominada nATG. Al mismo tiempo **Morris (1994)** describió que el gen GALNS estaba dividido en 14 exones contenidos en 40 kb, con repeticiones de secuencias Alu en el intrón 5 y un VNTR en intrón 6. **Orii (1995)** describe un estado heteroalélico, 2 deleciones de aproximadamente 8.0 y 6.0 kb en dicho gen en dos pacientes con MPS IV A. **Tomatsu (1996)** describió 4 nuevas mutaciones en el gen de GALNS (12).

En base a los antecedentes reportados en la literatura se tiene conocimiento que las frecuencias alélicas de algunos marcadores intragénicos ó polimorfismos varían ampliamente entre las



poblaciones. Estudios realizados por el grupo del Dr. Tomatsu demuestran que la frecuencia alélicas de algunos polimorfismos intragénicos en el gen GALNS en población normal y en pacientes con MPS IV A de origen caucásico y japonés tiene una gran heterogeneidad génica. En México no se tiene conocimiento acerca de estos polimorfismos en el gen GALNS; razón por la cual nos interesa conocer la frecuencias alélicas de los polimorfismos *Stu I* en el exón 13 y *Hap II* en el exón 14 en sujetos sanos no relacionados y en pacientes con MPS IV A a partir de una muestra seleccionada del Noroccidente de México, con el fin de implementar una herramienta diagnóstica en nuestras familias con MPS IV A.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a que los polimorfismos intragénicos *Stu I* y *Hap II* en el gen de GALNS han mostrado estar asociados con una mutación en particular en pacientes con MPS IV A de origen caucásico y japonés, y el grado de información que ofrece un polimorfismo específico varía de acuerdo con la población estudiada, nos interesa conocer las frecuencias de estos polimorfismos en sujetos sanos no relacionados y en pacientes con MPS IV A a partir de una muestra seleccionada del Noroccidente de México.

# OBJETIVOS

## ***General***

Determinar las frecuencias de los polimorfismos intragénicos *Stu I* y *Hap II* en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A en una muestra seleccionada del Noroccidente de México

## ***Particulares***

Determinar los alelos segregados de los polimorfismos intragénicos *Stu I* y *Hap II* en el gen GALNS en la población normal y en pacientes con MPS IV A en una muestra seleccionada del Noroccidente de México.

Comparar las frecuencias de los polimorfismos *Stu I* y *Hap II* en sujetos sanos y pacientes con MPS IV A en la población del Noroccidente de México con los resultados obtenidos en caucásicos y japoneses.

## **MATERIAL Y METODOS**

Se colectaron muestras de sangre periférica ( 5-10 ml ) en tubos con EDTA al 10 % ( como anticoagulante ) a partir de 104 sujetos sanos para el polimorfismo *Stu I* y 74 para el polimorfismo *Hap II* (provenientes de los alrededores de la Ciudad de Guadalajara, 60 fueron estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara y los otros 44 donadores del banco de sangre del CMNO, IMSS ) y 10 pacientes con diagnóstico de MPS IV A, los pacientes fueron enviados al laboratorio de Genética Molecular de la División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente ( IMSS ), por los Servicios del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional de Occidente, ISSSTE, DIF, Hospital Civil y SSBS.

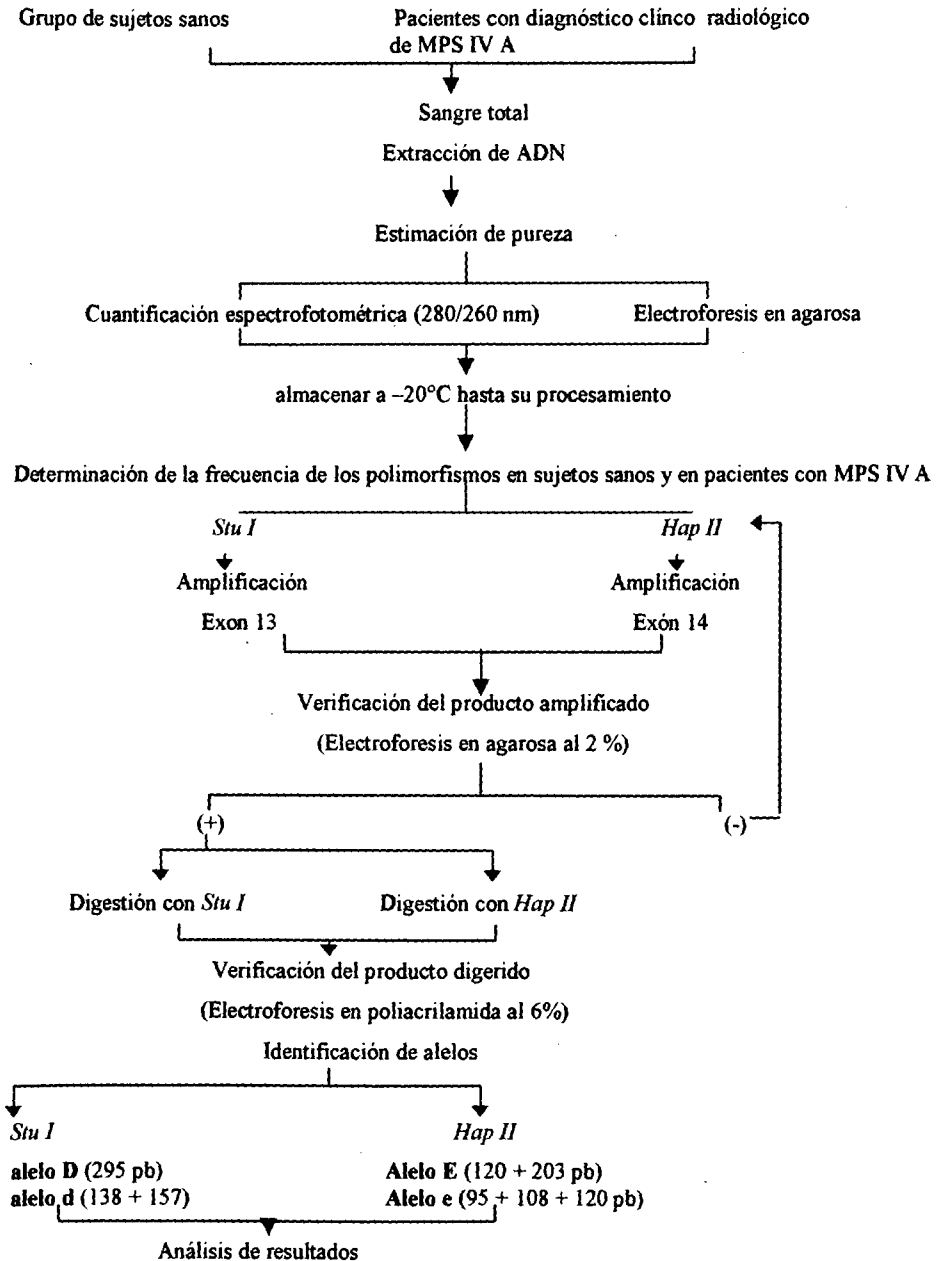
Al grupo de sujetos sanos se les proporcionó información acerca del estudio, así como al grupo de médicos de los Hospitales participantes una hoja para la captación de datos clínico-radiológicos del paciente con diagnóstico de MPS IV A.

Para ambos grupos se extrajo ADN genómico a partir de una muestra de sangre periférica por medio del método de Gustincich, 1991 ( 14 ), se cuantificó y determinó la pureza del mismo. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa ( RCP ) fueron amplificados dos segmentos del gen GALNS, para el polimorfismo *Stu I* ( exón 13 ) fue un segmento de 295 pb, que contiene un sitio polimórfico para la

enzima *Stu I* originado por un cambio ( *transversión* ) en la última base del codón de Glu (444) cuya presencia resulta en fragmentos de 138 y 157 pb después de la digestión. El polimorfismo *Hap II* es un segmento de 323 pb que comprende el exón 14 de dicho gen, contiene un sitio polimórfico para la enzima *Hap II* su presencia resulta en fragmentos de 120 + 203 pb y 95 + 108 + 120 pb después de la digestión, estos fragmentos fueron verificados en geles de agarosa al 2% como se muestra en el siguiente diagrama de flujo (8, 9, 10, 11 y 15).

Para la descripción de la metodología y preparación de soluciones utilizados en el presente estudio *ver anexo 2*.

## DIAGRAMA DE FLUJO



## **ANALISIS DE ESTADISTICO:**

Se describieron las frecuencias de los polimorfismos intragénicos *Stu I* y *Hap II* en sujetos sanos y en pacientes con MPS IV A por medio del método de conteo génico, la heterocigocidad se calculó en base a la ley de equilibrio de Hardy Weinberg, y la comparación de resultados se realizó de acuerdo a la prueba exacta  $X^2$  ( 16, 17 y 18 ).

### **1.- Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas.**

Fueron determinadas mediante el conteo del número de individuos perteneciente a un genotipo dado, para un sistema de dos alelos de los polimorfismos *Stu I* y *Hap II* se obtuvieron 3 posibles genotipos para cada polimorfismo:

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

**Genotipo dd** (homocigoto para la presencia del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción) \*\*.

**Genotipo Dd** (heterocigoto con la presencia de ambos alelos)

\*\*\*

**Genotipo EE** (\*).

**Genotipo ee** (\*\*).

**Genotipo Ee** (\*\*).

A partir del conteo de genotipos mediante una relación de porcentaje fueron determinadas las frecuencias de los alelos de cada polimorfismo en la muestra total analizada.

