

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN LA SECUENCIA DE
ADN EN LA REGIÓN PROMOTORA DE LOS GENES
GLOBÍNICOS γ EN PACIENTES CON Hb S**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

EDUARDO ISRAEL DE LA CRUZ SALCEDO

DIRECTOR

DR. EN C. FRANCISCO JAVIER PEREA DÍAZ

GUADALAJARA, JALISCO, ENERO DE 2007



Universidad de Guadalajara

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*

903/ C. C. BIOLOGÍA

**C. EDUARDO ISRAEL DE LA CRUZ SALCEDO
PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **"IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN LA SECUENCIA DE ADN EN LA REGIÓN PROMOTORA DE LOS GENES GLOBÍNICOS y EN PACIENTES CON Hb S,"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DR. FRANCISCO JAVIER PEREA DÍAZ** y el Asesor/a es el/la: **DR. BERTHA IBARRA CORTES.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 21 de Noviembre del 2006.

"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.

Don Benito Juárez García"

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**M en C. ISELA LETICIA ALVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



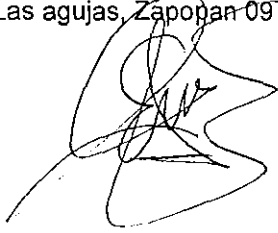
COORDINACIÓN DE TITULACIÓN Y CARRERA DE LICENCIATURA EN BIOLÓGICA

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad: TESIS O INFORMES, opción TESIS con el título: "Identificación de cambios en la secuencia de ADN en la región promotora de los genes globínicos y en pacientes con Hb S" que realizó el/la pasante Eduardo Israel de la Cruz Salcedo con número de código E01005812 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

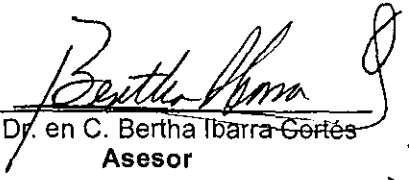
Atentamente
 Las agujas, Zapopan 09 de Enero de 2007



Firma
 Nombre: Dr. en C. Francisco Javier Perea Díaz
 Director del trabajo



Firma
 Nombre: Dr. en C. Bertha Ibarra Cortés
 Asesor



V. B. I.
9/Ene/06

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Carlos Álvarez Moya <i>10/01/07</i>	<i>CarvA</i>	
Anne Santerre Lucas	<i>ASanterre</i>	9 enero 2007
Alma Rosa Villalobos Arámbula <i>10/01/07</i>	<i>Alma Rosa Villalobos</i>	9 01 07
Supl. Sergio Álvarez Barajas <i>8/10</i>	<i>S. Álvarez</i>	9-01-07

BIBLIOTECA CUCBA

SEDE:

Este trabajo se realizó en el laboratorio de bioquímica II de la división de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), ubicado en el Centro Medico Nacional de Occidente (CMNO) que pertenece al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

DIRECTOR

Dr. en C. Franciso Javier Perea Díaz.

ASESOR

Dr. en C. Bertha Ibarra Cortés

SINODALES

Dra. Anne Santerre Lucas – Sinodal Titular

Dr. Carlos Álvarez Moya – Sinodal Titular

Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula – Sinodal Titular

Biol. Sergio Álvarez Barajas – Sinodal Suplente

COLABORADORES

Dr. en C. María Teresa Magaña Torres

Dr. en C. Josefina Yoaly Sánchez López

M. en C. María Paulina Nava Rodríguez

Q.F.B. Karina Rubí Morales González

Q.F.B. José Ángel Regla Nava.

T.Q. María de la Luz Chávez Velasco.

*Lo importante es ser capaz, en cualquier momento,
de sacrificar lo que somos por aquello en lo que podríamos convertirnos.*
Charles Dubois

*Educación no es dar carrera para vivir,
sino temprar el alma para las dificultades de la vida*
Pitágoras

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Por que en cada momento me brindaron su apoyo y confianza, por su bendición y consejos que durante este tiempo fueron su valioso esfuerzo y sus palabras las que me dieron el coraje para cumplir esta meta, este logro también es suyo...

A mis hermanos

Juan y Ángel por su particular forma de apoyarme a través de este tiempo, por su esfuerzo de mantenernos juntos y darme momentos de alegría.

A ti Aurora

Por estar a mi lado en esta etapa de mi vida, por enseñarme el significado de la palabra amor y por darme numerosos momentos de felicidad.

A mis amigos

Yeyo, Javier, Vinicio, Blanca, Chavo, Gio, Kary, Adriana y Pavel, han sido mi segunda familia y los que ante las dificultades estuvieron a mi lado alentándome a seguir adelante.

A mi director de Tesis,

Dr. en C. Francisco Javier Perea Díaz, por brindarme su amistad, paciencia y orientarme a través de esta etapa que hoy concluyo.

A mi alma mater

Por hacerme sentir el orgullo de ser parte de la Universidad y al CUCBA por ser mi segunda casa durante tanto tiempo

A mi país

México, que me ha brindado la oportunidad de formarme como profesional

A la Dra. Bertha Ibarra

Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y asesorarme en la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio

Kary, Paulina, Lucy, Regla, Tintos y Felipe por hacerme amenas las horas de trabajo.

A mis sinodales

Por el apoyo y tiempo que me han otorgado en la revisión de este trabajo.

A todos los que de alguna manera me han apoyado para concluir esta etapa

GRACIAS!!

ABREVIATURAS

2-3 DPG	2-3 Difosfoglicerato
À	Armstrong
aa	aminoácido
AD	Anemia Drepanocítica
AI	Árabe Indú
Ala	Alanina
ARNhn	ARN heterogéneo nuclear
ARNm	ARN mensajero
Asp	Acido aspártico
BAN	Bantú
BEN	Benin
CAM	Camerún
CIBO	Centro de Investigación Biomédico de Occidentes
Cl	Elemento Químico Cloro
CMNO	Centro Medico Nacional de Occidente
CO₂	Dióxido de Carbono
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DNA_{amp}	Acido Desoxirribonucleico amplificado
dNTP's	desoxinucleótidostrifosfatados
EKLF	Factor Transcripcional de Células Eritroides
Fe	Elemento químico Hierro
fL	Fentolitros
g	Gramos
glob β	Globinas alfa
glob-no α	Globinas no alfa
glob-α	Globinas alfa
Glu	Acido Glutámico
Gly	Glicina
Hb A	Hemoglobina Adulta
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb	Hemoglobina
Hp	Haplotipo
HS40	Región controladora de los genes α
Ile	Isoleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IVS	Intrón
K	Elemento químico Potasio
Kb	Kilobases
Kdal	Kilodalton
mA	Milia-Amperes
mg	Mili-gramo
min	Minutos
ml	Mili-litros
mM	Mili-Molar
O₂	Oxigeno
°C	Grados Centigrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH	Potencial de Hidrogeno
PHHF	Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal
RCL	Región Controladora del Locus
RF	Región Flanqueadora
rpm	Revoluciones por Minuto
SEN	Senegal
tal	talasemia
TBE	Tris Boratos EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamina
Thr	Treonina
UV	Luz Ultra Violeta
Val	Valina
µg	Micro-gramos
µl	Micro-litros

INDICE

	Pag
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1 EL ERITROCITO.....	1
2. LA HEMOGLOBINA Y SU ESTRUCTURA.....	1
2.1 Evolución de la hemoglobina.....	2
2.2 Tipos de hemoglobina	3
3. ESTRUCTURA DE LOS GENES GLOBÍNICOS	5
3.1 Genes globínicos α	5
3.2 Genes globínicos β	6
3.3 Estructura interna de los genes globínicos	7
3.4 Genes globínicos γ	8
3.5 Polimorfismos de los genes globinicos.....	8
3.6 Polimorfismos de los genes globinicos γ	9
4. HEMOGLOBINOPATÍAS	10
4.1 Hemoglobinopatías estructurales.....	11
4.1.1 Hemoglobinas inestables.....	11
4.1.2 Alteración en la afinidad por el O ₂	12
4.1.3 Metahemoglobina.....	12
4.2 Síndromes talasémicos.....	12
4.3 Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF).....	13
5. HEMOGLOBINA S.....	14
6. ANEMIA DREPANOCÍTICA.....	15
6.1 Características clínicas de la AD	16
6.2 Origen del gen β^S	16
6.3 Distribución y frecuencia de la AD en el mundo.....	17
6.4 La anemia drepanocítica en México.....	18
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
III. HIPOTESIS.....	20
IV. OBJETIVOS.....	20
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
VI. DIAGRAMA DE FLUJO.....	35

VII. RESULTADOS.....	36
VIII. DISCUSIÓN.....	42
IX. CONCLUSIONES.....	44
X. BIBLIOGRAFÍA.....	45

INDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Configuración espacial de la molécula de Hb.....	2
Figura 2. Evolución de la Hb.....	3
Figura 3. Etapas de síntesis de las diferentes Hb normales.....	4
Figura 4. Esquema de la familia de genes globínicos α	5
Figura 5. Esquema de la familia de genes globínicos β	6
Figura 6. Estructura interna de un gen globínico β	7
Figura 7. Diferencias bioquímicas entre los genes globínicos γ^G y γ^A	8
Figura 8. Hp del gen β	9
Figura 9. Patogénesis de la Anemia Drepanocítica.....	15
Figura 10. Distribución mundial de la Hb S.....	18
Figura 11. Distribución de la BBV S en México.....	19
Figura 12. Secuencia del gen globínico γ^G	24
Figura 13. Secuencia del gen globínico γ^A	25
Figura 14. Patrón de bandeado esperado para digestión con <i>XmnI</i>	31
Figura 15. Amplificado de los genes γ en gel de agarosa 2%	36
Figura 16. Patrones de migración A, B y C en gel de poliacrilamida 15% del gen globínico γ^G	37
Figura 17. Patrones de migración D y E en gel de poliacrilamida 10% del gen globínico γ^G	37
Figura 18. Productos de digestión con <i>XmnI</i>	38
Figura 19. Patrones de migración I, II y III en gel de poliacrilamida 10% del gen globínico γ^A	39
Figura 20. Patrones de migración IV y V en gel de poliacrilamida 10% del gen globínico γ^A	39
Figura 21. Secuenciograma del gen globínico γ^G	40
Figura 22. Secuenciograma del gen globínico γ^A	41

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Tipos de Hemoglobina que se sintetizan durante el desarrollo...	4
Tabla 2. Cambios en la secuencia de nucleótidos de los genes γ^G y γ^A ...	10
Tabla 3. Clasificación clínica de las Hemoglobinopatías.....	14
Tabla 4. Estimado de individuos con Hemoglobinopatías en el mundo	17
Tabla 5. Programa general de PCR.....	22
Tabla 6. Elementos principales de la PCR	22
Tabla 7. Componentes de la PCR _{mix}	22
Tabla 8. Componentes de los DNTP's	23
Tabla 9. Elementos de la PT _{mix}	23
Tabla 10. Preparación del gel de agarosa	26
Tabla 11. Preparación del jugo azul	26
Tabla 12. Componentes del buffer TBE 10X.....	27
Tabla 13. Componentes para preparar poliacrilamida 40% (rel 39:1).....	28
Tabla 14. Condiciones de preparación del gel de poliacrilamida 15%.....	28
Tabla 15. Condiciones de preparación del gel de poliacrilamida 10%.....	28
Tabla 16. Resultados de digestión con enzima XmnI	38

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ERITROCITO

Los eritrocitos normales son discos bicóncavos con un diámetro medio de aproximadamente $7.8 \mu\text{m}$ y en el centro de $1 \mu\text{m}$. El volumen de los hematíes es de 90 fL . El género y la altitud a la que vive la persona afecta al número de eritrocitos. En los varones normales, el número de eritrocitos por mm^3 es de $5'200,000 (\pm 300,000)$ y en las mujeres normales de $4'700,000 (\pm 300,000)$ (Guyton, 1997)

2. LA HEMOGLOBINA Y SU ESTRUCTURA

La Hemoglobina (*Hb*) es el componente mayoritario de los eritrocitos maduros cuya función principal es la oxigenación de los tejidos, la cual puede realizar gracias a su capacidad para fijar reversiblemente el oxígeno (O_2) molecular, ya que de ésta forma es transportado desde los pulmones hasta los tejidos, de igual manera contribuye también al transporte de anhídrido carbónico (CO_2) desde los tejidos a los pulmones lo cual contribuye con la regulación del pH sanguíneo (Sans-Sabrafen, 2002). Normalmente los varones presentan una Hb de 16.0 g/dL y las mujeres de 14.0 g/dL (Guyton, 1997).

La Hb humana tiene una masa molecular aproximada de $64.5 \text{ Kilodaltons (Kdal)}$. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas denominadas globinas (Figura 1A). Dos son conocidas como globinas alfa ($\text{glob-}\alpha$) con una masa molecular de 15.7 Kdal cada una, y las restantes denominadas globinas no α ($\text{glob-no } \alpha$) o semejantes a beta ($\text{glob-}\beta$) de 16.5 Kdal . Cada globina tiene un grupo prostético localizado en la cavidad hidrofóbica y es denominado *heme* con una masa molecular de 614 daltones (Figura 1B) y formado por cuatro anillos pirrólicos unidos por enlaces covalentes, y un átomo de Hierro (Fe^{+2}) en la parte central unido por dos enlaces covalentes y dos secundarios (Bunn, 1986).

El conjunto de las 4 globinas forma un elipsoide con una estructura tetraédrica de $64 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$ (Figura 1A). Las cuatro subunidades están unidas por medio de enlaces débiles como: puentes de hidrógeno, interacciones no

polares tipo Van der Waals, y enlaces salinos. Todos estos enlaces químicos son esenciales para mantener la estructura molecular y algunos de ellos tienen una función fundamental en el mecanismo de captación y transporte de O₂ (Bunn, 1986).