## **2.- Heterocigicidad de los marcadores.**

La informatividad de cada polimorfismo fue determinada mediante el porcentaje de la heterocigicidad (H), donde:  $H = 2pq$  ( $p =$  alelo D ó E,  $q =$  alelo d ó e).

## **3.- Prueba exacta de $\chi^2$**

Se realizó por medio de distintas comparaciones entre grupos, por medio del programa RXC-MS.DOS; este programa calcula la probabilidad de tener una tabla de contingencia 2x2 para datos observados aún cuando los valores de algunas celdas sean muy pequeños (menor a 5), este genera un mínimo de 1,000 tablas al azar, con el mismo total de los valores observados y elabora n análisis de  $\chi^2$  y G-estadístico y el error estándar de las simulaciones ( en este trabajo, se establecieron 10,000 simulaciones considerando un número altamente confiable). Los valores de probabilidades mayores a 0.05 indican que los datos tienen una probabilidad de ocurrir mayor al 5% si las filas y las columnas fueran independientes, es decir, indican 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.



## RESULTADOS

Se analizaron 104 sujetos sanos (208 cromosomas) para el polimorfismo *Stu I*, 77 sujetos sanos (154 cromosomas) para el polimorfismo *Hap II* y 10 pacientes con diagnóstico de MPS IV A (20 cromosomas) en una muestra seleccionada del Noroccidente de México. La distribución genotípica observada se comparó con la esperada de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ) (los tres genotipos entre sí, los homocigotos contra los heterocigotos y la prueba exacta  $X^2$ ), así como, las frecuencias génicas entre la población mexicana del Noroccidente de México y la descrita previamente en japoneses y caucásicos.

Se investigó la presencia de 4 alelos; 2 para el polimorfismo *Stu I* y 2 para el polimorfismo *Hap II* en los dos grupos de estudio (*figura IV*), identificados como **alelo D** (295 pb, ausencia para el sitio de reconocimiento para la enzima *StuI*), **alelo d** (138 + 157 pb, presencia del sitio de reconocimiento para la enzima *StuI*), **alelo E** (120 + 203 pb, presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima *HapII*) y **alelo e** (95 + 108 + 120 pb, presencia de dos sitios de reconocimiento para la enzima *HapII*)

### FRECUENCIAS GENICAS

#### 1.- Grupo de sujetos sanos mexicanos

Fue calculada la frecuencia génica de los polimorfismos intragénicos *StuI* y *HapII* en el gen GALNS a partir de 104 sujetos sanos para el **polimorfismo *Stu*** de los cuales 45 fueron homocigotos para el **alelo d**, 21 homocigotos para el **alelo D** y 38

heterocigotos para el alelo **Dd**, resultando una frecuencia génica de 0.38 para el alelo **d**, 0.62 para el alelo **D**, y una heterocigocidad de 0.47 ( *Cuadro I* ).

Para el **polimorfismo Hap II** a partir de 77 individuos sanos, 9 fueron homocigotos para el alelo **E**, 50 par el alelo **e** y 18 heterocigotos para el alelo **Ee**, cuya frecuencia génica resulto ser de 0.77 para el alelo **e**, 0.23 para el alelo **E**, y una heterocigocidad de 0.35 ( *Cuadro II* ).

Por medio del análisis estadístico se observó que ambos polimorfismos se encuentran en equilibrio en la muestra analizada en este estudio.

**Polimorfismo *Stul***: resultados a partir de 10,000 simulaciones, programa RXC.MS.DOS.  $X^2 = 2.6849$ ,  $P = 0.2691 \pm 0.0044$ ,  $G$  estadística = 2.6936,  $P = 0.2655 \pm 0.0044$ , NO SIGNIFICATIVAS, EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

**Polimorfismo *HapII***: resultados a partir de 10,000 simulaciones, programa RXC.MS.DOS.  $X^2 = 3.8897$ ,  $P = 0.1630 \pm 0.0037$ ,  $G$  estadística = 3.9523,  $P = 0.1630 \pm 0.0037$ , NO SIGNIFICATIVAS, EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

## 2.- Grupo de pacientes con MPS IV A mexicanos

A partir del grupo de pacientes con MPS IV A (n=10) se establecieron las frecuencias génicas de los polimorfismos *Stul* y *Hap II* en el gen GALNS en donde la mayoría de los pacientes segregaron el alelo **D** con una frecuencia de 0.6 y el alelo **E** con una frecuencia de 0.77 ( *Cuadro III y IV* ).

El análisis de equilibrio de ligamiento para el **polimorfismos *Stul*** **mostró:** resultados a partir de 10,000 simulaciones, programa RXC.MS.DOS.  $X^2 = 0.0000$ ,  $P = 1.0000 \pm 0.0000$ , G estadística = 0.0000,  $P = 1.0000 \pm 0.0000$ , NO SIGNIFICATIVAS, EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

**polimorfismos *HapII*** **mostró:** resultados a partir de 10,000 simulaciones, programa RXC.MS.DOS.  $X^2 = 0.0000$ ,  $P = 1.0000 \pm 0.0000$ , G estadística = 0.0000,  $P = 1.0000 \pm 0.0000$ , NO SIGNIFICATIVAS, EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

### 3.- Comparación entre población normal y pacientes con MPS IVA mexicanos

Al realizar el análisis estadístico de  $X^2$  entre la población normal y los pacientes con MPS IV A del Noroccidente de México no se observó diferencia en cuanto al polimorfismo *Stul*. Sin embargo el polimorfismo *HapII* hubo diferencias estadísticamente significativas, a partir de 10,000 simulaciones, con el programa RXC.MS.DOS.  $X^2 = 4.3166$ ,  $P = 0.04951 \pm 0.0019$ , G estadística = 3.9080,  $P = 0.04900 \pm 0.0019$  DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0.05$ ). POBLACIONES DIFERENTES.

## **COMPARACION DE FRECUENCIAS GENICAS DE LOS POLIMORFISMOS *StuI* Y *HapII* ENTRE LA POBLACION MEXICANA, JAPONESA Y CAUCASICA.**

Al comparar las frecuencias génicas de los polimorfismos *StuI* y *HapII* del gen GALNS de la población del Noroccidente de México con la población normal japonesa y caucásica, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas poblaciones con la población Mexicana del Noroccidente de México para el polimorfismo *Hap II*.

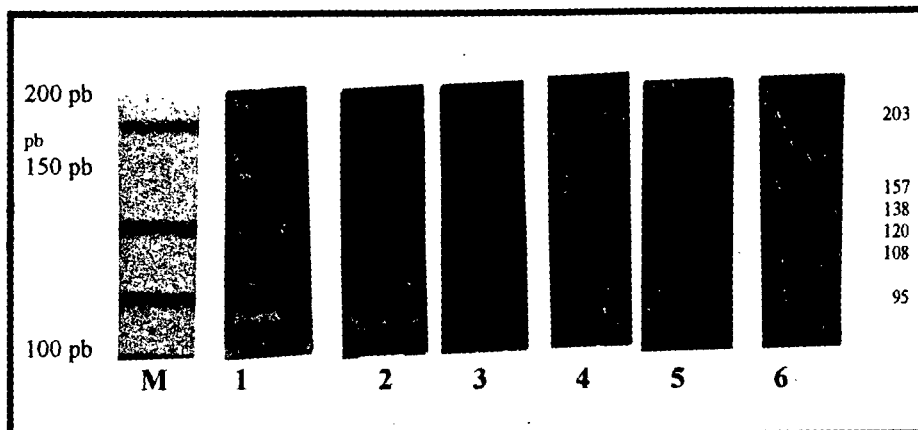
Para el polimorfismo *Stu I* se observaron diferencias estadísticamente significativas solamente ( $p < 0.05$ ) entre la población mexicana del Noroccidente de México y japonesa (Cuadro V).

El análisis de comparaciones entre las distintas poblaciones se realizó por medio de ensayos de  $X^2$  entre el total de los alelos de cada población para cada uno de los polimorfismos comparada con  $X^2$  de la población mexicana del Noroccidente de México.

## **COMPARACION DE FRECUENCIAS GENICAS DE LOS POLIMORFISMOS *StuI* Y *HapII* ENTRE PACIENTES CON MPS IV A MEXICANOS Y JAPONESES.**

Al comparar los pacientes con MPS IV A mexicanos del Noroccidente de México y japoneses, no se observó diferencias para el polimorfismo *StuI*. Sin embargo para el polimorfismo *HapII* si se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figura V:** Polimorfismos *StuI* y *HapII* en el gen *GALNS*



M = Marcador de peso molecular (Escala de 50 pb)

1, 2 y 3 = Heterocigotos, Alelo Ee

4, 5 y 6 = Homocigotos, Alelo d

**Cuadro I:** Frecuencia del polimorfismo *StuI* población mexicana.

Tipo	GENOTIPOS				ALELOS (2n)			
	Observados		Esperados		frecuencia			
	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	<sup>1</sup> D	<sup>2</sup> d	<sup>1</sup> D	<sup>2</sup> d
D	21	0.20	15	0.15	42	0	(80/208)	-----
d	45	0.43	40	0.38	0	90	-----	(128/208)
Dd	38	0.37	49	0.47	38	38		0.62
Total	104	0.100%	104	0.100%	80 + 128 = 208		0.100	
H	(2pq, p= alelo D, q= alelo d)				2 (0.38)(0.62) = 0.47			

<sup>1</sup> Alelo D = 295 pb

<sup>2</sup> Alelo d = 138 + 157 pb

H = Heterocigocidad

n = total de la muestra

**Cuadro II: Frecuencia del polimorfismo HapII en población mexicana.**

Tipo	GENOTIPOS				ALELOS (2n)			
	Observados		Esperados		Frecuencia		Frecuencia	
	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	E	e	E	e
E	9	0.12	4	0.05	18	0	(36/154)	0.23
e	50	0.65	46	0.60	0	100	(108/154)	0.77
Ee	18	0.23	27	0.35	18	18		
Total	77	0.100%	77	0.100%	36 + 108 = 154		0.100	
H (2pq, p= alelo E, q= alelo e)					2 (0.23)(0.77) =		0.35	

Alelo E = 120 + 203 pb Alelo e = 95 + 108 + 120 pb H = Heterocigidad n = total de la muestra

**Cuadro III: Frecuencia de los polimorfismos StuI y HapII en pacientes con MPS IV A mexicanos**

Tipo	GENOTIPOS				ALELOS (2n)			
	Observados-Frecuencia		Esperados-Frecuencia		D		d	
	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	D	d	E	e
D	4	0.40	4	0.40	8	0		
d	2	0.20	2	0.20	0	4		
Dd	4	0.40	4	0.40	4	4		
Total	10	0.100%	10	0.100	12	8		
Frecuencia					0.6	0.4		
H					0.48			
E	2	0.20	2	0.20			4	0
e	3	0.30	3	0.30			0	6
Ee	5	0.50	5	0.50			5	5
Total	10	0.100%	10	0.100			9	11
Frecuencia							0.45	0.55
H							0.50	

**Cuadro IV: Genotipos individuales en pacientes con MPS IV A**

1.- Dd/ee	6.- Dd/Ee
2.- dd/ee	7.- DD/EE
3.- Dd/Ee	8.- DD/EE
4.- Dd/Ee	9.- DD/EE
5.- DD/Ee	10.- dd/Ee

Alelo *StuI* D y d, Alelo *HapII* E y e.

**Cuadro V: Comparación entre las frecuencias de los polimorfismos *StuI* y *HapII* entre la población mexicana, caucásica y japonesa.**

Polimorfismo	mexicanos		caucásicos		japoneses	
	Normales	MPS IV A	Normales	MPS IV A	Normales	MPS IV A
<i>StuI</i>						
Alelo D	0.38	0.60	0.39	----	0.76	0.47
Alelo d	0.62	0.40	0.61	----	0.24	0.53
Heterocigocidad	0.47	0.48	0.36	----	0.36	0.50
<i>HapII</i>						
Alelo E	0.23	0.45	0.37	----	0.68	0.47
Alelo e	0.77	0.55	0.63	----	0.32	0.53
Heterocigocidad	0.35	0.50	0.47	----	0.44	0.50

## DISCUSION

- La idea general del presente trabajo consistió en la determinación de la frecuencia de los marcadores intragénicos *StuI* y *Hap II* en el gen GALNS en sujetos sanos no relacionados y en pacientes con MPS IV A en una muestra seleccionada del Noroccidente de México, para ello fue necesario realizar una revisión bibliográfica con el fin de conocer los marcadores comúnmente utilizados en otras poblaciones y aplicarlos en nuestra población. Este estudio nos ha permitido sentar las bases para identificar los genes de nuestra etnicidad, así como determinar su frecuencia tanto en población normal y en pacientes con MPS IV A de origen mexicano. En este estudio se ilustra la combinación de 2 sitios polimórficos, los que fueron 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 y otros polimorfismos también pueden utilizarse para la detección de portadores y diagnóstico prenatal en familias informativas cuya mutación específica no halla sido aún identificada.
- Fue necesario modificar el protocolo original de la reacción en cadena de la polimerasa para el análisis del polimorfismo *StuI* en el gen GALNS (sección de Material y Métodos) la modificación consistió en adicionar dimetilsulfoxido a la mezcla.



de reacción, a una concentración final del 10%, el cual evita la formación de estructuras secundarias en el ADN, facilitando la replicación del templado e incrementar e incrementar el número de ciclos de amplificación a 30 en lugar de 20.

- Nuestros resultados fueron similares al estudio realizado por Tomatsu y cols. 1995 en población normal y en pacientes con MPS IVA de origen japonés, al hacer el análisis de comparación entre la población normal contra los pacientes con MPS IV A no se observaron 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.
  
- haplotipos en diferentes poblaciones significa que distintas mutaciones hallan tenido su origen en diferentes poblaciones de manera independiente ó probablemente se originaron por eventos de recombinación intregénica en GALNS. La mutación sin sentido I113F y una doble delección, son dos tipos de mutaciones muy comunes que se manifiestan en diferentes grados de severidad en pacientes con MPS IVA de origen caucásico, iraquies, británicos y japoneses en un 77%. Por medio del análisis de ligamiento en el gen GALNS, se ha observado que el haplotipo abhcDE se encuentra asociado a la

mutación I113F, y el haplotipo bhDE esta asociado con la mutación que se origina por una doble delección (los alelos AA y Cc son parte de la delección), probablemente estas dos mutaciones tienen un fundador común (efecto de fundador). En base a lo anterior el siguiente estudio sería aplicar otros polimorfismos intragénicos en GALNS en población normal y el pacientes con MPS IV A de nuestra población, determinar los haplotipos y en los pacientes en donde el haplotipo sea el abhcDE primeramente buscar la mutación I113F y el haplotipo bhDE para buscar la doble delección.

- Los marcadores intragénicos constituyen una herramienta muy importante para la definición del surgimiento de nuevas mutaciones, por ello es necesario hacer un estudio de otros polimorfismos 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, permitirá identificar las diferencias étnicas entre las poblaciones, como lo indican nuestros resultados al realizar el análisis comparativo con respecto a la población japonesa.
  
- Las diferencias entre la población mexicana y japonesa observadas en ambos polimorfismos (*Stul* y *HapII*) del gen

GALNS, es una evidencia de la necesidad de contar con descripciones poblacionales de cada región, así como apoya la hipótesis de que la enfermedad de MPS IV A es altamente heterogénea, lo que da resultado a varios tipos de mutaciones que se desarrollen independientemente en diferentes poblaciones.

- En este estudio se ilustra que la combinación de 2 sitios polimórficos, los que fueron detectados de manera sencilla por enzimas de restricción en el gen GALNS proveen una poderosa herramienta para el análisis de genotipos con MPS IV A y para el análisis de ligamiento. Estos RFLPs y otros polimorfismos también pueden utilizarse para la detección de portadores y diagnóstico prenatal en familias informativas cuya mutación específica no halla sido aún definida.
  
- Los pacientes con mucopolisacaridosis tipo IV A mexicanos mostraron la misma segregación del alelo D y E de los polimorfismos *Stu I* y *Hap II* en el gen de GALNS, lo que sugiere un origen común de mutaciones que dan origen a la MPS IV A, probablemente las mutaciones asociadas a este polimorfismo tienen orígenes ancestrales comunes, teniendo un origen en población caucásica y posteriormente fueron a otras poblaciones, llegando a México por medio de los españoles.

- Nuestros resultados muestran que este polimorfismo es promisorio en el diagnóstico de pacientes con MPS IV A, por lo que deberán ser 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.

## CONCLUSIONES

- Se corroboró utilidad de ambos polimorfismos en el gen GALNS en nuestra población con una heterocigocidad del 47 % en población normal y del 48% en pacientes con MPS IV A para el polimorfismo *Stu I*. El polimorfismo *Hap II* mostró una heterocigocidad del 35% en la población normal, y en pacientes con MPS IVA del 48 %.
- Las diferencias entre las poblaciones mexicana y japonesa observados en ambos polimorfismos en el gen GALNS, ejemplifican la necesidad de contar con descripciones poblacionales de cada región.
- Tomatsu y cols. (1995) observan la incidencia del alelo D y E de los polimorfismo *Stu I* y *Hap II* repectivamente 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 Mucopolisacaridosis tipo IV A, al observar también la segregación en gran del alelo D y E 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 (1995) permiten concluir que su heterocigocidad (  $H$  ) es suficiente para estudios de ligamiento en familias con mucopolisacaridosis tipo IV A, más aún el valor  $H$  con respecto al polimorfismo *Stu I* en esta muestra mexicana es el máximo posible para un sistema de dos alelos.
  
- 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 con diferentes grupos étnicos muestra la heterogeneidad genética en el gen GALNS, demuestra la correlación entre ciertos haplotipos y mutaciones, clarifica el origen de las mutaciones (efecto del fundador contra

recurrencia) y provee medios para el diagnóstico prenatal y detección de portadores en familias con miembros afectados cuya mutación no halla sido identificada.