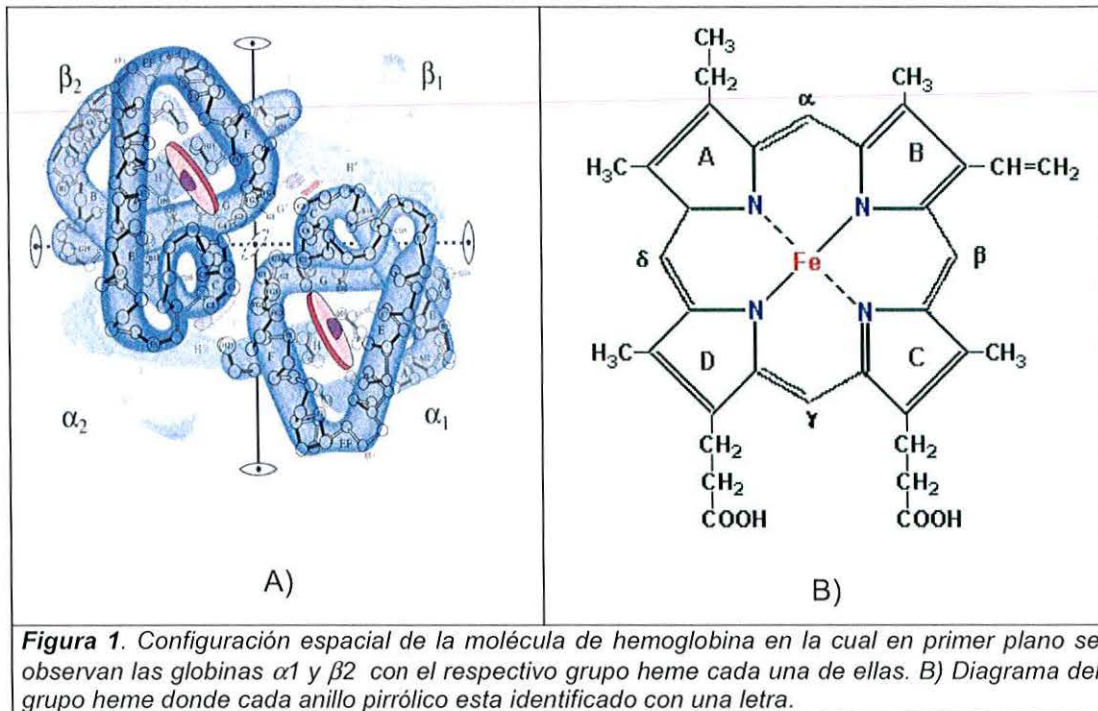
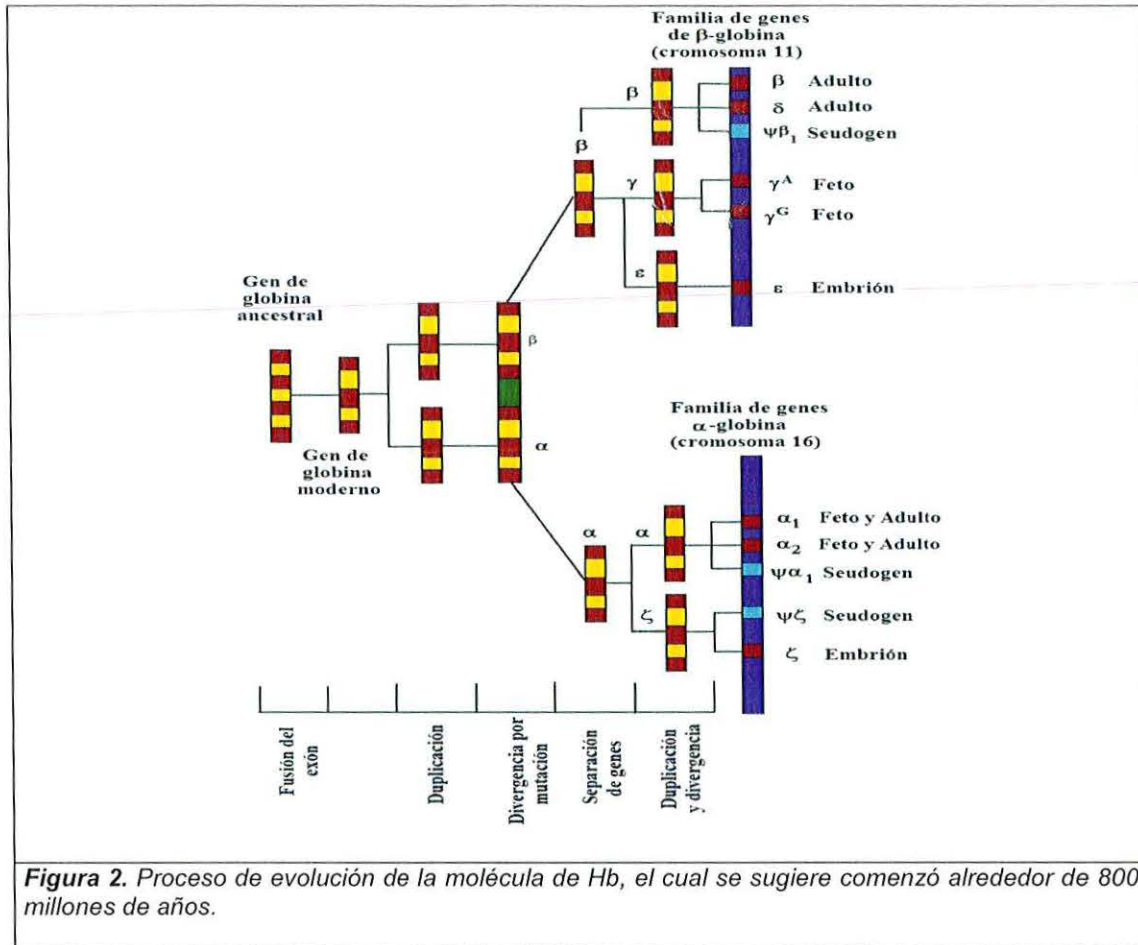


Figura 1. Configuración espacial de la molécula de hemoglobina en la cual en primer plano se observan las globinas α_1 y β_2 con el respectivo grupo heme cada una de ellas. B) Diagrama del grupo heme donde cada anillo pirrólico está identificado con una letra.

2.1 EVOLUCIÓN DE LA HEMOGLOBINA

El curso de evolución de la Hb propone que éste polipéptido surgió de una forma ancestral de la mioglobina hace unos 800 millones de años. Estudios realizados han revelado que algunos peces primitivos solo tienen un gen de Hb lo que sugiere que dichos peces se separaron de otras estirpes de vertebrados antes de la duplicación del gen. Posterior a este evento, se admite que hace 500 millones de años el gen se diversificó por mutación para formar dos tipos de globinas (α y β). Luego de este suceso se cree que los genes de globinas α y β se separaron a cromosomas distintos mediante procesos como la transposición o la translocación. Esta serie de eventos provocó que cada gen sufriera duplicaciones y divergencias subsecuentes lo cual llevó a observar la organización actual de los genes globínicos en los seres humanos (Karp, 1998). En la Figura 2 se esquematiza el proceso de evolución que pudo haber seguido la Hb humana.



2.2 TIPOS DE HEMOGLOBINA

Durante el desarrollo del organismo humano se sintetizan diferentes tipos de Hb, éstas aparecen en un orden fijo y rigurosamente determinado, por lo que se concluye que en cada etapa resultan necesarias distintas Hb's capaces de responder a la situación en la cual son capaces de cumplir su función, la Tabla 1 muestra las distintas Hb's que se sintetizan durante el desarrollo del organismo humano (Colombo, 1981).

Las globinas humanas esta codificadas en un grupo complejo de genes globínicos divididos en dos familias génicas: a) la familia de los genes globínicos α , constituida por los genes: zeta (ζ), alfa-2 (α_2), alfa-1 (α_1); y b) la de los genes globínicos semejantes a β , están formados por los genes: épsilon (ϵ), gamma-G (γ^G), gamma-A (γ^A), delta (δ) y beta (β). (Colombo, 1981).

Tabla 1. Distintas Hb's que se sintetizan en las tres etapas del desarrollo humano, así como las cadenas que conforman cada Hb; en la etapa embrionaria se sintetizan las Hb's Gower 1 y 2, y la Hb Portland; en la etapa fetal únicamente se sintetiza la Hb F y finalmente en la etapa adulta se sintetizan dos Hb's durante este período como son la Hb A y la Hb A₂ que se sintetizan constantemente .

ETAPA	TIPO DE Hb	ESTRUCTURA
Embrionaria	Hb Gower 1	ζ_2/ϵ_2
	Hb Gower 2	α_2/ϵ_2
	Hb Portland	ζ_2/γ_2
Fetal	Hb F	α_2/γ_2
Adulta	Hb A	α_2/β_2
	Hb A ₂	α_2/δ_2

El patrón de aparición y desaparición de estas Hb's durante el desarrollo (Figura 3) sugiere la existencia de mecanismos que regulan la expresión de un gen y excluye la actividad de otros (Colombo, 1981). Éstos ocurren cuando las globinas ζ y ϵ son reemplazadas por las α y γ ($\zeta \rightarrow \alpha$, $\epsilon \rightarrow \gamma$) respectivamente, esto se presenta casi de manera simultánea alrededor del tercer mes de desarrollo embrionario, mientras que las globinas β reemplazan casi por completo a las globinas γ ($\gamma \rightarrow \beta$), lo anterior comienza antes del parto y termina alrededor de los 6 a 12 meses de vida (Ibarra, 2001).

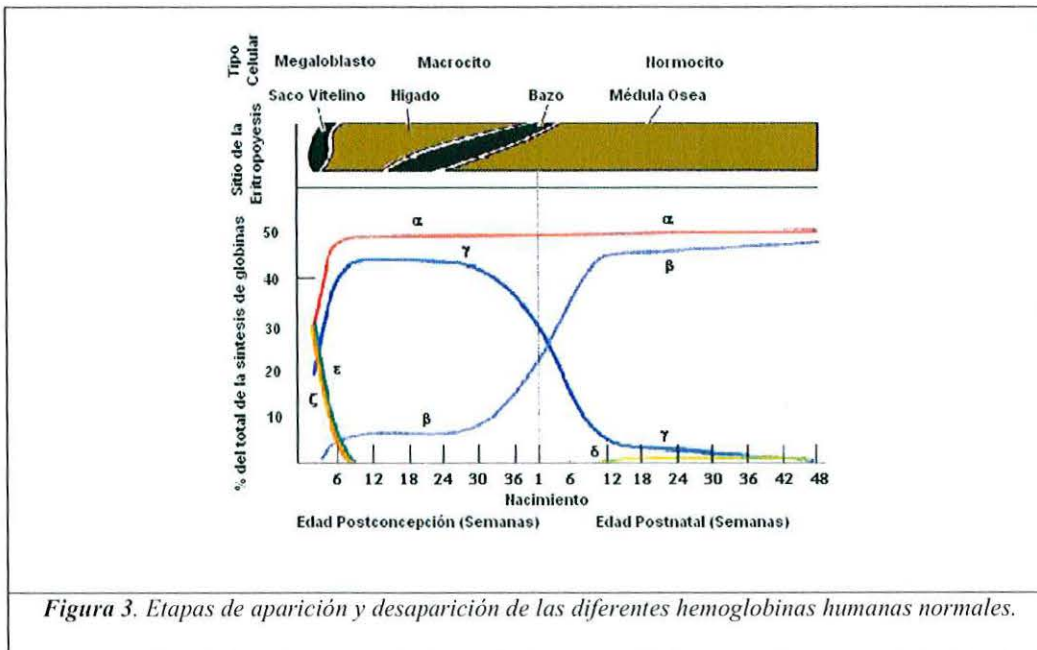


Figura 3. Etapas de aparición y desaparición de las diferentes hemoglobinas humanas normales.

3. ESTRUCTURA DE LOS GENES GLOBÍNICOS

Los genes globínicos son unidades activas que dan origen a las diferentes Hb's, se localizan en dos cromosomas distintos de acuerdo a la familia a la cual pertenecen, dichos genes se hayan limitados en su expresión de acuerdo al orden espacio-temporal en el cual es requerida su actividad para el correcto desarrollo del ser humano.

En total existen ocho genes globínicos funcionales y cinco genes inactivos o pseudogenes agrupados en dos familias (Ibarra, 2001): la Familia de genes globínicos α y la Familia de genes globínicos no α o semejantes a β .

3.1 GENES GLOBÍNICOS α

Esta familia se encuentra localizada en el cromosoma 16 p13.3, en una región de aproximadamente 40 Kb de longitud, esta conformado por cuatro genes: ζ , α_2 , α_1 y θ de los cuales solo los tres primeros son funcionales (Figura 4). El gen ζ únicamente se expresa en la etapa embrionaria y los genes α_2 y α_1 se expresan desde la etapa fetal hasta la fase adulta, mientras que el gen θ no se ha demostrado que forme una proteína estable. Además de los genes antes mencionados, en esta región se encuentran tres pseudogenes: $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, y $\psi\alpha_1$. A 40 Kb del gen embrionario ζ en el extremo 5' se encuentra una región denominada HS40 que está relacionada con la regulación de la expresión génica de esta familia, el arreglo de estos genes globínicos α es de manera ontogénica (Ibarra, 2001).