# 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. 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.- Scott HS, Nelson PV, Hopwood JJ, Morris CP. PCR of a KpnI in the  $\square$ -L-iduronidase (IDUA) gene. Nucleic Acids Res 1991a, 19:5796.
- 6.- MacDonald ME, Scott HS, Whaley WL, Pohl T, Wasmuth JJ, Lehrach H, Morris CP, Frischauf AM, Hopwood JJ, Gusela JF. Huntington disease-linked locus D3S111 exposed as the  $\square$ -L-iduronidase gene. Somat Cell Mol Genet 1991, 17:421-425.



- 7.- Stoltzfus LJ, Sosa-Pineda B, Moskowitz SM, Menon KP, Diott B, Hooper L, Teplow DB, Shull RM, Neufeld EF. Cloning and characterization of cDNA encoding canine  $\alpha$ -L-iduronidase. *J Biol Chem* 1992 267:6570
- 8.- Scott HS, Nelson PV, Hopwood JJ, Morris CP. PCR of a KpnI in the  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) gene. *Nucleic Acids Res* 1991a, 19:5796.
- 9.- Thompson and Thompson. *Genetics in Medicine*. Fifth edition, Saunders company, Philadelphia, 1991.
- 10.- Scott HS, Nelson PV, Cooper A, Wraith JE, Hopwood JJ, Morris CP. Mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome): linkage disequilibrium indicates the presence of a major allele. *Hum Genet* 1992, 88:701-702.
- 11.- Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 1985 69: 201-205
- 12.- Chakraborty R, Fornage M, Guegue R, Boerwinkle E. Population genetics of hypervariable loci: Analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population. In: *Fingerprinting: Approaches and applications*. T Burke, G Dolf, A.J. Jeffreys, and

- R. Wolff, eds. basel, Switzerland: Birkhauser Verlag 1991, 127-143.
- 13.- Scott HS, Nelson PV, Hopwood JJ, Morris CP. PCR of a VNTR linked at mucopolysaccharidosis type I and Huntington disease. *Nucleic Acids Res* 1991b, 19:6348.
  - 14.- Gustincich S, Carmici O, Del Sal G, Mamfiollelli 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, Budowie 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, Díaz EN, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery PCR products separate on polyacrilamide gels. 1994, *BioTechniques* 17: 915 - 918

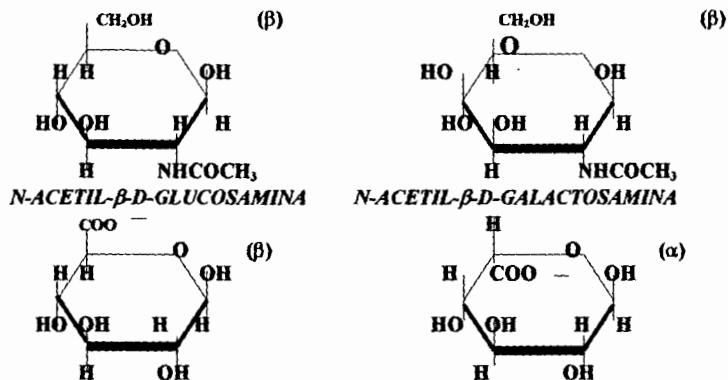
# ANEXO 1

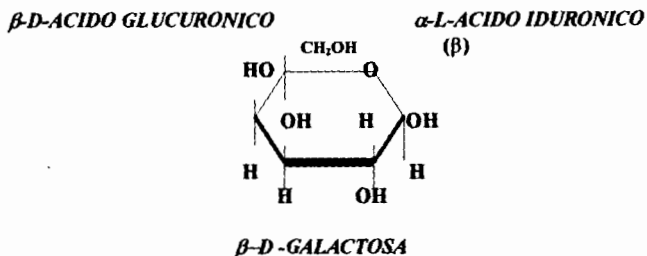
## *Glucosaminoglicanos (GAGs):*

El término mucopolisacárido fue introducido por Meyer para describir los polisacáridos de origen animal, los cuales contenían hexosamina. Al estudiar a fondo la bioquímica de estos polisacáridos, Jeanloz propone una nomenclatura sistemática, la cual es utilizada actualmente, denominándolos glucosaminoglicanos en lugar de mucopolisacáridos ( 1, 2 ).

Los GAGs ó mucopolisacáridos ácidos constituyen el componente principal de la sustancia fundamental amorfa del tejido conectivo. Bioquímicamente los GAGs son un 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. El aminoazúcar puede ser N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina ó N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina (acetilados o sulfatados). El ácido urónico puede ser ácido  $\beta$ -D-glucurónico ó  $\alpha$ -L-idurónico, como se muestra en la siguiente figura ( 2, 3 ).

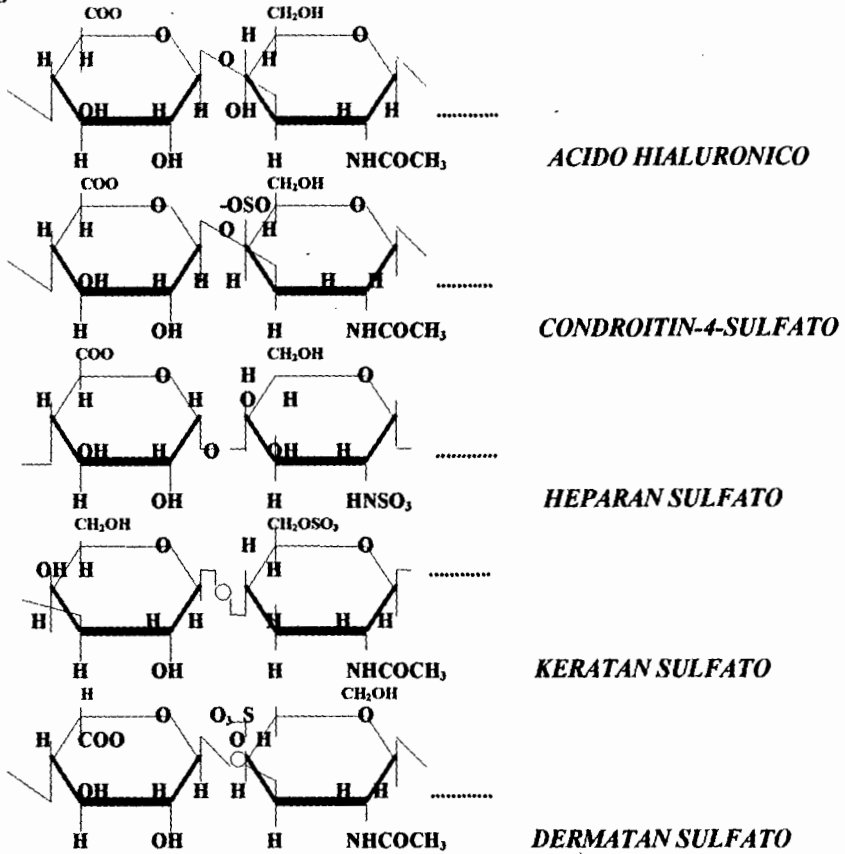
*figura 1*





Existen 7 tipos de GAGs denominados: Heparán (H), Heparán Sulfato (HS), Dermató Sulfato (DS), Keratán Sulfato (KS), Condroitín-4-Sulfato, Condroitín-6-S (Ch-6-S) y Acido 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, diferenciándose de acuerdo a la secuencia del aminoazúcar y el ácido urónico, por el 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, como se muestra en la figura II y cuadro I (1, 2 y 3).

Figura II



Cuadro 1

## 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		$\beta$ 1-3	$\beta$ 1-4		Humor vitreo Líquido sinovial Cordón umbilical Piel
Condroitín 4 sulfato	N-acetil galactosamina	Acido-D glucurónico	O-SO <sub>4</sub>	$\beta$ 1-3	$\beta$ 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Cartilago Hueso Aorta
Condroitín 6 sulfato	N-acetil galactosamina	Acido-D glucurónico	O-SO <sub>4</sub>	$\beta$ 1-3	$\beta$ 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Cartilago Hueso Válvulas del corazón Sangre
Dermatán sulfato	N-acetil galactosamina	Acido-L idurónico	O-SO <sub>4</sub>	$\alpha$ 1-3	$\beta$ 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 <sub>4</sub> N-SO <sub>4</sub> O-SO <sub>4</sub>	$\beta$ 1-4	$\alpha$ 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Aorta Hígado Pulmón
Heparina	N-acetil glucosamina	Acido-D glucurónico ó Acido-L idurónico	N-SO <sub>4</sub> O-SO <sub>4</sub> O-SO <sub>4</sub>	$\beta$ 1-4 $\alpha$ 1-4	$\alpha$ 1-4	Gal-Gal-Xyl-Ser	Mastocitos
Keratán Sulfato	(I) N-acetil glucosamina (II) N-acetil galactosamina ó N-acetil glucosamina	Galactosa	O-SO <sub>4</sub> O-SO <sub>4</sub>	$\beta$ 1-4 $\beta$ 1-4	$\beta$ 1-3 $\beta$ 1-3	N-acetil glucosamina-Asp-NH N-acetil galactosamin a-Ser N-acetil galactosamin a-Thr	Córnea Núcleos pulposos