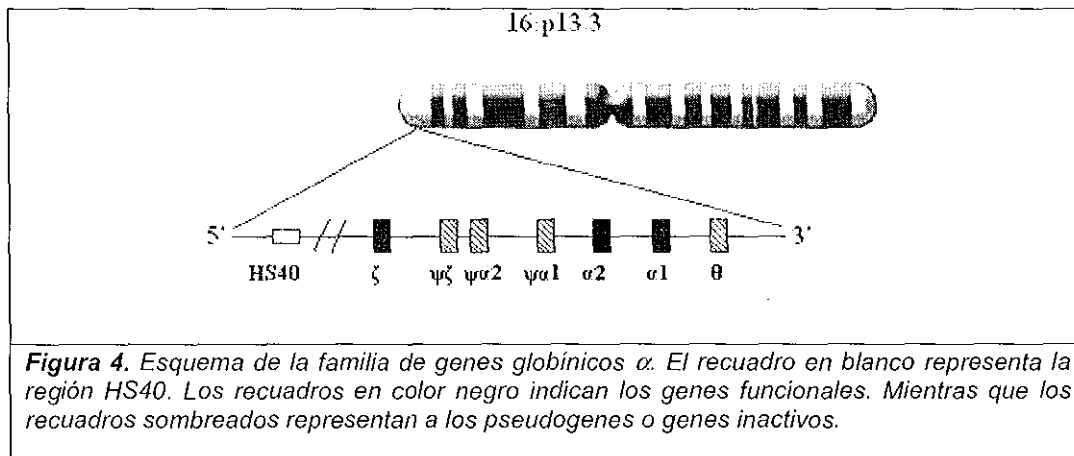
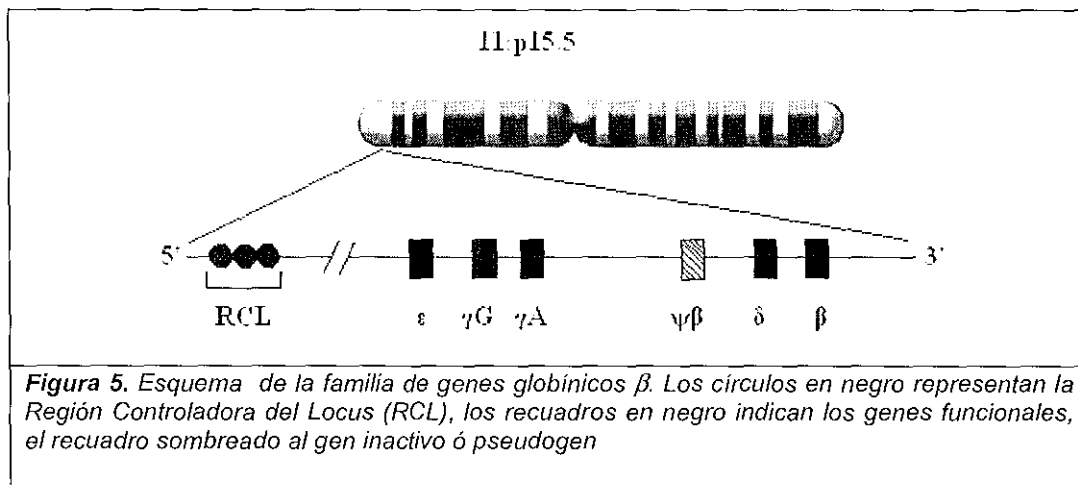


Figura 4. Esquema de la familia de genes globínicos α . El recuadro en blanco representa la región HS40. Los recuadros en color negro indican los genes funcionales. Mientras que los recuadros sombreados representan a los pseudogenes o genes inactivos.

3.2 GENES GLOBÍNICOS β

La familia de los genes globínicos no α o semejantes a β se encuentra localizada en el cromosoma 11 en la región p15.5 y abarca un segmento de 70 Kb. Dicha familia está constituida por cinco genes funcionales llamados ϵ , γ^G , γ^A , δ , y β , además de un pseudogen denominado $\psi\beta$ que está localizado entre los genes γ^A y δ (Thein, 2005). Alrededor de 10 a 20 Kb hacia el extremo 5' del gen globínico ϵ existe una zona conformada por cuatro sitios hipersensibles a la enzima DNA_{asa} , conocida como *región controladora del locus* o RCL (Figura 5) que tiene tres funciones:

- 1) Organizar el dominio de cromatina activa en células eritroides para la expresión ontogénica de los genes globínicos;
- 2) Regula la actividad transcripcional de forma espacio temporal y,
- 3) Actuar como un amplificador de la transcripción de dichos genes (Ibarra, 2001).



3.3 ESTRUCTURA INTERNA DE LOS GENES GLOBÍNICOS

El genoma humano es una molécula compleja que depende de la interacción coordinada de diversas unidades como son la región promotora, las regiones flanqueadoras (RF) y secuencias consenso para que éste sea capaz de realizar procesos como la transcripción, de igual manera su organización establece las condiciones en las cuales será expresado.

La región promotora está localizada en el extremo 5' de los genes globínicos (genes α y β), esta región no se transcribe y resulta indispensable para que la

expresión de éstos sea normal, el promotor de un gen globínico esta formado por las *cajas consenso* (Figura 6) que son elementos *cis* altamente conservados, estas cajas consenso son las secuencias 5'-CATAAA-AA-3' conocida como la caja TATA, la secuencia 5'-CCAAT-3' y la secuencia 5'-C(A ó T) CCC-3', estas cajas participan en procesos importantes como son la apertura de la doble hélice y unión del complejo de la transcripción así como para la unión del factor transcripcional específico de células eritroides conocido como EKLF (Ibarra, 2001). Se ha demostrado que el sitio para unión del EKLF resulta indispensable para que se lleve a cabo la transcripción del gen globínico β , y adicionalmente se ha demostrado que resulta necesario para la activación de los genes globínicos ϵ y γ (Omori, 2005).

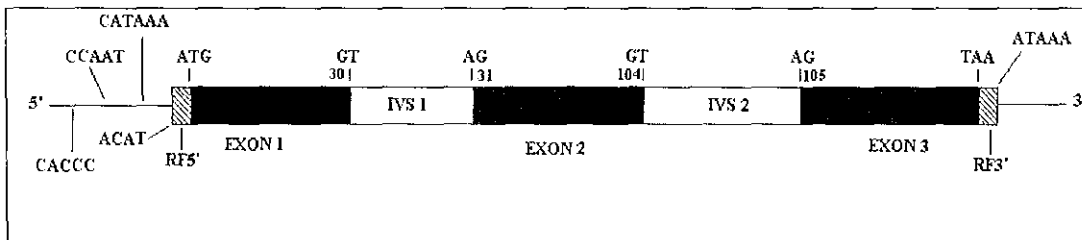


Figura 6. Estructura interna de un gen globínico β . En el extremo izquierdo, sobre la línea se señalan las cajas consenso en la región promotora de un gen globínico: 5'-CATAAA-3', 5'-CCAAT-3', 5'-CACCC-3'. En la RF5' se ubica la secuencia 5'-ACAT-3'. Los recuadros en color negro representan los exones mientras que los recuadros claros representan los intrones. En el límite de la RF5' y el exón 1 el codón de inicio de la traducción ATG, mientras que en el límite del exón 3 y la RF3' se encuentra el codón de terminación TAA. Las secuencias GT y AG establecen las fronteras entre los exones y los intrones. En la RF3' se encuentra la secuencia 5'-ATAAA-3'

Como se muestra en la Figura 6 las regiones flanqueadoras, que también se conocen como secuencias adicionales, no se traducen y forman parte del RNA nuclear y mensajero. La RF5' contiene la secuencia consenso 5'-ACA(T ó C)-3', mientras que en la RF3' se encuentra la secuencia consenso 5'-AATAAA-3' cuya función es señalar el sitio de unión de la enzima poliadenilato sintetasa (Ibarra, 2001).

En todos los genes globínicos existen 3 **exones** los cuales tienen como función codificar la secuencia de aminoácidos (aa). De igual manera que los exones en los genes globínicos existen intrones (IVS) de éstos solo existen dos (Figura 6) a los que también se les conoce como secuencias intercaladas, que se encargan de separar a los exones en el DNA y RNAhn (Ibarra, 2001).

3.4 GENES GLOBÍNICOS γ

Los genes globínicos γ^G y γ^A han sido motivo de estudio debido a que dentro de la región promotora de estos genes se han encontrado variantes en la secuencia de nucleótidos que han sido denominadas polimorfismos, estas variantes resultan de interés para entender las variaciones en el fenotipo clínico de β -Talasemia y Anemia Drepanocítica (AD) (Patrinos, 2001).

Los genes globínicos γ conforman la Hb F sintetizan dos tipos de globina los cuales se diferencian entre sí en la posición 136 de las cadenas γ^G está presente una glicina mientras que en las cadenas γ^A esta presente alanina; además la cadena γ^A presenta una variante en la posición 75 que resulta en el cambio de isoleucina por treonina como se muestra en la Figura 7 (Bunn, 1986). En humanos la expresión de los genes globínicos γ dan origen a aproximadamente al 1% de Hb F, en pacientes con Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF) existe un incremento en los niveles basales de globinas γ del 5 – 20% (Omori, 2005).

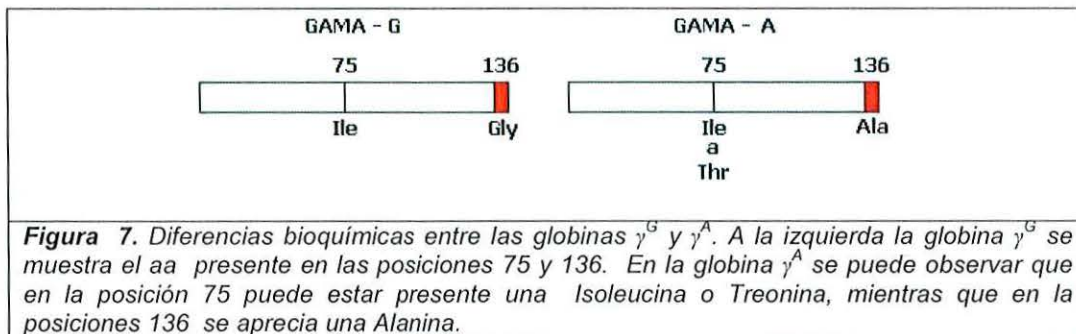
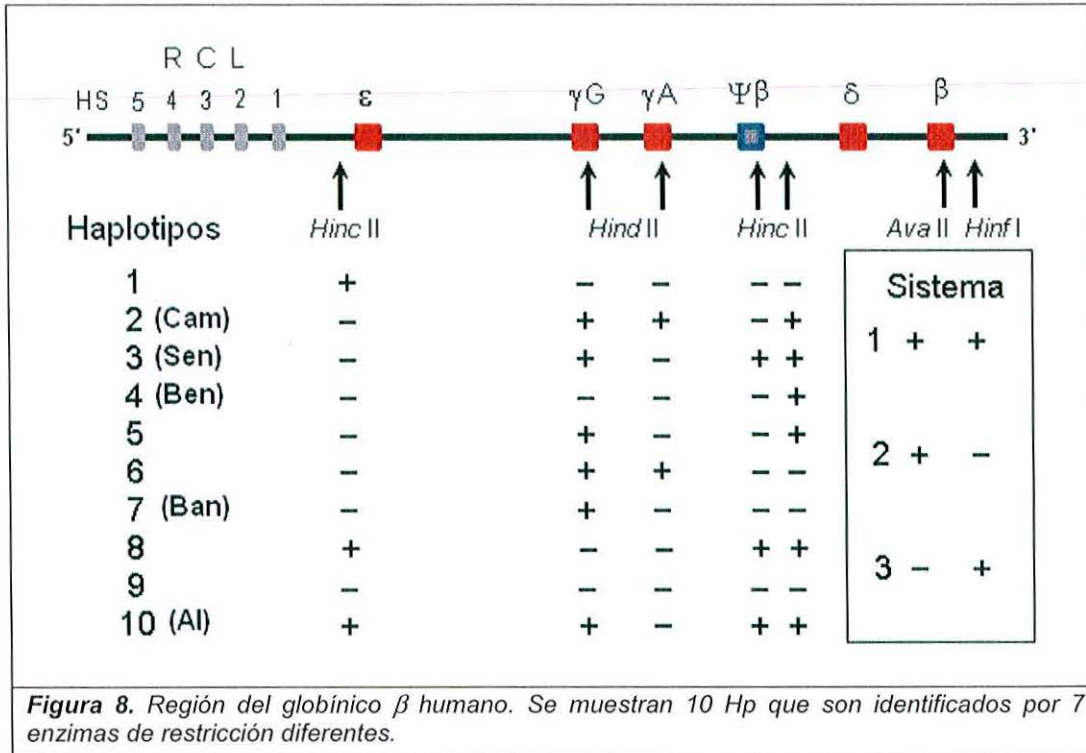


Figura 7. Diferencias bioquímicas entre las globinas γ^G y γ^A . A la izquierda la globina γ^G se muestra el aa presente en las posiciones 75 y 136. En la globina γ^A se puede observar que en la posición 75 puede estar presente una Isoleucina o Treonina, mientras que en la posiciones 136 se aprecia una Alanina.

3.5 POLIMORFISMOS DE LOS GENES GLOBÍNICOS

Estudios poblacionales realizados en la secuencia de los genes globínicos ha mostrado variantes en la secuencia de nucleótidos detectadas por enzimas de restricción, que como se mencionó anteriormente, han sido denominadas polimorfismos al observarse con una frecuencia mayor al 1.0%. Se han descrito cerca de 17 sitios de restricción en la familia de los genes globínicos β de éstos se han seleccionado 7 para formar el denominado haplotipo (Hp), de los cuales 5 sitios forman en el subhaplotipo 5' y dos el subhaplotipo 3' (Figura 8). Un Hp es la combinación de los sitios polimórficos que conforman una región específica de un gen y son una herramienta útil que nos puede ayudar a

determinar la relación genética entre individuos, reconstruir la historia de una mutación desde su origen y seguir las rutas de migración de poblaciones (Flint, 1998).