Gal: Galactosa

Xil: Xilosa

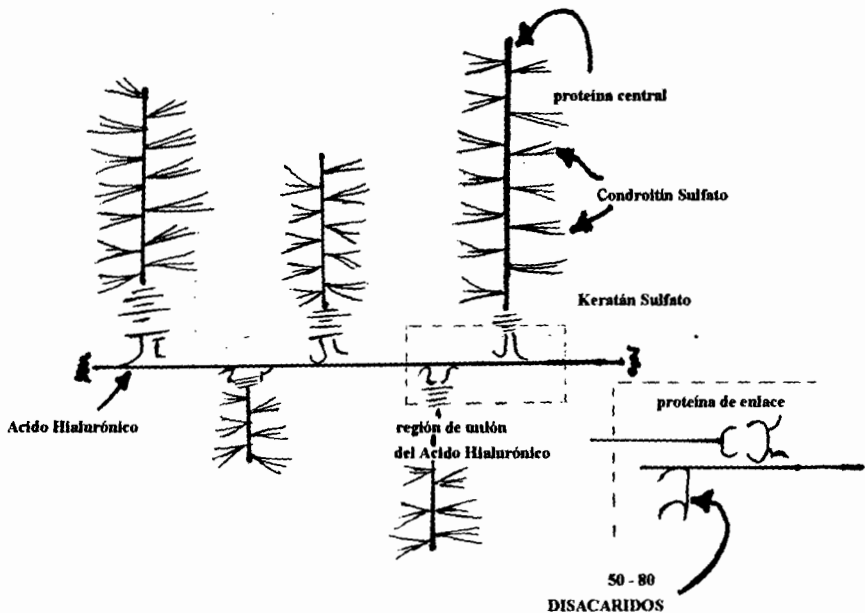
Ser: Serina

Asp: Acido Aspártico

Thr: Treonina

Los GAGs son moléculas polianiónicas, dado que contienen grupos sulfato o carboxilo de los ácidos urónicos presentes en su estructura. Muchas de sus funciones surgen de esta característica en particular, se encuentran unidos covalentemente a una proteína central, los cuales forman un agregado macromolecular llamado *proteoglucano*, como se muestra en la *figura III* (1, 2 y 3).

**Figura III**



Los proteoglucanos son sustancias de peso molecular elevado organizados por una cadena central de AH, que sirven a su vez de punto de anclaje de numerosas cadenas de polisacáridos que son semejantes en su estructura. Se encuentran agregados en la matriz extracelular del cartílago formando parte importante para prevenir su calcificación, otra de sus funciones es



dar resistencias al cartilago debido a la característica de absorber grandes cantidades de agua, permitiendo la estabilidad y soporte de las fibras y elementos celulares de los tejidos. También contribuyen al mantenimiento de agua y balance de sal en el cuerpo ( 1, 2, 3 ).

Una de las funciones de los GAGs es facilitar la difusión de metabolitos entre la sangre y los tejidos, al mismo tiempo sirve como barrera física para evitar la diseminación de partículas grandes como bacterias y otros microorganismos (2, 3).

Los GAGs son sintetizados por fibroblastos, células del músculo liso, células cebadas y mastocitos. En la síntesis de GAGs se elabora en primer lugar el núcleo de proteína de manera convencional, luego 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. Los azúcares y el fosfato proceden de precursores activados: nucleótidos, azúcar y fosfoadenosina 5'-fosfosulfato, respectivamente. El alargamiento y la sulfatación se realiza en el retículo endoplásmico rugoso a medida que la proteína progresa desde los polisomas, donde es sintetizada, hacia el exterior de la célula. La incorporación del azúcar y el sulfato es inhibida por compuestos que inhiben la síntesis proteica, esto indica que las cadenas laterales no son sintetizadas independientemente del núcleo de la proteína (1, 2, 3, 4 5).

La degradación de los GAGs ocurre principalmente en los lisosomas de las células, que contienen más de 40 hidrolasas ácidas diferentes. Las moléculas enteras de proteoglicanos son tomadas por endocitosis y son degradadas. 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, como se muestran en las figuras IV a la VII (1, 3, 6). Los GAGs al no ser degradados se acumulan en diferentes tejidos y dependiendo del bloqueo enzimático se ocasionan ciertas alteraciones fenotípicas entre las que se encuentran las mucopolisacaridosis.

*Figura IV*

### DEGRADACION DE LOS GAGs EN LOS LISOSOMAS DE LA CELULA

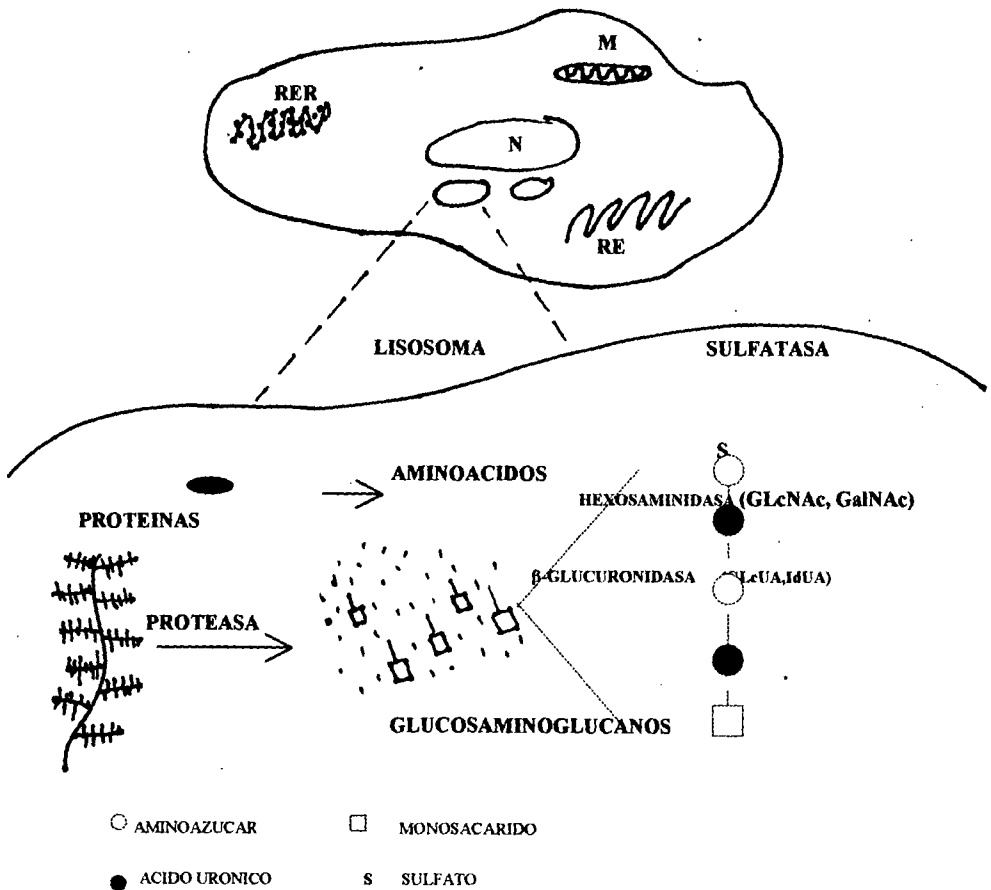
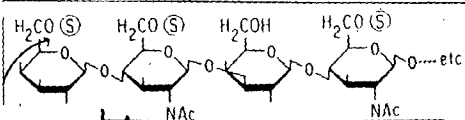
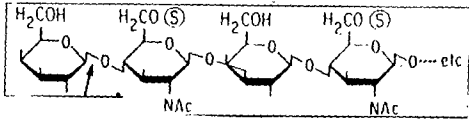
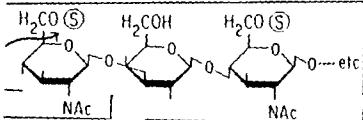
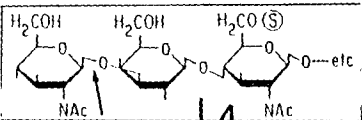
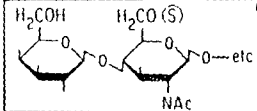
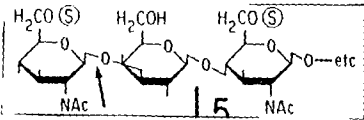
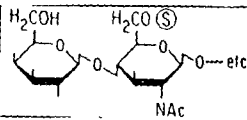


Figura V

## ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACION DEL KERATAN SULFATO

ENZIMA:	FUNCION:	DEFICIENTE EN:
 <p>galactosa-6-sulfatasa</p>	<p>Remueve los grupos sulfato de la galactosa</p>	MPS IV A
 <p><math>\beta</math>-galactosidasa</p>	<p>Remueve residuos de galactosa</p>	MPS IV B
 <p>N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa</p>	<p>Remueve los grupos sulfato de la N-acetil glucosamina</p>	MPS III D
 <p><math>\beta</math>-hexosaminidasa A y B</p>	<p>Remueve los residuos de la N-acetil glucosamina, los cuales son catalizados por la isoenzima A ó B</p>	GM2 A y B Sandhoff Tay Sachs
 <p>VIA ALTERNA</p>	<p>Remueve la N-acetil glucosamina -6-sulfato.</p>	GM2 A y B Tay Sachs
	<p>Remueve los residuos de la N-acetilglucosamina</p>	GM2 A: Gangliosidosis tipo 2, subtipo A. GM2 B: Gangliosidosis tipo 2, subtipo B.
		