3.6 POLIMORFISMOS DE LOS GENES GLOBÍNICOS γ

Los genes globínicos γ han sido sometidos a diversos estudios debido al papel importante que juegan en la PHHF, la cual podemos definir como una condición que se caracteriza por mantener la síntesis de globinas γ en la etapa adulta debido a un error en la regulación génica (Li, 2001). Al ser sometidos a secuenciación los genes γ , se ha encontrado que en la región promotora de dichos genes existen cambios en la secuencia de nucleótidos, algunos se han asociado a la AD como moduladores de la enfermedad a través de la interacción que tienen con la Hb F. En la tabla 2 se muestran los diferentes cambios descritos en la región promotora de los genes globínicos γ^G y γ^A (Regla, 2006).

La mutación -198 (T \rightarrow C) es una variante Británica de la PHHF no delecional, de la cual existe evidencia de que participa en la sobre-regulación de la expresión de los genes γ . La mutación -175 (T \rightarrow A) esta asociada también a la

PHHF caracterizada por niveles de Hb F del rango entre 20 – 40% en heterocigotos, a esta mutación se le atribuye la participación en el incremento en la intensidad del promotor de los genes γ .

Tabla 2. Cambios de nucleótidos reportados en la región promotora de los genes γ^G y γ^A

Gen γ^G	Gen γ^A
-202 (C → G)	-588 (A → G)
Ins en -200 (G)	-499 (T → A)
-198 (T → C)	-202 (C → T)
-175 (T → C) o (T → A)	-198 (T → C)
-158 (T → C)	-196 (C → T)
	-195 (C → G) o (C → T)
	-175 (T → C)
	-117 (G → A)
	-114 (C → T)
	del -114 a -102
	del -225 a -222

La mutación -117 (G → A) se asocia al fenotipo Griego de la PHHF, la cual se caracteriza por una producción de 10 – 20% en adultos portadores de Hb F, de igual forma se le atribuye participar en un significativo incremento en los niveles de ARNm de los genes γ , así mismo estudios han demostrado que esta mutación afecta la secuencia CCAAT del gen γ^A (Li, 2001). La mutación -158 ha sido encontrada en cromosomas normales, con β -talasemia y en β^S , así como también se ha reportado evidencia que la mutación -158 (C → T) es responsable del incremento en los niveles de Hb F asociados a la PHHF bajo condiciones de estrés eritropoyético como se ha visto en pacientes con β -talasemia y AD (Efremov, 1994).

4. HEMOGLOBINOPATÍAS

Las hemoglobinopatías son alteraciones cualitativas o cuantitativas de la Hb originada por mutaciones genéticas, cuyas consecuencias pueden ser:

- Una modificación estructural debida al reemplazo de un aminoácido por otro en cualquiera de los exones de los genes globínicos,
- Disminución de la síntesis de una cadena globínica estructuralmente normal (talasemias),

- Alteraciones que modifican el reemplazo de Hb F por Hb A en la etapa adulta (Bustamante, 2002).

Se consideran hemoglobinopatías solo aquellas mutaciones que afectan regiones esenciales de la molécula y que, por tanto, poseen expresividad clínica (Sans-Sabrafen, 2002). Se ha estimado que cerca del 7% de la población mundial es portadora de alguna hemoglobinopatía y que cada año nacen en el mundo aproximadamente 300,000 – 400,000 niños con formas severas de estas enfermedades (Weatherall, 2001).

4.1 HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

Son el resultado de mutaciones al nivel de alguno de los genes que codifican la síntesis de una determinada cadena globínica: α , β , γ , δ , ϵ , y ζ . La alteración estructural puede ser explicada por la sustitución de una sola base en el triplete del codón correspondiente en el DNA del gen globínico. Unas pocas variantes tienen reemplazado un aminoácido en diferentes sitios dentro de la misma subunidad (Bunn, 1986).

Las variantes estructurales raras surgen a consecuencia de la delección de un nucleótido de un codón, lo que da lugar a un cambio en el marco de la lectura de los codones en sentido descendente, con la consiguiente delección de uno o mas residuos de aminoácido, o a la inversa, con extensión de la cadena polipeptídica por alterarse el codón final (Rapaport, 2002). Se reconocen tres tipos de alteraciones estructurales que serán descritas brevemente a continuación:

4.1.1 HEMOGLOBINAS INESTABLES

Son las variantes caracterizadas por una alteración estructural que causa una disminución de la estabilidad de la molécula, por lo que estas Hb pueden precipitar en los eritrocitos formando cuerpos de inclusión conocidos como cuerpos de *Heinz* (Colombo, 1981). Estas células poseen una menor capacidad de deformación y son eliminadas con mayor facilidad de la circulación, con el desarrollo de una anemia hemolítica (Rapaport, 2002). En la actualidad más de 100 diferentes variantes de Hb inestable han sido reportadas (Hardison, 2006)

de las cuales alrededor del 85 % corresponden a mutaciones en el gen β , hay cinco clases de mutaciones que conducen a la inestabilidad de la globina (Ibarra, 2001):

- Sustituciones en la cavidad del heme.
- Mutaciones que interfieren con la estructura secundaria.
- Inserción de residuos polares que interfieren con interacciones hidrófobas.
- Anormalidades estructurales.
- Interferencia con los contactos interglobinas.

4.1.2 ALTERACIÓN EN LA AFINIDAD POR EL O₂

La Hb tiene 2 estructuras cuaternarias: una para la desoxi-hemoglobina y otra para la oxi-hemoglobina. La sustitución de un residuo de aminoácido, situado en la zona de contacto $\alpha_1\beta_2$ en los alrededores del grupo heme o en el lugar de unión del 2-3 DPG puede causar un desplazamiento del equilibrio alostérico, dando lugar a este tipo de variante de Hb. Cuando este equilibrio se desplaza hacia la forma "relajada" hay aumento de la afinidad; por el contrario, cuando la forma "tensa" es la favorecida hay disminución en la afinidad por el O₂ (Colombo, 1981).

4.1.3 METAHEMOGLOBINA

Es el derivado oxidado de la Hb en que el Fe del heme se encuentra en la forma férrica (Fe⁺³) y no en la forma ferrosa normal (Fe⁺²), en esta situación, el Fe es incapaz de unirse reversiblemente con el O₂ y, por lo tanto, de transportar el gas. La metahemoglobina es funcionalmente inútil (Colombo, 1981). Pequeñas cantidades de metahemoglobina se forman de manera continua en los eritrocitos normales, debido a la interacción de la Hb con el ión superóxido (Rapaport, 2002).

4.2 SÍNDROMES TALASÉMICOS

Constituyen un grupo muy heterogéneo de trastornos caracterizados por alteraciones cuantitativas de la síntesis de cadenas polipeptídicas α o β de la Hb (Bunn, 1986). La disminución de la síntesis de cadenas α se denomina α -

talasemia, mientras que la disminución de cadenas β se denomina β -talasemia, características comunes a todos los síndromes talasémicos son las siguientes:

- Trastorno global de la síntesis de Hb, lo que da lugar a unos eritrocitos microcíticos e hipocrómicos.
- Producción desequilibrada de las cadenas de globina: ello conduce a la formación de tetrámeros de una sola cadena y niveles elevados de Hb A₂, Hb F o de ambas en β - talasemia (Rapaport, 2002).

4.3 PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL (PHHF)

Al igual que las talasemias es un grupo muy heterogéneo de condiciones hereditarias, éstas se caracterizan por la síntesis de Hb F en la vida adulta sin la presencia de manifestaciones clínicas ni alteraciones morfológicas severas. La persistencia de la síntesis de las cadenas γ es la alteración genética primaria, esta síntesis presenta una relación inversa a la síntesis de cadenas β , es decir, que en las células donde hay síntesis de cadenas γ no hay síntesis de cadenas β y viceversa (Colombo, 1981).

Los elevados niveles de Hb F son observados en el adulto en dos contextos diferentes y significativos, el primero está en un diverso grupo de mutaciones genéticas las cuales están unificadas fenotípicamente por la persistencia en la síntesis de Hb F después del nacimiento, y el segundo se observa en la reactivación de genes fetales en progenitores eritroides adultos observados en estrés eritropoyético, inducción de drogas y otras enfermedades (Jane, 1998).

En la actualidad se conocen mas de 945 variantes de Hb, la mayoría no tienen repercusión clínica y en realidad representan solo entre 10 a 15% de las variantes teóricamente posibles, éstas pueden ser entendidas mejor si son clasificadas de acuerdo a sus manifestaciones clínicas como se muestra en la Tabla 3 (Hardison, 2006).

Tabla 3. Variantes de Hb clínicamente importantes las cuales se clasifican en 5 grupos de acuerdo a las manifestaciones clínicas que presenta cada variante, estas a su vez se subdividen según las causas de dichas manifestaciones.

-
- I. Síndrome Drepanocítico
 - a) Rasgo de células falciformes
 - b) Enfermedad de células falciformes
 - 1. SS
 - 2. SC
 - 3. SD_{Los Ángeles}
 - 4. SO_{Arabe}
 - 5. S/β – Talasemia

 - II. Hemoglobinas inestables = Anemia congénita con cuerpos de Heinz

 - III. Hemoglobinas con afinidad anormal por el O₂
 - a) Alta afinidad = eritrocitosis familiar
 - b) Baja afinidad = Cianosis familiar

 - IV. Hemoglobinas M = Cianosis familiar

 - V. Variantes hiperinestables que resultan en un fenotipo talasémico
 - a) Fenotipo de β – Talasemia
 - b) Fenotipo de α – Talasemia
-

5. HEMOGLOBINA S

Dentro de las alteraciones estructurales de la Hb, existe una que por su importancia clínica e incidencia en la población mundial resulta de gran interés para su estudio. La Hb S es reconocida como el primer ejemplo de una enfermedad molecular (Ibarra, 2001).

La Hb S surge debido a la presencia de una valina en la posición 6 del gen β (Hb S $\alpha_2\beta_2^{6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}}$), normalmente se presenta un ácido glutámico y el cambio de aminoácido está dado por la mutación de una A→T en el codón número 6 (GAG→GTG) en el gen de la globina β (Bunn, 1986). La presencia de la valina conduce a la polimerización de la Hb en periodos de baja concentración de O₂. Por lo tanto el eritrocito se deforma al formarse largas fibras de la Hb polimerizada. La acumulación de eritrocitos deformados obstruye los vasos capilares afectando la microcirculación como se muestra en la Figura 9.

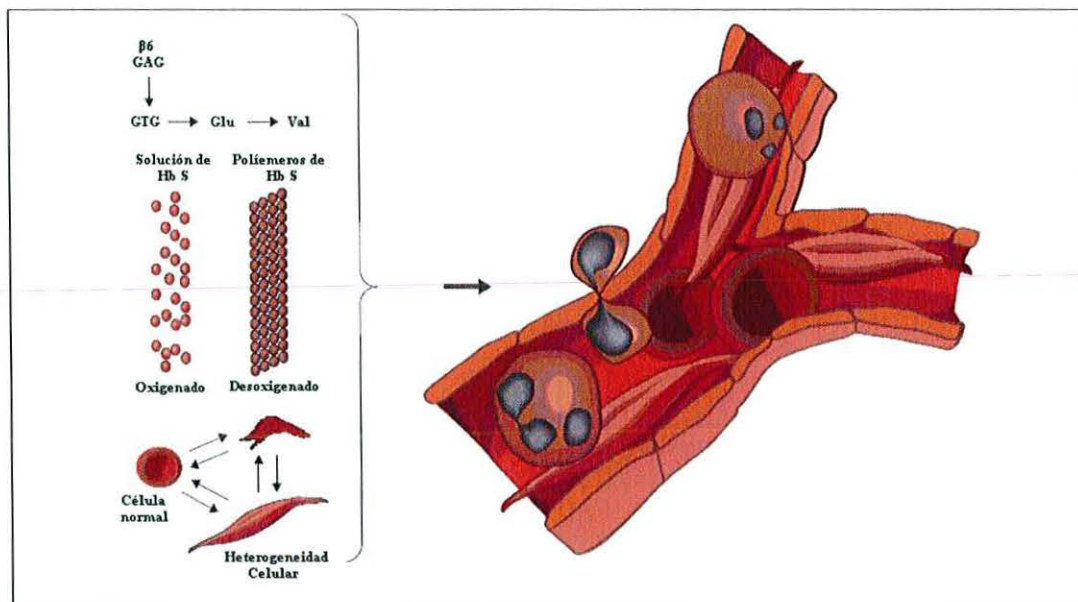


Figura 9. Esquema de la patogénesis de la AD. Se observa la mutación que ocurre en el codón 6 del gen globínico β así como el aminoácido que cambia debido a la mutación. De igual forma se observa la fibra de polímero formada por los eritrocitos falciformes comparado con eritrocitos normales así como el proceso de falciformación de la célula. A la derecha un esquema que representa la obstrucción que hacen los eritrocitos falciformes en la circulación sanguínea.

La interacción de algunas Hb como la Hb C, Hb D entre otras pueden incrementar la propensión de los eritrocitos a la falciformación (Beutler, 2001). Los factores que participan en la falciformación de la célula son: A) Un decremento del 20% de la curva de saturación de oxígeno; B) la presencia de un cotransportador de K^+ Cl^- y de canales Gardos en la membrana celular que contribuyen a la deshidratación de la célula (Muzyamba, 2006).