 $\beta$ .hexosaminidasa A

Remueve los residuos de la N-acetilglucosamina

MPS III D: Mucopolisacaridosis tipo II D.

GM2 A: Gangliosidosis tipo 2, subtipo A.

MPS IV A: Mucopolisacaridosis tipo IV A.

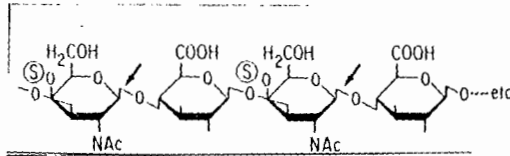
GM2 B: Gangliosidosis tipo 2, subtipo B.

MPS IV B: Mucopolisacaridosis tipo IV B.

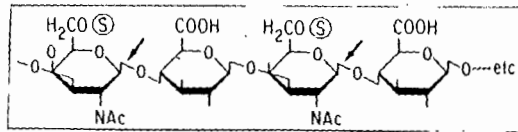
FIGURA VI

## ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA 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
--	---	--------

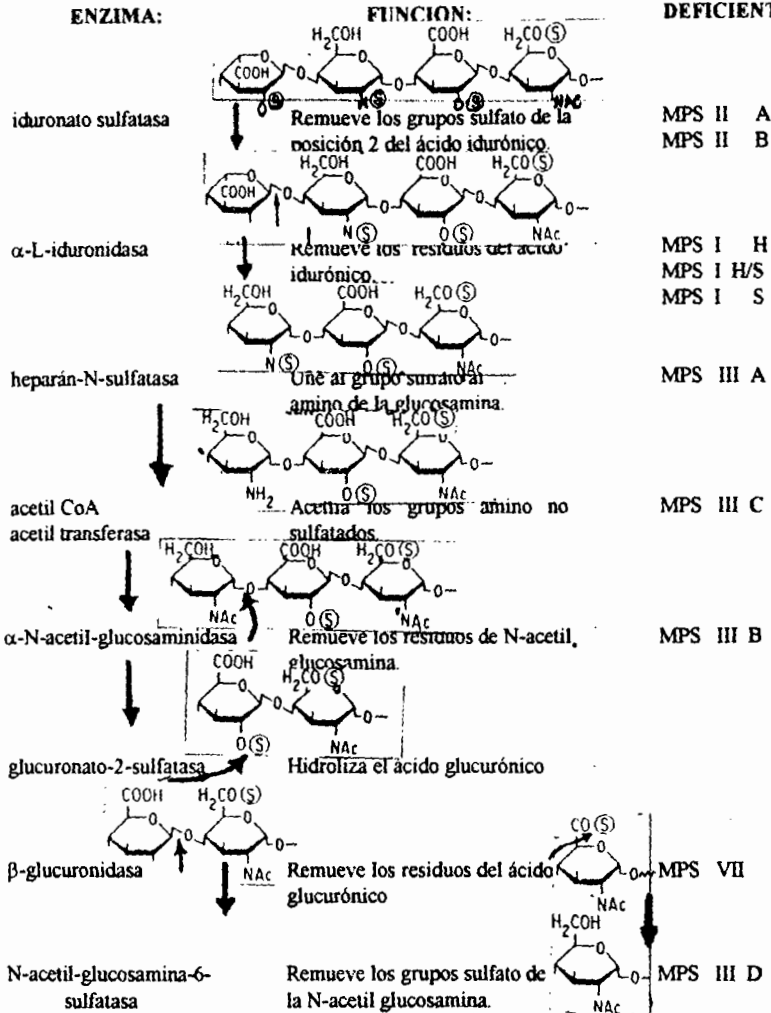


MPS IV A: Mucopolisacaridosis tipo IV A.

MPS VI: Mucopolisacaridosis tipo VI.

FIGURA VI

## ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACION DEL HEPARAN SULFATO



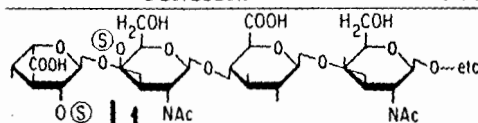
MPS I H: Mucopolisacaridosis tipo I subtipo Hurler.  
 MPS I H/S: Mucopolisacaridosis tipo I subtipo Hurler/ Scheie.  
 MPS I S: Mucopolisacaridosis tipo I subtipo Scheie.  
 MPS II A: Mucopolisacaridosis tipo II A.  
 MPS II B: Mucopolisacaridosis tipo II B.

MPS III A: Mucopolisacaridosis tipo III A.  
 MPS III B: Mucopolisacaridosis tipo III B.  
 MPS III C: Mucopolisacaridosis tipo III C.  
 MPS III D: Mucopolisacaridosis tipo III D.  
 MPS VII: Mucopolisacaridosis tipo VII.

FIGURA VIII

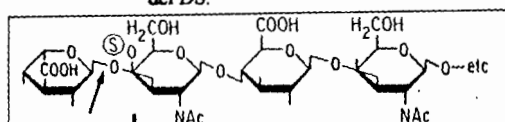
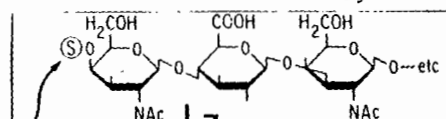
## ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACION DEL DERMATAN SULFATO

ENZIMA:	FUNCION:	DEFICIENTE EN:
iduronato sulfatasa	Remueve el grupo sulfato de la posición 2 del ácido L-idurónico del DS.	MPS II A MPS II B
$\alpha$ -L-iduronidasa	Remueve los residuos del ácido $\alpha$ -L-idurónico del DS y HS	MPS I H MPS I H/S MPS I S
N-acetil galactosamina 4-sulfatasa (Arielsulfatasa B)	Remueve los grupos sulfatos de la posición 4 de la N-acetil galactosamina del DS.	MPS VI
$\beta$ -hexosaminidasa A y B	Hidróliza la N-acetil galactosamina del DS.	Gangliosidosis GM2
$\beta$ -glucuronidasa	Remueve los residuos del ácido glucurónico del DS, HS y Ch-S	MPS VII



iduronato sulfatasa

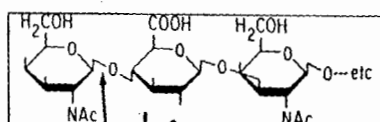
Remueve el grupo sulfato de la posición 2 del ácido L-idurónico del DS.

MPS II A  
MPS II B $\alpha$ -L-iduronidasaRemueve los residuos del ácido  $\alpha$ -L-idurónico del DS y HSMPS I H  
MPS I H/S  
MPS I S

N-acetil galactosamina 4-sulfatasa (Arielsulfatasa B)

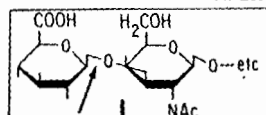
Remueve los grupos sulfatos de la posición 4 de la N-acetil galactosamina del DS.

MPS VI

 $\beta$ -hexosaminidasa A y B

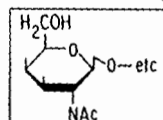
Hidróliza la N-acetil galactosamina del DS.

Gangliosidosis GM2

 $\beta$ -glucuronidasa

Remueve los residuos del ácido glucurónico del DS, HS y Ch-S

MPS VII



MPS I H: Mucopolisacaridosis tipo I subtipo Hurler.  
 MPS I H/S: Mucopolisacaridosis tipo I subtipo Hurler/ Schele.  
 MPS I S: Mucopolisacaridosis tipo I subtipo Schele.  
 MPS II A: Mucopolisacaridosis tipo II A.

MPS II B: Mucopolisacaridosis tipo II B.  
 MPS VI: Mucopolisacaridosis tipo VI.  
 MPS VII: Mucopolisacaridosis tipo VII.  
 GM2: Gangliosidosis tipo 2.

## ANEXO 2

### EXTRACCION DE ADN GENOMICO

Existen diferentes protocolos para la extracción de los ácidos nucleicos. La mayoría se caracterizan por el empleo de detergentes y solventes orgánicos que lisan los núcleos de las células y remueven las proteínas adheridas al ADN, seguidos por la precipitación de este con sales y alcoholes. De esta manera son utilizados en la amplificación *in vitro* por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) ( 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 como anticoagulante y colocarla en un tubo eppendorf (previamente rotulados) de 1.5 ml (colocar 6 tubos para cada muestra).
- Añadir 600 µl de buffer de lisis DTAB.
- Incubar durante 5 min. a 65°C.
- Retirar los tubos de la incubación e inmediatamente añadir 900 µl de cloroformo, tapar bien los tubos y agitar vigorosamente durante 5 min.
- Centrifugar 10 min a 14,000 rpm. En esta etapa se formaran tres capas: La capa inferior que es el cloroformo, la capa intermedia corresponde a la lisis celular y la capa superior acuosa donde se encuentra el ADN.
- Transferir a tubos nuevos 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.
- Juntar en un solo tubo los 3 botones de ADN de la misma muestra.
- Eliminar completamente el etanol.
- Resuspender el ADN en buffer TE, agitar suavemente y refrigerar a 4°C hasta su procesamiento.

### Preparación de Soluciones:

<b><u>Buffer de Lisis DTAB.</u></b>	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 con autoclave.

<b><u>Buffer CTAB</u></b>	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.

<b><u>Solución NaCl 1.2 M.</u></b>	NaCl (PM 58.44g)	1.2 M	(7g/0.1L)
------------------------------------	------------------	-------	-----------

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

<b><u>Buffer TE.</u></b>	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  $\frac{3}{4}$  del volumen final, adicional el EDTA y esterilizar con 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  $\mu$ 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 (cantidad de proteínas), por el valor de la relación D.O.260 nm/D.O. 280 nm que debe ser de 2.0 en adelante para considerarse satisfactoria (15).

## VERIFICACION DEL ADN.

La electroforesis a través de geles de agarosa o poli(acrilamida) es un método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, por lo que es un método alternativo 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 ( *figura 1* ),

mientras que si se observa un barrido o un patrón de varias bandas indica contaminación por sales y degradación del ADN respectivamente ( 15 ).

### **Procedimiento:**

- Aplicar 2  $\mu$ l de ADN genómico en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X.
- Mezclar la muestra de ADN con 3  $\mu$ 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 al incidir sobre 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 volumen 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 vertir al molde evitando la formación de burbujas, reposar por lo menos 30 min a temperatura ambiente para que la agarosa pueda gelificar.

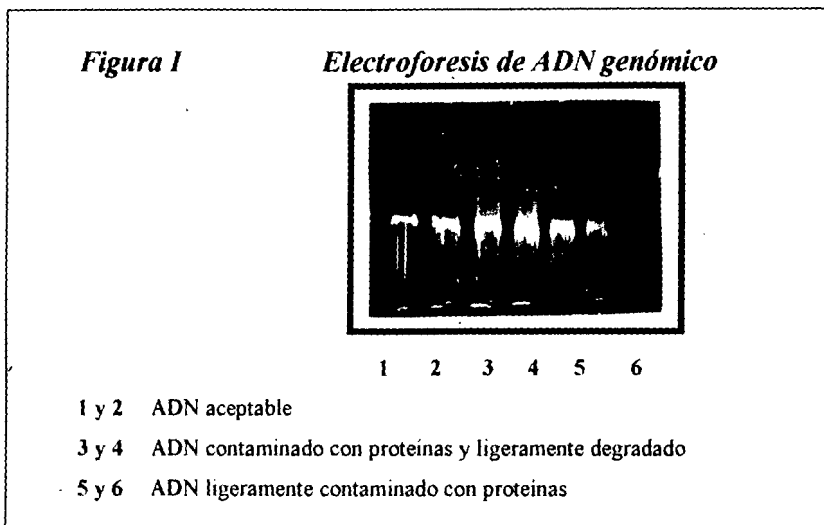
<b><u>Buffer TBE 10X:</u></b>	EDTA	(PM 372.2 g)	0.02 M	(40 ml de sol 5M/1L)
	Tris base	(PM 121.1g)	0.89 M	(108.0g/1L)
	Acido Bórico	(PM 61.844)	0.89 M	(55.04 g/1L)

Preparar una solución de EDTA 0.5 M (18.61 g/0.1 L) adicionar lentamente el NaOH para facilitar la disolución del EDTA, ajustar a pH de 8.0.

<b><u>Jugo azul 6 X:</u></b>	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 gels 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.



## ANALISIS DEL POLIMORFISMO *Stu I* y *Hap II* DEL GEN GALNS

### AMPLIFICACION GENICA MEDIANTE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP).

La RCP es un método de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, por medio del cual un segmento de DNA ó RNA 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: la *Taq polimerasa* enzima que sirve para polimerizar a la cadena de DNA, *buffer para la enzima* como medio necesario para el

funcionamiento de la enzima, *cloruro de magnesio* catalizador de la enzima, *dinucleótidos trifosfatados*, (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) cada una de las bases nitrogenadas que conforman el DNA, *dos Oligonucleótidos* que flanquean el fragmento de DNA por ser amplificado, *DNA genómico* que sirve como templado 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 separadas las cadenas de ADN puedan hibridar con su secuencias complementarias y la *extensión* para que la enzima termostable *Taq DNA polimerasa* empiece a copiar las cadenas de DNA por medio de la adición de los dinucleotidos trifosfatados correspondientes. El resultado es la acumulación exponencial de fragmentos de ADN genómico específicos, aproximadamente  $2^n$ , donde n es el número de ciclos de amplificación realizados (15).

Para la amplificación enzimática *in vitro* por RCP se utilizó un termociclador programable y se llevo a cabo de acuerdo al método descrito por *Tomatsu y col.* ( 8 ). Mediante el uso de los iniciadores OMF 142, 5' TAGAGCTCTGCAGCCTCAGCCTGTC y OMF 143, 5' CCCTGTGCTGGCCACGGTTCATCCT se investigó la presencia del polimorfismo *Stu I*, el producto de la RCP para este polimorfismo en el exón 13 del gen GALNS fue un segmento de 295 pb, que contiene un sitio polimórfico para la enzima *Stu I* originado por una cambio ( *transversión* ) en la última base del codón de Glu (444) cuya presencia resulta en fragmentos de 138 y 157 pb después de la digestión ( *denominados como alelo d* ) cuando el fragmento amplificado no tiene el sitio de reconocimiento para la enzima se le denomina *alelo D*. Para el polimorfismo *Hap II* se utilizaron los iniciadores OMF 133 5' TTGACAAGAGTGAGACTGTCTCAGA'3 Y OMF 14 5'CTGCGTCTGCAGGTGCTGTCTGTCT '3 que amplifican un segmento de 323 pb el cual comprende el exón 14 y parte de los intrones 13 y 14 del gen GALNS. Contiene un sitio polimórfico para la enzima *Hap II* originado por un cambio de A por G en el nucleótido 1660 del ADNc de GALNS, que resulta en fragmentos de 120 + 203 pb (denominado *alelo E*) y 95 + 108 + 120 pb ( denominado *alelo e*) después de la digestión. Los fragmentos resultado de ambos polimorfismos fueron verificados en geles de agarosa al 2% (8, 9, 10, 11 y 15).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

**POLIMORFISMO  
StuI**

**POLIMORFISMO  
HapII**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Por tubo (µl)</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Por tubo (µl)</b>
Buffer 10X	1X	1.5	1X	1.5
Iniciador 1 (50pmol/µl)	0.5 pmol	0.36	0.5 pmol	0.36
Iniciador 2 (50pmol/µl)	0.5 pmol	0.36	0.5 pmol	0.36
dNTPs (10 mM)	200 µM	0.3	200 µM	0.3
MgCl <sub>2</sub> (30 mM)	1.5 mM	0.75	1.5 mM	0.75
DMSO (100 %)	10 %	1.5	-----	-----
ADN templado (100ng/µl)	250 ng	2.0	250 ng	2.0
Agua	QBP	5.08	QBP	5.08
Taq polimerasa (5U/µl)	2.5 U	0.1	2.5 U	0.1
1 gota de aceite mineral	-----	1 gota	-----	1 gota

Una vez que se agregó el aceite mineral a cada uno de los tubos con el fin de evitar evaporación de los componentes de la reacción, los tubos fueron centrifugados 10 seg y sometidos al siguiente programa de amplificación:

---

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

---

## VERIFICACION DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Se realizó a través de geles de agarosa al 2 % en buffer TBE 1X (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 (*figura II*). Estas reconocen secuencias que tienen de 4 a 6 nucleótidos de longitud generalmente palindrómicas. Algunas hidrolizan la doble hebra de DNA exactamente en el eje de simetría generando fragmentos con extremos romos, otros hidrolizan el DNA en sitios similares pero opuestos del eje de simetría creando fragmentos con extremos pegajosos. Una mutación que elimina o genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción es susceptible de ser detectada con esta metodología (8, 9, 10, 11 y 15).

### POLIMORFISMO *Stu I*

El polimorfismo *Stu I* del exón 13 en el gen GALNS, tiene un sitio de reconocimiento para la enzima *Stu I* originado por una cambio (*transversión*) en la última base del codón de Glu (444) su presencia resulta en fragmentos de 138 y 157 pb después de la digestión (*denominados como alelo d*) cuando el fragmento amplificado no tiene el sitio de reconocimiento para la enzima se le denomina *alelo D*.

#### Procedimiento:

- Colocar 5 µl de producto amplificado del exón 13 en un tubo Eppendorf (0.5 ml), 0.5 µl de enzima *Stu 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, mezclar durante 8 seg en la microcentrifuga y colocar los tubos a 37 °C durante 4 h.

### POLIMORFISMO *Hap II*

El polimorfismo *Hap II* del exón 14 contiene dos sitios de reconocimiento para la enzima *Hap II* después de la digestión origina dos fragmentos de 120 + 203 pb (denominado *alelo E*) y 95 + 108 + 120 pb (denominado *alelo e*). Los fragmentos digeridos resultado de ambos polimorfismos fueron verificados en geles de poliacrilamida al 6% (8 y 15).