Las moléculas de Hb S desoxigenadas presentan una configuración que permite la interacción de la Valina en la posición $\beta 6$ de una molécula con Asparagina de la posición $\beta 73$, y el Acido Glutámico en $\beta 121$ de otra molécula o con ácido Glutámico en $\alpha 23$ de otra molécula. Este fenómeno produce la formación de fibras largas y gruesas que ocasiona la forma de hoz del eritrocito (Ibarra, 2001).

6. ANEMIA DREPANOCÍTICA

La AD o anemia de células falciformes es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva producida por la presencia de la Hb S (β^S/β^S). Sin

embargo también puede presentarse en combinación con otras variantes o con un rasgo de talasemia (Beutler, 2001).

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA AD

Los niveles de Hb en pacientes con AD usualmente están entre 5 y 11 g/dl. La anemia es de tipo normocrómica y normocítica, con una cuenta elevada de reticulocitos. La observación al microscopio hace evidente la presencia de eritrocitos falciformes (Beutler, 2001). Entre otras características de la enfermedad se encuentra Hemólisis, una deficiencia en el crecimiento, esplenomegalia, infecciones respiratorias repetidas y episodios de dolor conocidos como síndrome de mano-pie (Flint, 1998).

La severidad clínica o fenotipo de la enfermedad está relacionada con el Hp, por lo que se considera que los mas leves son el Hp SEN y AI, se consideran moderados o intermedios a los Hp's CAM y BEN mientras que el mas severo es el Hp BAN (Adekile, 2005).

Los Hp SEN y AI se han asociado con altos niveles de Hb F con un rango entre el 15-30%, mientras que los rangos de Hb F en los otros Hp se encuentra en el rango de <15% (Adekile, 2005).

6.2 ORIGEN DEL GEN β^S

La primera descripción de la AD data de 1910 y fue realizada por Herrick's (Weatherall, 2001). Los Doctores Kan y Dozy establecieron un origen de tipo dual para el gen β^S en el continente Africano lo que implicaba más de una región geográfica. Los hallazgos de Mears y colaboradores sugerían una diversidad mayor con la posibilidad de que el gen β^S podría haber surgido en tres lugares diferentes de África (Pagnier, 1984).

Con el estudio de numerosos pacientes de AD se encontró que la mutación β^S existe en su mayoría en 5 Hp que fueron nombrados por las regiones de África y Asia donde se encontró mas frecuente cada uno de ellos. Estos Hp son: Benin (BEN), Senegal (SEN), Bantú (BAN), Camerún (CAM) y Árabe-Indú (AI), éstos se hayan indicados en la Tabla 7 (Adekile, 2005).

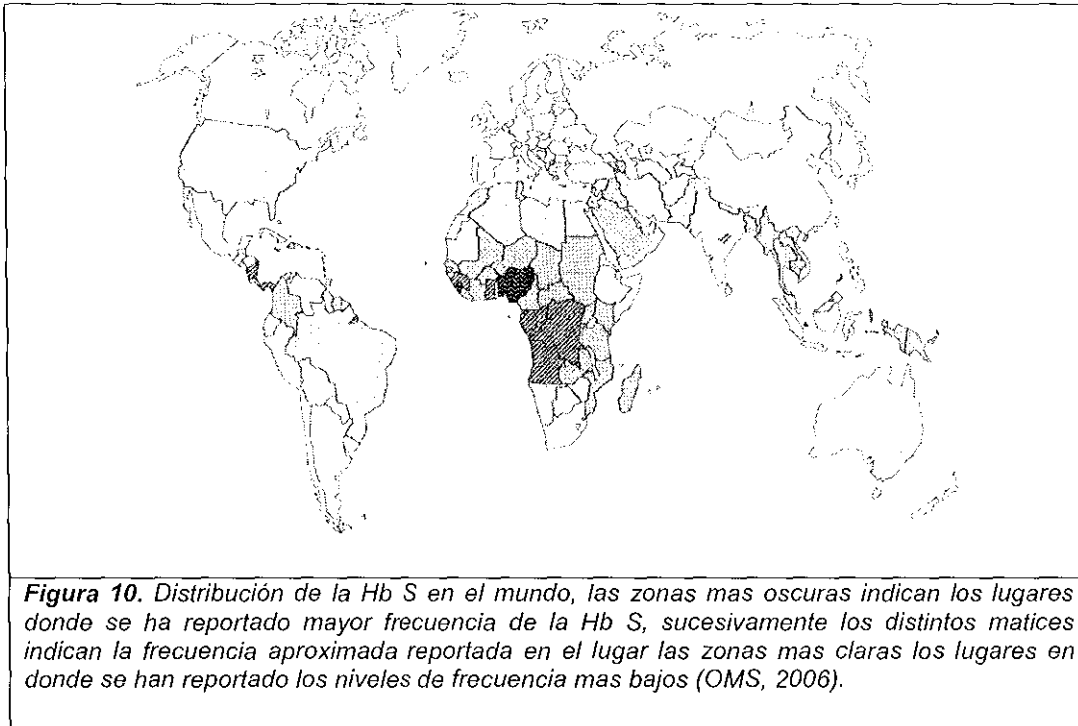
6.3 DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE LA AD EN EL MUNDO

La AD y las Talasemias (tal) representan un problema de salud pública debido a su alta frecuencia en algunas regiones del mundo (Tabla 6).

Tabla 4. Estimado del numero de nacimientos con formas severas o importantes de alguna hemoglobinopatía en el mundo.

AREA	POBLACIÓN (x 10 ⁶)	NACIMIENTOS (x 10 ⁶)	NACIMIENTO DE HOMOCIGOTOS Y/O DE HETEROCIGOTOS COMPUESTOS (x 10 ³)
África Sub-Sahariana	650	30	230
América	730	17.5	5
Sur-Este de Asia	3150	84	120
Este Mediterráneo y Europa	780	11	1.6
Pacífico Occidental	30	0.5	0.2
Total	5340	143	356.8

La AD es especialmente frecuente en personas con antepasados originarios del África sub-sahariana, la India, Arabia Saudita o los países mediterráneos. Con las migraciones humanas se ha incrementado la frecuencia del gen en el continente americano (OMS 2006). La prevalencia del rasgo drepanocítico oscila entre el 10% y el 40% en África ecuatorial, disminuye al 1% a 2% en la costa norte-africana y es <1% en Sudáfrica. En países de África occidental como Ghana y Nigeria, la frecuencia del rasgo es del 15% al 30%, mientras que en Uganda presenta acentuadas variaciones tribales, llegando al 45% en la tribu Baamba del oeste del país. En la Figura 10 se muestra la distribución de la Hb S en el mundo (OMS 2006). Esta distribución se debe a que el rasgo drepanocítico confiere una ventaja de supervivencia frente al paludismo, con el consiguiente aumento de la frecuencia del gen mutante en las zonas con elevada transmisión del paludismo (OMS, 2006).



6.4 LA ANEMIA DREPANOCÍTICA EN MÉXICO

En la Figura 11 se muestran las regiones de la Republica Mexicana en las cuales se ha reportado la mayor frecuencia de Hb S. La frecuencia del rasgo de AD en la región de la costa chica (Guerrero y Oaxaca) es de 12.8%, lo cual podría representar un problema de salud publica en la zona (Magaña, 2002). En estudios realizados en el estado de Veracruz se observó una frecuencia de 2.74% de portadores de Hb S (Morales-González, 2005), este dato difiere con estudios anteriores en esa misma región en los que se reportaba una frecuencia del 11% (Ibarra 2005).

En población seleccionada por el criterio de anemia hemolítica, la AD clásica es la mas frecuentemente observada con 58.1%, seguida de los heterocigotos compuestos β^S/β^{tal} (29%) y el resto esta representado por los heterocigotos compuestos para β^S y β^D (Ibarra, 2005).



En México se ha reportado que los Hp BEN, BAN y el Hp 9 están relacionados con el gen β^S con una frecuencia de 78.8, 18.2 y 3.0 % respectivamente. La posterior comparación de estos Hp con 17 poblaciones reveló una gran similitud con la población de la Republica Central de África, lo que sugiere que existen distintos orígenes del gen β^A y β^S de individuos mexicanos en la región de la costa chica (Magaña, 2002).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El laboratorio de Bioquímica II del Centro de Investigación Biomédica de Occidente ha estudiado por varios años pacientes con anemia hemolítica debida a la AD. Se ha observado que algunos de estos pacientes reportan incrementos de Hb F. La presencia del polimorfismo -158 en el gen globínico γ^G en algunos pacientes con talasemia beta (Bustos 1996, Sánchez 1998), Además de la descripción de 4 polimorfismos en el gen globínico γ^A que constituyen el Haplotipo γ^A (Patrinos, 2001). Estas observaciones nos llevan a proponer la siguiente pregunta de investigación, ¿Es posible reconocer los cambios que existen en la secuencia del ADN en la regiones promotoras de los genes globínicos γ en los pacientes Mexicanos con AD mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante?

III. HIPOTESIS

Existen cambios en la secuencia de ADN en la región promotora de los genes globínicos γ que son identificados por el comportamiento electroforético en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar cambios en la secuencia de ADN en las regiones promotoras de los genes γ^A y γ^G en pacientes con AD.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar patrones de migración electroforéticos anormales en la región promotora de los genes globínicos γ .
- Identificar la secuencia de ADN en los fragmentos que muestren una migración electroforética distinta.
- Identificar el polimorfismo -158 T→C con la enzima de restricción *XmnI* en los fragmentos que muestren una migración electroforética distinta.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizaron 82 muestras de ADN de pacientes con diagnóstico previo de Hb S que estuvieron disponibles en la genoteca del laboratorio de Bioquímica II de la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Muestras de ADN con diagnóstico de Hb S.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Muestras de ADN que no tengan calidad y cantidad suficiente.

TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, observacional.

Para efectuar el estudio, la metodología se agrupó en 4 bloques fundamentales los cuales cada uno a su vez se desarrollo para cumplir los fines establecidos en los objetivos:

- Amplificación de los genes globínicos γ^G y γ^A
- Electroforesis en gel de agarosa
- Elección de patrones de banda mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
- Digestión con la enzima de restricción *XmnI* de muestras con patrón específico del gen γ^G .

AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES GLOBÍNICOS γ^G Y γ^A

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que sirve para amplificar regiones de ADN específicas de manera relativamente rápida (Karp, 1998).

Mediante la PCR se amplificaron ambas regiones promotoras de los genes globínicos γ^G y γ^A bajo el esquema mostrado en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa General de Amplificación de la PCR para las regiones promotoras de los genes globínicos gamma.

PASO	PROCESO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
1	Desnaturalización inicial de ADN	94	4
2	Desnaturalización del ADN	94	1
3	Alineación de los iniciadores	62	1
4	Extensión de las cadenas sintetizadas	72	2
Los pasos 2, 3 y 4 se repiten en 30 ciclos			
5	Extensión final de las cadenas	72	3
	Fin del proceso	4	15

En la reacción de PCR se requiere de 3 elementos básicos:

1. DNA
2. PCR_{mix}
3. Primer-Taq (PT_{mix})

Los elementos 2 y 3 se preparan por separado y posteriormente se agregan en un tubo eppendorf de 0.2 ml en las cantidades mostradas en la Tabla 6, donde se realizó la reacción de amplificación. Al agregar el elemento 3 se mantuvieron en un baño con hielo frappé (0°C ± 5).

Tabla 6. Elementos principales de la PCR

ELEMENTO	CANTIDAD (µl)
DNA	2
PCR _{mix}	17
PT _{mix}	6
Total	25

La solución de PCR_{mix} está constituida por: Buffer Tris 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 50mM, dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados) y agua inyectable (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Componentes de la PCR_{mix}.

COMPONENTE	CANTIDAD (µl)
Buffer Tris – KCl	147.00
MgCl ₂	44.00
dNTP's	36.67
Agua inyectable	772.33
Total	1000.00

Tabla 8. Componentes que constituyen los DNTP's la concentración final es 10 mM.

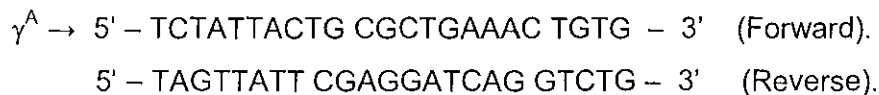
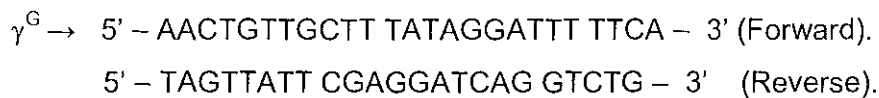
COMPONENTE	CANTIDAD (μl)
dCTP 100 mM	10
dATP 100 mM	10
dGTP 100 mM	10
dTTP 100 mM	10
Agua inyectable	60
Total	100

En la tabla 9 se muestra como esta constituida la PT_{mix}.

Tabla 9. Componentes de la PT_{mix}. *La Taq DNA polimerasa se agrega al final de la reacción bajo condiciones de temperatura de 0°C ± 5 debido a la naturaleza termolábil de la enzima.