**Procedimiento:**

- Colocar 5  $\mu$ l de producto amplificado del exón 14 en un tubo ependorff (0.5 ml), 0.5  $\mu$ l de enzima Stu I (5 U), 2.5  $\mu$ l de buffer de la enzima (10X) y 17.0  $\mu$ l de agua, para una reacción final de 25  $\mu$ l, mezclar durante 8 seg en la microcentrifuga y colocar los tubos a 37 °C durante 4 h. (8-11, 15)

**ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DIGERIDOS**

Para la verificación de los productos digeridos de ambos polimorfismos se realizó por medio de una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % ( 15 ).

**GELES DE POLIACRILAMIDA**

La poliacrilamida en combinación con la N'N'metilen-bis-acrilamida se polimerizan para producir un gel de matriz rigida 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), polimeriza en pocos minutos a temperatura ambiente. 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 movilizan más lentamente (15).

**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).

### Gel de poliacrilamida al 6 %

- Colocar en un matraz las siguientes soluciones: 7 ml de poliacrilamida -bis-acrilamida (29:1), 3.5 ml de buffer TBE 1X (10X), 29.9 ml de agua, 35 µl de TEMED y 500 µl de PSA (persulfato de amonio, 10%) agitar durante 10 seg, vertir 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 poliacrilamida, Se monta en la cámara de electroforesis, realizando un precorrimiento de 20 minutos antes de aplicar las muestras.
- 10 µl de la muestra problema más 5 µl de jugo azul se mezclaron y se colocaron cada una de las muestras al gel, una vez colocadas todas la muestras al gel poner 2 µl 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).

### VISUALIZACIÓN DE GELES CON NITRATO DE PLATA.

- Fajación de los productos digeridos al gel de poliacrilamida, 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

Etanol absoluto al 10 % ----- 100 ml

Ácido 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).

# APENDICE DE ABREVIATURAS

<b>A:</b>	Adenina
<b>aa:</b>	Aminoácido
<b>ADNc:</b>	ADN complementario
<b>Alu</b>	Tipo de secuencia en el ADN
<b>Arg:</b>	Arginina
<b>AR:</b>	Autosómico recesivo
<b>ARN:</b>	Acido ribonucleico
<b>AUG:</b>	Codón de iniciación
<b>Ch-4-S:</b>	Condroitín-4 -Sulfato
<b>Ch-6-S:</b>	Condroitín-6 -Sulfato
<b>CTAB:</b>	Bromuro de hexadeciltrimetil amonio
<b>Del:</b>	Delección
<b>DS:</b>	Dermatán sulfato
<b>DNA:</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>DTAB:</b>	Bromuro de dodeciltrimetil amonio
<b>dNTPs:</b>	Dinucleótidos trifosfatados
<b>EDTA:</b>	Etilendiamino tetraacético
<b>Escalera de 50 y 100 pb:</b>	Marcador de peso molecular
<b>G:</b>	Guanina
<b>GAGs:</b>	Glucosaminoglucanos
<b>GC:</b>	Guanina, Citocina

<b>GM2:</b>	Gangliosidosis tipo 2
<b>H:</b>	Heterocigocidad
<b>HS:</b>	Heparán sulfato
<b>IDUA:</b>	$\alpha$ -L-iduronidasa
<b>Kb:</b>	Kilobase
<b>Kd:</b>	Kilodalton
<b>KS:</b>	Keratán sulfato
<b>L:</b>	Litro
<b>LX:</b>	Ligado al sexo
<b>Mb:</b>	Megabase
<b>MgCl<sub>2</sub>:</b>	Cloruro de magnesio
<b>ml:</b>	Mililitro
<b><math>\mu</math>l:</b>	Microlitro
<b>MPS:</b>	Mucopolisacaridosis
<b>MPS I:</b>	Mucopolisacaridosis tipo I
<b>MPS I H:</b>	Mucopolisacaridosis tipo I Hurler
<b>MPS I H/S:</b>	Mucopolisacaridosis tipo I Hurler/Scheie
<b>MPS I S:</b>	Mucopolisacaridosis tipo I Scheie
<b>MPS II:</b>	Mucopolisacaridosis tipo II
<b>MPS III:</b>	Mucopolisacaridosis tipo III
<b>MPS IV:</b>	Mucopolisacaridosis tipo IV
<b>MPS VI:</b>	Mucopolisacaridosis tipo VI
<b>MPS VII:</b>	Mucopolisacaridosis tipo VII
<b>NaCl:</b>	Cloruro de sodio
<b>ng:</b>	Nanógramos
<b>nm:</b>	Nanómetros
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa

<b><i>pmol:</i></b>	Picomol
<b><i>PSA:</i></b>	Persulfato de amonio
<b><i>RFLPs:</i></b>	Polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción
<b><i>Sp1:</i></b>	Región del ADN
<b><i>TBE:</i></b>	Buffer compuesto por trisma base, ácido bórico y etilen diamino tetraacético
<b><i>TE:</i></b>	Buffer compuesto por trisma base y etilen diamino tetraacético
<b><i>TEMED:</i></b>	N,N,N' - tetrametil etilendiámino
<b><i>U:</i></b>	Unidad
<b><i>UV:</i></b>	Ultravioleta
<b><i>V:</i></b>	Volts
<b><i>VNTR:</i></b>	Número variable de repeticiones en tandem

# G L O S A R I O

***$\alpha$ -L-iduronidasa:*** Enzima lisosomal, deficiente en pacientes con MPS I cuya función es remover los residuos del ácido  $\alpha$ -L- idurónico del dermatán sulfato y heparán sulfato

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

***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 (-NH<sub>2</sub>) 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, 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.

**Biotecnología:** El uso industrial de organismos vivientes técnicas biológicas desarrolladas a través de investigación básica. Productos de biotecnología incluyen ADN recombinante.

**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.

**Carácter:** Algún atributo de los individuos de una especie par que pueda identificarse varias formas distintas heredables.

**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 ( $X^2$ ):** Procedimiento estadístico que se emplea para determinar si las diferencias entre conjuntos de frecuencia observadas exceden a las que se esperarían por azar si los conjuntos se extrajeran de forma aleatoria de una única 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

**Codón sin sentido:** Secuencia de tres nucleótidos en una molécula de ARNm que señala terminación de la transcripción. Par de Base dos bases nitrogenadas (Adenina y Timina o Guanina y Citocina) unidas por medio de puentes de hidrógeno. El ADN forma una doble hélice por medio de la unión de estas bases nitrogenadas.

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

**Condroitín 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.

**Corrimiento del marco de lectura:** Mutación debida a la inserción o deleción de un número de pares de nucleótidos en el ADN, cuyo efecto es cambiar la fase de lectura de los codones en una molécula de ARNm durante la síntesis de proteínas, produciendo una síntesis anormal de aminoácidos a partir del sitio de la mutación.

**Cromosoma:** Estructura filiforme localizada en el núcleo de las células, 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.

**Deleción:** Tipo de mutación originada por la remoción de uno o más nucleótidos del gen o cromosoma. Pérdida de uno o más pares de nucleótidos adyacentes en un cromosoma.

**Dermatán sulfato:** Compuesto por unidades alternas de  $\alpha$ -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.

**Duplicación en tandem:** Tramos cromosómicos idénticos adyacentes.

**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.

**Exonucleasa:** Enzima que digiere una molécula de ácido nucleico a partir de un extremo.

**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.

**Fenótipo:** 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 citosina 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 exones de un gen.

**Keratán sulfato:** Polímero formado por  $\beta$ -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.

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

**Mutación de construcción recorrida:** Mutación que agrega o quita pares de bases del ADN de modo que el código genético se lee fuera de fase.

**Mutación de sentido equivocado:** Mutación que cambia un codón para un aminoácido en un codón para un aminoácido diferente.

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

**Mutación puntual:** Mutación que puede ser localizada en un locus específico.

**Mutación sin sentido:** Mutación que altera un gen al generar un codón sin sentido.

**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.

**Promotor:** Región de una molécula de ADN en donde se une la ARN polimerasa para que se inicie la etapa de transcripción.

**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 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.

**RNA polimerasa DNA dependiente:** Enzima que fabrica ARN a partir de un molde de ADN (transcripción)

**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).

**Sitio:** Posición de una mutación dentro de un gen

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

**Sustitución de un aminoácido:** Reemplazo de un aminoácido por otro en una posición específica en un polipéptido, debido a una alteración en la información genética.

**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 aparea con la adenina

**Transición:** Mutación de substitución de una base donde una pirimidina reemplaza a otra pirimidina y/o una purina reemplaza a otra purina.

**Transversión:** Mutación de substitución de una base donde una pirimidina es reemplazada por una purina o viceversa.

**Varianza génica:** Varianza fenotípica debida a la presencia de distintos genotipos en la población.

**Varianza:** Medida de la dispersión de una distribución alrededor de la clase intermedia, media de los cuadrados de las desviaciones de las distintas observaciones respecto del valor de la media.

**VNTR:** Secuencia de ADN que se repite varias veces en forma de tandem (una de tras de otra), se utiliza como marcador genético.