PT _{mix} γ ^G		PT _{mix} γ ^A	
	Cantidad (μl)		Cantidad (μl)
Iniciador F GG5	1.0	Iniciador F GA5	1.0
Iniciador R G53	1.0	Iniciador R G53	1.0
H ₂ O	3.9	H ₂ O	3.9
Taq pol*	0.1	Taq pol*	0.1
Total	6.00	Total	6.00

La secuencia de los iniciadores utilizados para amplificar los genes son las siguientes:



SECUENCIA DEL GEN GLOBINICO γ^G

-1225	GTCATAATCT	ACCAAGGTCA	TGGATCGAGT	TCAGAGAAAA	AACAAAAGCA	AAACCAAACC
-1165	TACCAAAAAA	TAAAAATCCC	AAAGAAAAAA	TAAAGAAAAA	AACAGCATGA	ATACTTCCTG
-1105	CCATGTTAAG	TGGCCAATAT	GTCAGAAACA	GCACTGAGTT	ACAGATAAAG	ATGTCTAAAC
-1045	TACAGTGACA	TCCCAGCTGT	CACAGTGTGT	GGACTATTAG	TCAATAAAAC	AGTCCCTGCC
-985	TCTTAAGAGT	TGTTTTCCAT	GCAAATACAT	GTCTTATGTC	TTAGAATAAG	ATTCCCTAAG
-925	AAGTGAACCT	AGCATTTATA	CAAGATAAAT	AATTCTAATC	CATAGTATCT	GGTAAAGAGC
-865	ATCTACCAT	CATCTTACC	GAGCATAGAA	GAGCTACACC	AAAACCTGG	GTCATCAGCC
-805	AGCACATACA	CTTATCCAGT	GATAAATACA	CATCATCGGG	TGCCTACATA	CATACCTGAA
-745	TATAAAAAA	ATACTTTTGC	TGAGATGAAA	CAGGCGTGAT	TTATTTCAA	TAGGTACGGA
-685	TAAGTAGATA	TTGAAGTAAG	GATTCAGTCT	TATATTATAT	TACATAACAT	TAACTTATTC
-625	CTGCACTGAA	ACTGTTGCTT	TATAGGATTT	TTCACTACAC	TAATGAGAAC	TTAAGAGATA
-565	ATGGCCTAAA	ACCACAGAGA	GTATATTCAA	AGATAAGTAT	AGCACTTCTT	ATTTGGAAAC
-505	CAATGCTTAC	TAAATGAGAC	TAAGACGTGT	CCCATCAAAA	ATCCTGGACC	TATGCCTAAA
-445	ACACATTTCA	CAATCCCTGA	ACTTTTCAA	AATTGGTACA	TGCTTAACT	TTAAACTACA
-385	GGCCTCACTG	GAGCTACAGA	CAAGAAGGTG	AAAAACGGCT	GACAAAAGAA	GTCCTGGTAT
-325	CTTCTATGGT	GGGAGAAGAA	AACTAGCTAA	AGGGAAGAAT	AAATTAGAGA	AAAATTGGAA
-265	TGACTGAATC	GGAACAAGGC	AAAGGCTATA	AAAAAAATTA	AGCAGCAGTA	TCCTCTGGG
-205	GGC ^c CCTTCC	CCACACTATC	TCAATGCAAA	TATCTGTCTG	AAACGGT ^T CC	TGGCTAAACT
-145	CCACCCATGG	GTTGGCCAGC	CTTGCCTTGA	CCAATAGCCT	TGACAAGGCA	AACTTGACCA
-85	ATAGTCTTAG	AGTATCCAGT	GAGGCCAGGG	GCCGGCGGCT	GGCTAGGGAT	GAAGAATAAA
-25	AGGAAGCACC	CTTCAGCAGT	TCCACACACT	CGCTTCTGGA	ACGTCTGAGG	TTATCAATAA
36	GCTCCTAGTC	CAGACGCCAT	GGGTCATTTT	ACAGAGGAGG	ACAAGGCTAC	TATCACAAGC
96	CTGTGGGGCA	AGGTGAATGT	GGAAGATGCT	GGAGGAGAAA	CCCTGGGAAG	GTAGGCTCTG
156	GTGACCAGGA	CAAGGGAGGG	AAGGAAGGAC	CCTGTGCCTG	GCAAAAGTCC	AGGTTCGCTTC
216	TCAGGATTTG	TGGCACCTTC	TGACTGTCAA	ACTGTTCTTG	TCAATCTCAC	AGGCTCCTGG
276	TTGTCTACCC	ATGGACCCAG	AGGTTCTTTG	ACAGCTTTGG	CAACCTGTCC	TCTGCCTCTG
336	CCATCATGGG	CAACCCCAAA	GTCAAGGCAC	ATGGCAAGAA	GGTGTGACT	TCCTTGGGAG
396	ATGCCATAAA	GCACCTGGAT	GATCTCAAGG	GCACCTTTGC	CCAGCTGAGT	GCCTTGCACCT
456	GTGACAAGCT	GCATGTGGAT	CCTGAGAACT	TCAAGGTGAG	TCCAGGAGAT	GTTTCAGCAC
516	TGTTGCCTTT	AGTCTCGAGG	CAACTTAGAC	AACTGAGTAT	TGATCTGAGC	ACAGCAGGGT
576	GTGAGCTGTT	TGAAGATACT	GGGGTTGGGA	GTGAAGAAAC	TGCAGAGGAC	TAACTGGGCT
636	GAGACCCAGT	GGCAATGTTT	TAGGGCCTAA	GGAGTGCCTC	TGAAAATCTA	GATGGACAAC
696	TTTGACTTTG	AGAAAAGAGA	GGTGGAAATG	AGGAAAATGA	CTTTTCTTTA	TTAGATTTTCG
756	GTAGAAAGAA	CTTTCACCTT	TCCCCTATTT	TTGTTATTCG	TTTTAAAACA	TCTATCTGGA
816	GGCAGGACAA	GTATGGTCGT	TAAAAAGATG	CAGGCAGAAG	GCATATATTG	GCTCAGTCAA
876	AGTGGGGAAC	TTTGGTGGCC	AAACATACAT	TGCTAAGGCT	ATTCCATATAT	CAGCTGGACA
936	CATATAAAAT	GCTGCTAATG	CTTCATTACA	AACTTATATC	CTTTAATTC	AGATGGGGGC
996	AAAGTATGTC	CAGGGGTGAG	GAACAATTGA	AACATTTGGG	CTGGAGTAGA	TTTTGAAAGT
1056	CAGCTCTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGCG	CGCGTGTGTT	TGTGTGTGTG	TGAGAGCGTG
1116	TGTTTCTTTT	AACGTTTTCA	GCCTACAGCA	TACAGGGTTC	ATGGTGGCAA	GAAGATAACA
1176	AGATTTAAAT	TATGGCCAGT	GACTAGTGCT	GCAAGAAGAA	CAACTACCTG	CATTTAATGG
1236	GAAAGCAAAA	TCTCAGGCTT	TGAGGGAAAGT	TAACATAGGC	TTGATTCTGG	GTGGAAGCTT
1296	GGTGTGTAGT	TATCTGGAGG	CCAGGCTGGA	GCTCTCAGCT	CACTATGGGT	TCATCTTTAT
1356	TGTCCTCTTT	CATCTCAACA	GCTCCTGGGA	AATGTGCTGG	TGACCGTTTT	GGCAATCCAT
1416	TTCCGGCAAAG	AATTCACCCC	TGAGGTGCAG	GCTTCCTGGC	AGAAGATGGT	GACTGGAGTG
1476	GCCAGTGCCC	TGTCCTCCAG	ATACCACTGA	GCTCACTGCC	CATGATGCAG	AGCTTTCAAG
1536	GATAGGCTTT	ATTCTGCAAG	CAATACAAAT	AATAAATCTA	TTCTGCTAAG	AGATCACACA
1596	TGGTTGTCTT	CAGTTCTTTT	TTTATGTCTT	TTTAAATATA	TGAGCCACAA	AGGGTTTTAT

Figura 12. Secuencia del gen globínico γ^G . La parte sombreada representa el fragmento amplificado por PCR (666 pb). La secuencia marcada en rojo son los iniciadores utilizados. La parte de la secuencia subrayada son los tres exones y la parte intermedia entre estos son los dos intrones. La secuencia marcada en azul representa los codones de inicio y terminación de la traducción respectivamente. El fragmento en verde indica la secuencia que reconoce la enzima de restricción XmnI. (a) Mutación -202 C→T. (b) Mutación -158 T→C. Los nucleótidos que se cambian en la mutación se resaltan en amarillo.

SECUENCIA DEL GEN GLOBINICO γ^A

-1055	AGCTGTCTAA	AGTACACTAA	TATTCGAGTT	ATAATAGTGT	GTGGACTATT	AGTCAATAAA
-995	AACAACCCCT	GCCTCTTTAG	AGTTGTTTTT	CATGTACACG	CACATCTTAT	GTCTTAGAGT
-935	AAGATTCCCT	GAGAAGTGAA	CCTAGCATT	ATACAAGATA	ATTAATTCTA	ATCCACAGTA
-875	CCTGCCAAAG	AACATTCTAC	CATCATCTTT	ACTGAGCATA	GAAGAGCTAC	GCCAAAACCC
-815	TGGGTCTATCA	GCCAGCACAC	ACACTTATCC	AGTGGTAAAT	ACACATCATC	TGGTGTATAC
-755	ATACATACCT	GAATATGGAA	TCAAATATTT	TTCTAAGATG	AAACAGTCAT	GATTTATTTT
-695	AAATAGGTAC	GGATAAGTAG	ATATGAGGT	AAGCATTAGG	TCTTATATTA	TGTAACACTA
-635	ATCTATTACT	GCGCTGAAAC	TGTGCTTTA	TAGAAATTGT	TTTCACTA^oCA	CTATTGAGAA
-575	ATTAAGAGAT	AATGGCAAAA	GTCACAAAGA	GTATATTCAA	AAAGAAGTAT	AGCA ^d TTTTT
-515	CCTTAGAAAC	CACTG ^c T ^p AAC	TGAAAGAGAC	TAAGATTTGT	CCCGTCAAAA	ATCCTGGACC
-455	TATGCCTAAA	ACACATTTCA	CAATCCCTGA	ACTTTTCAA	AATTGGTACA	TGCTTTAGCT
-395	TTAAACTACA	GGCCTCACTG	GAGCTACAGA	CAAGAAGGTA	AAAAACGGCT	GACAAAAGAA
-335	GTCTGTGAT	CCTCTATGAT	GGGAGAAGGA	AACTAGCTAA	AGGGAAGAAT	AAATTAGAGA
-275	AAAAGTGGAA	TGACTGAATC	GGAACAAGGC	AAAGGCTATA	AAAAAATTA	AGCA ^a GCAGTA
-215	TCCTCTTGGG	GGCCCTTCC	CCACACTATC	TCAATGCAAA	TATCTGTCTG	AAACGGTCCC
-155	TGGCTAAACT	CCACCCATGG	GTTGGCCAGC	CTTGCCTTGA	CCAATAGCCT	TGACAAGGCA
-95	AACTTGACCA	ATAGTCTTAG	AGTATCCAGT	GAGGCCAGGG	GCCGGCGGCT	GGCTAGGGAT
-35	GAAGAATAAA	AGGAAGCACC	CTTCAGCAGT	TCCACACACT	CGCTTCTGGA	ACGTCTGAGA
26	TTATCAATAA	GCTCCTAGTC	CAGACGCCAT	GGGTCATTT	ACAGAGGAGG	ACAAGGCTAC
86	TATCACAAAGC	CTGTGGGGCA	AGGTGAATGT	GGAAGATGCT	GGAGGAGAAA	CCCTGGGAAG
146	GTAGGCTCTG	GTGACCAGGA	CAAGGGAGGG	AAGGAAGGAC	CCTGTGCCTG	GCAAAAGTCC
206	AGGTCGCTTC	TCAGGATTTG	TGGCACCTTC	TGACTGTCAA	ACTGTTCTTG	TCAATCTCAC
266	AGGCTCCTGG	TTGTCTACCC	ATGGACCCAG	AGGTTCTTTG	ACAGCTTTGG	CAACCTGTCC
326	TCTGCCTCTG	CCATCATGGG	CAACCCAAA	GTCAAGGCAC	ATGGCAAGAA	GGTGTGACT
386	TCCTTGGGAG	ATGCCATAAA	GCACCTGGAT	GATCTCAAGG	GCACCTTTCG	CCAGCTGAGT
446	GAACTGCACT	GTGACAAAGT	GCATGTGGAT	CCTGAGAACT	TCAAGGTGAG	TCCAGGAGAT
506	GTTTCAGCAC	TGTTGCCTTT	AGTCTCGAGG	CAACTTAGAC	AACTGAGTAT	TGATCTGAGC
566	ACAGCAGGGT	GTGAGCTGTT	TGAAGATACT	GGGTTGGGA	GTGAAGAAAC	TGCAGAGGAC
626	TAACTGGGCT	GAGACCCAGT	GGCAATGTTT	TAGGGCCTAA	GGAGTGCCCT	TGAAAATCTA
686	GATGGACAAC	TTTGACTTTG	AGAAAAGAGA	GGTGGAAATG	AGGAAAATGA	CTTTTCTTTA
746	TTAGATTTTCG	GTAGAAAAGAA	CTTTCACCTT	TCCCCTATTT	TTGTTATTTCG	TTTTAAAACA
806	TCTATCTGGA	GGCAGGACAA	GTATGGTCGT	TAAAAAGATG	CAGGCAGAAG	GCATATATTG
866	GCTCAGTCAA	AGTGGGGAAC	TTTGGTGGCC	AAACATACAT	TGCTAAGGCT	ATTCTTATAT
926	CAGCTGGACA	CATATAAAAT	GCTGCTAATG	CTTCATTACA	AACTTATATC	CTTTAATTCC
986	AGATGGGGGC	AAAGTATGTC	CAGGGGTGAG	GAACAATTGA	AACATTTGGG	CTGGAGTAGA
1046	TTTTGAAAGT	CAGCTCTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTCAGCGTG	TGTTTCTTTT
1106	AACGTCTTCA	GCCTACAACA	TACAGGGTTC	ATGGTGGGAA	GAAGATAGCA	AGATTTAAAT
1166	TATGCCAGT	GACTAGTGCT	TGAAGGGGAA	CAACTACCTG	CATTTAATGG	GAAGGCAAAA
1226	TCTCAGGCTT	TGAGGGAAGT	TAACATAGGC	TTGATTCTGG	GTGGAAGCTG	GGTGTGTAGT
1286	TATCTGGAGG	CCAGGCTGGA	GCTCTCAGCT	CACTATGGGT	TCATCTTTAT	TGTCCTCTTT
1346	CATCTCAACA	GCTCCTGGGA	AATGTGCTGG	TGACCGTTTT	GGCAATCCAT	TTCCGGCAAAG
1406	AATTCACCCC	TGAGGTGCAG	GCTTCTTGGC	AGAAGATGGT	GACTGCAGTG	GCCAGTGCCC
1466	TGTCCTCCAG	ATACCACTGA	GCCTCTTGCC	CATGATTTCAG	AGCTTTCAAG	GATAGGCTTT
1526	ATTCTGCAAG	CAATACAAAT	AATAAATCTA	TTCTGCTGAG	AGATCACACA	TGATTTTCTT
1586	CAGCTCTTTT	TTTTACATCT	TTTTAAATAT	ATGAGCCACA	AAGGGTTTAT	ATTGAGGGAA

Figura 13. Secuencia del gen globínico γ^A . La parte sombreada representa el fragmento amplificado por PCR (684 pb). La secuencia marcada en rojo son los iniciadores utilizados. La parte de la secuencia subrayada son los tres exones y la parte intermedia entre estos son los dos intrones. La secuencia marcada en azul representa los codones de inicio y terminación de la traducción respectivamente. (a) Delección de 4 pb -225 a -222 AGCA. (b) Mutación -499 T→A. (c) Mutación -500 C→T. (d) Mutación -521 C→A. Mutación -588 A→G. Los nucleótidos que se cambian en la mutación se resaltan en amarillo, así como la delección de 4 pb.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis es una técnica de la biología molecular en la cual se separan biomoléculas, que depende entre otros factores de su carga eléctrica y bajo la acción de un campo eléctrico (García, 2000).

Es el método estándar para la separación y purificación de fragmentos de DNA y RNA, los fragmentos que se pueden separar oscilan entre 1000 y 23,000 pb (Westermeier, 2005).

Preparación del gel de agarosa 2%.

La preparación del gel se realizó de acuerdo a los componentes y cantidades mostradas en la Tabla 10. La agarosa fue calentada hasta disolverse completamente, se agregó 20 μ l de SYBR-SAFE (para coloración de los productos de PCR), se vertió en el soporte (Easy Cast) y se dejó enfriarse hasta gelificar.

Tabla 10. Componentes utilizados para preparar el gel de agarosa 2%.

COMPONENTE	CANTIDAD
Agarosa	0.6 g
TBE 0.5 X	30.0 ml

Preparación de la muestra.

Realizar una mezcla de 2 μ l de jugo azul con 5 μ l de muestra amplificada, (Tabla 11).

Tabla 11. Componentes y cantidades del Jugo Azul.

COMPONENTE	CANTIDAD
Azul de Xilencianol 0.25%	25 mg
Azul de Bromofenol 0.25%	25 mg
Sacarosa 50%	5 g
H ₂ O	cbp 10 ml

Corrimiento del gel.

El tiempo de corrimiento fue de 1 hora 20 minutos a 120 Volts/40mA con buffer de corrimiento TBE 0.5X (Tabla 15). Utilizar el marcador de peso molecular puc 18 *HaeIII*.

Tabla 12. Componentes de la solución TBE 10X. De esta solución stock se preparan las diferentes diluciones de TBE (0.5X y 1X).

COMPONENTE	CANTIDAD
Tris Base	107.78 g
Acido Bórico	55.02 g
EDTA 0.5 M1	3.722 g
Aforar a 1000 ml con H ₂ O pH 8.4 - 8.6	

Visualización de las bandas.

Se observó el gel en un transiluminador de luz UV SIGMA y se tomó una fotografía del gel con una cámara digital Kodak y fue analizada con el programa EDAS de Kodak Scientific.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La poliacrilamida es un soporte empleado comúnmente en la electroforesis, es químicamente inerte, de propiedades uniformes y resulta de preparación fácil y rápida, dentro de las ventajas que ofrece están que posee estabilidad mecánica, permiten buena visualización de las bandas durante un periodo de tiempo prolongado, además que se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. En la separación electroforética intervienen diversos factores como el pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrimiento, temperatura, concentración de acrilamida y bisacrilamida (García, 2000).

Los geles de poliacrilamida fueron preparados bajo condiciones distintas para ambos genes.

Preparación del gel de poliacrilamida desnaturizante.

Como se muestra en la Tabla 13, se preparó una solución stock de poliacrilamida al 40% con una relación de 39 partes de acrilamida por una parte de bisacrilamida.

Tabla 13. Componentes utilizados para preparar la poliacrilamida al 40% (relación 39:1)

COMPONENTE	CANTIDAD
Acrilamida	39 g
Bis-Acrilamida	1 g
Se disuelve en 100 ml con agua desmineralizada y se almacena a 4 °C	

El gel de trabajo se preparo a una concentración del 6%, con una acción desnaturante del 15% utilizando formamida y urea como se describe en la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones para la preparación del gel de poliacrilamida al 15%

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN parte inferior del gel (15%)	CONCENTRACIÓN parte superior del gel (0%)
PA 40% (rel 39:1)	1.2 ml	0.3 µl
Urea 7M	1.2 ml	-----
Formamida	0.48 ml	-----
TBE 10X	0.8 ml	0.2 µl
TEMED	10.0 µl	5.0 µl
Persulfato de Amonio	0.7 µg	0.7 µg
H ₂ O	4.32 ml	1.5 ml
Total	8.0 ml	2.0 ml

Para obtener el patrón de bandeo del promotor del gen γ^A se preparó un gel con una acción desnaturante del 10% como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones para la preparación del gel de poliacrilamida 10%

COMPONENTE	CONCENTRACION Parte inferior del gel (10%)	CONCENTRACION Parte superior del gel (0%)
Poliacrilamida	1.2 ml	0.3 ml
Urea 7M	0.8 ml	-----
Formamida	0.32 µl	-----
TBE 10X	0.8 ml	0.2 ml
TEMED	10 µl	5 µl
Persulfato de Amonio	0.7 µg	0.7 µg
H ₂ O	4.88 ml	1.5 ml
Total	8.0 ml	2 ml

El gel desnaturizante se preparó vertiendo primero la solución de mayor concentración (10 o 15%) de desnaturización y luego el de menor concentración (0%), en la parte intermedia de un par de cristales que sirven de molde. Se colocó un molde de plástico llamado "peine" para la formación de hendiduras o posillos donde serán aplicadas las muestras.

Aplicación de las muestras.

La aplicación de las muestras se realizó agregando en cada uno de los posillos 5 µl de muestra previamente amplificada más 2 µl de Jugo Azul

Corrimiento de las muestras.

El corrimiento se realizó durante 2:30 horas a 200 Volts en una cámara de electroforesis vertical (Easy Cast) conectada a un Baño María (marca Boekel Grant) que proporcionó la circulación de agua a 62°C a través de la cámara de electroforesis y que por convección de calor permitió una mayor desnaturización de las muestras de ADN.

Tinción del gel.

Posterior al corrimiento se tiñeron los geles con Nitrato de Plata bajo el siguiente procedimiento:

- 1) Pretinción: Incubar el gel durante 5 minutos en una solución de etanol 10% y Acido acético 0.5%.

SOLUCIÓN DE PRETINCIÓN	
Etanol	5.0 ml
Acido Acético	0.25 ml
Aforar a 50 ml con Agua	

2) Tinción: Incubar durante 5 minutos en una Solución Fijadora Plus.

SOLUCION FIJADORA PLUS	
Etanol	5.0 ml
Acido Acético	0.25 ml
Nitrato de Plata	0.1 g
Aforar a 50 ml con Agua (Se prepara 1 minuto antes de usarse)	

3) Lavar durante 20 segundos en agua destilada, agitando constantemente.

4) Desarrollo de color: se coloca el gel una solución reveladora hasta que aparezcan las bandas.

SOLUCIÓN DE REVELADO	
Hidróxido de Sodio	1.5 g
Formaldehído	135 μ l
Aforar a 50 ml con Agua	

5) Se almacena el gel en una bolsa de plástico en refrigeración.

Luego de colocar el gel en la bolsa de plástico se tomó una fotografía del gel con una cámara digital Kodak y fue analizada con el programa EDAS de Kodak Scientific.

La clasificación de patrones de bandeo observados en los amplificadores de los genes γ^G y γ^A se realizó considerando la ubicación y posición de las bandas observadas en el gel considerando la distancia relativa al punto de aplicación.

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON *XmnI*

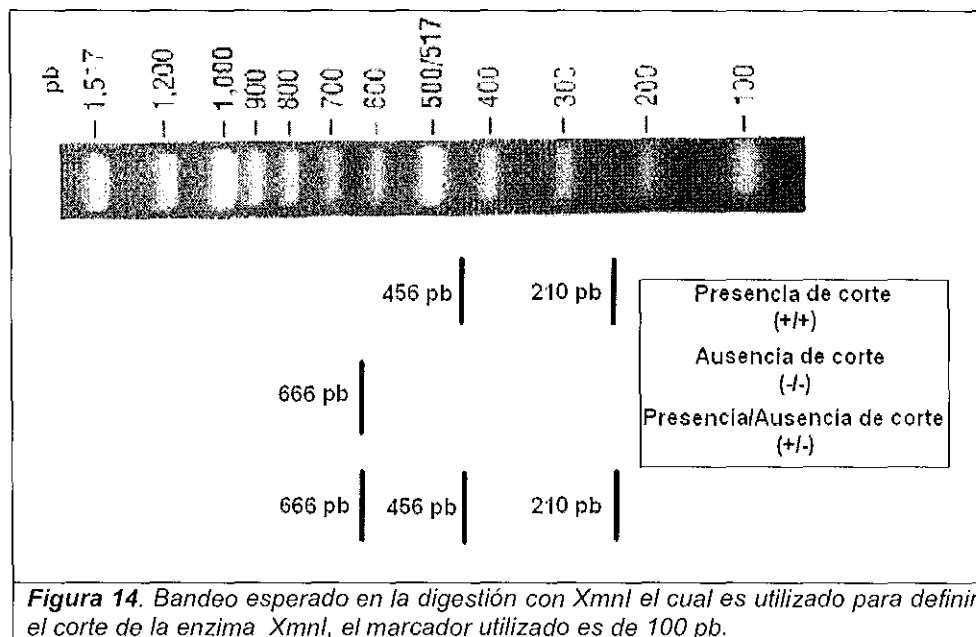
La enzima *XmnI* reconoce la secuencia 5'-GAANN↓NNTTC-3', y detecta el polimorfismo -158 en la región promotora de γ^G dado por la mutación T→C. En la Figura 14 se muestra el patrón de bandeo esperado para las diferentes posibilidades de corte (+) o no corte (-).

Cada reacción se realizó en un tubo eppendorf de 0.2 ml, el cual fue preparado como se muestra a continuación:

COMPONENTE	CANTIDAD
DNA _{amp}	10.0 μ l
Buffer NEB 10X	3.0 μ l
Enzima Mix	17.0 μ l
Total	30.0 μ l

La enzima mix se prepara por separado en un tubo eppendorf de 0.5 μ l y se agrega al final en la reacción bajo condiciones de temperatura alrededor de los 0°C y posteriormente se pone en baño maría a 37°C durante toda una noche para que la enzima realice su actividad, esta mezcla se prepara como sigue:

COMPONENTE	CANTIDAD
<i>Xmn</i> I	0.5 μ l
BSA	0.3 μ l
Agua Inyectable	16.2 μ l
Total	17.0 μ l



SECUENCIACIÓN DE AMPLIFICADOS DE ADN DE LOS GENES GLOBÍNICOS γ

El proceso de secuenciación de ADN se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se amplificaron los genes γ^G y γ^A de acuerdo al programa de amplificación mencionado en la Tabla 5, se verificó la presencia de ADN y posteriormente se purificaron los amplificados de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Cada amplificado se trasvasó a un tubo de 0.5 ml, luego se agregó 500 μ l de etanol frío al 100% y se incubó en el congelador durante 1 Hora.
2. Se centrifugan los tubos a 14,000 rpm durante 10 minutos.
3. Se descarta el sobrenadante y se agregan 500 μ l de etanol frío al 70% y se centrifuga durante 10 min a 14,000 rpm.
4. Se descarta el sobrenadante, el paso anterior se repite r tres veces.
5. En el último lavado se decanta el sobrenadante y se colocan los tubos en el termoblock a 45 °C hasta que evapore totalmente el etanol.
6. Una vez seco, se agregan 24 μ l de agua inyectable a cada tubo con el propósito de solubilizar el ADN y se llevan al baño maría a 37 °C.
7. Se incuban por 24 a 48 horas. Se prepara un gel de agarosa 2% de concentración en el cual se aplican 5 μ l de purificado con el fin de verificar la presencia de ADN.

Para realizar la reacción de secuenciación se prepara la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

COMPONENTE	CANTIDAD
pADN	6.0 μ l
Iniciador GG5-F	1.0 μ l
Big Dye*	2.0 μ l
Buffer 5X*	3.0 μ l
Agua Inyectable*	8.0 μ l
Total	20 μ l

El programa general de secuenciación que se utiliza en el termociclador lleva el nombre de SEQUEN y tiene los siguientes pasos:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	96 °C	4 min
2	96 °C	40 seg
3	57 °C	10 seg
4	60 °C	40 seg
Los pasos 2,3 y 4 se repiten 35 veces		
5	4 °C	20 min
6	Fin del Proceso	

Al salir las muestras se purifica el producto de la reacción de secuenciación como sigue:

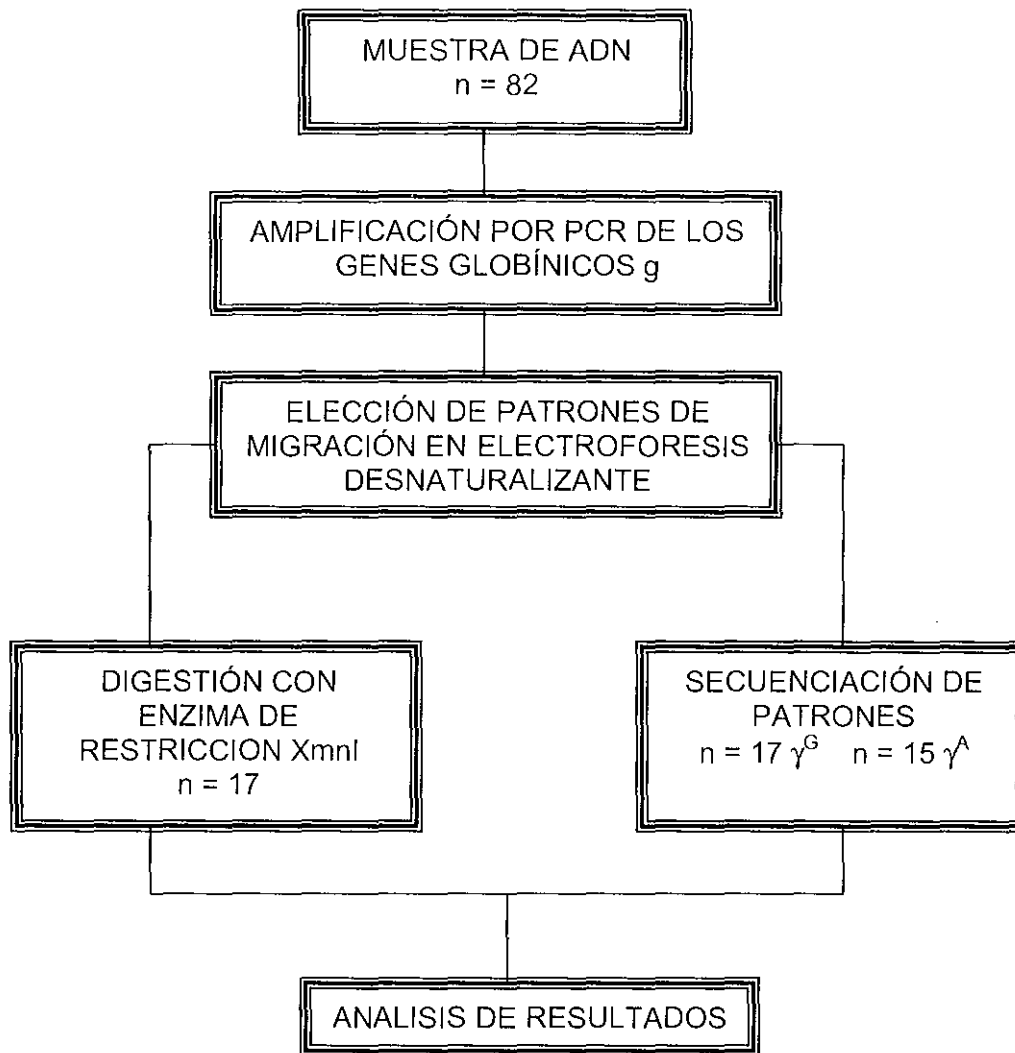
- a) Se pesan 50 mg de Sephadex G-50 grado medio y se colocan en una columna previamente lavada con detergente Alcanox.
- b) Se agregan 800 µl de agua inyectable y se dejan reposar las columnas evitando que se formen burbujas de aire durante 2 Horas.
- c) Se centrifugan las columnas a 2600-2800 rpm durante 2 minutos para quitar el exceso de agua.
- d) En cada columna se agrega el producto de la reacción de secuenciación en la matriz de la columna exactamente en el centro evitando tocar el Sephadex.
- e) Se colocan las columnas en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugan a 2600-2800 rpm durante 2 minutos.
- f) Se obtiene el producto de la columna, se trasvasa a un tubo de 600 µl y se liofilizan las muestras en una centrifuga de vacío durante 20-25 min hasta que sequen completamente.
- g) Se agregan 25 µl de formamida HIDI para resuspender la muestra.
- h) Se desnaturalizan las muestras a 95 °C durante 10 minutos en el termociclador.
- i) Se colocan las muestras en el secuenciador.

Interpretación del electroferograma

La interpretación del electroferogramas se realizó tomando en cuenta los siguientes criterios:

- a) **Punto de comparación:** Los electroferogramas obtenidos se compararon con la secuencia en el Gen Bank con el nombre HUMGAMGLOA y número de acceso M91036.
- b) **Intensidad de la señal de las bases nucleotídicas:** Para considerar un resultado óptimo la señal de cada base o promedios de incorporación debió ser por lo menos de 100.
- c) **Fondo:** El electroferograma no debió presentar dobles secuencias: Los electroferogramas con dobles señales fueron repetidos empleando nuevos templados.
- d) **Establecimiento de Heterocigosidad:** Para establecer los estados de heterocigosidad en algún punto, las señales observadas debían de ser de tamaño similar. En algunos casos se realizó la secuencia en la heterocigosidad dudosa.

VI. DIAGRAMA DE FLUJO



VII. RESULTADOS

AMPLIFICADO DE LA REGIÓN PROMOTORA DE LOS GENES γ

Se logró amplificar los fragmentos de γ^G y γ^A , la Figura 15 muestra una imagen con el amplificado obtenido.

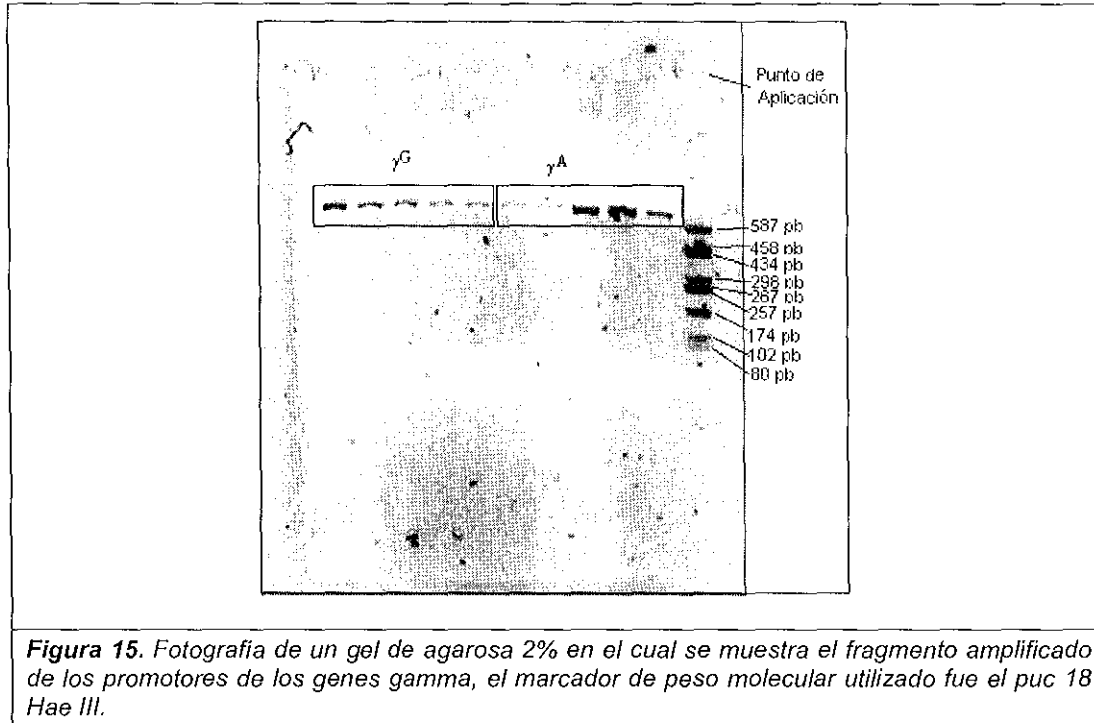
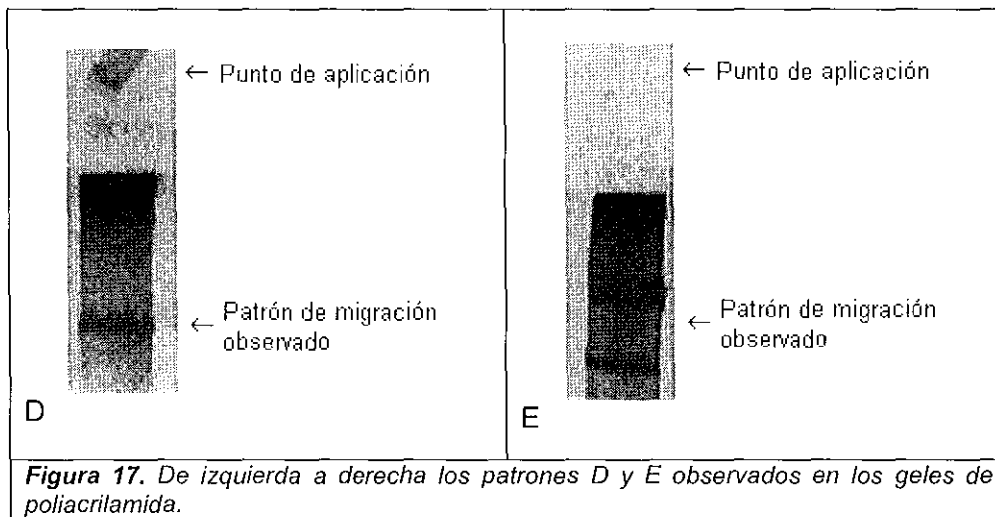
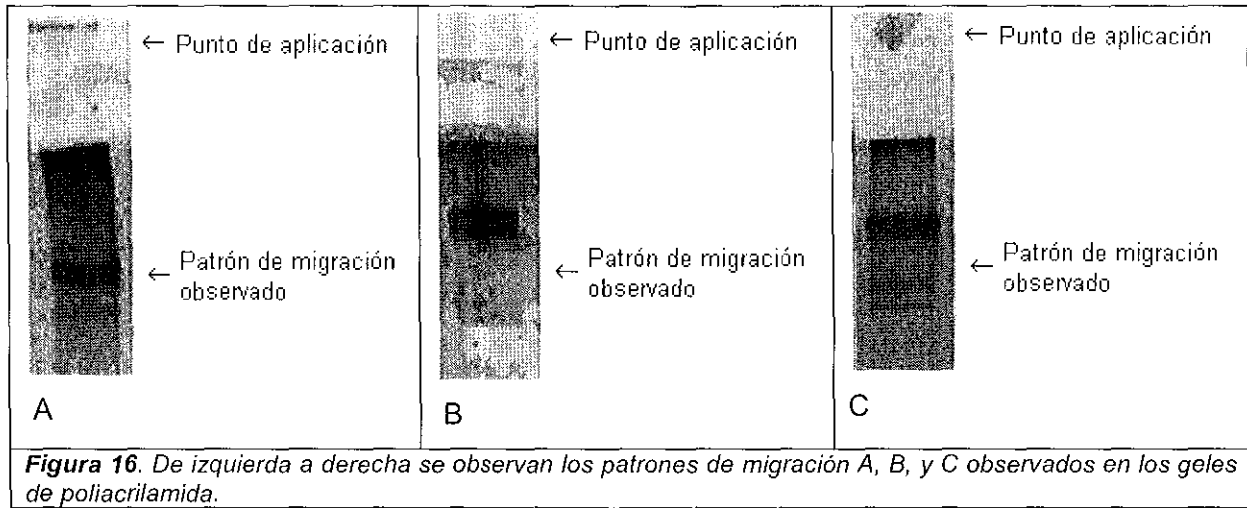


Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa 2% en el cual se muestra el fragmento amplificado de los promotores de los genes gamma, el marcador de peso molecular utilizado fue el puc 18 Hae III.

PATRONES DE BANDEO OBSERVADOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE PARA EL GEN GLOBÍNICO γ^G

De las 82 muestras analizadas se obtuvieron para el gen γ^G 5 patrones diferentes de migración electroforética a los cuales se les asignó una letra para su identificación (A, B, C, D y E). En las Figuras 16 y 17 se puede apreciar los patrones observados en los geles de poliacrilamida. Se contabilizaron 39 muestras con el patrón A que representa el 47.56%, 7 muestras con el patrón B (8.53%) y 9 muestras tienen el patrón C que nos da el 11.0%, 23 presentaron el patrón D con 28.04% y 4 muestras mostraron el patrón E que constituye el 4.87%.



Se seleccionaron 17 muestras con los 5 patrones mencionados. De estas muestras 6 presentaron el patrón A, 3 el patrón B, 2 el patrón C, 4 el patrón D, y dos el patrón E. Estas muestras se sometieron a la digestión con la enzima de restricción *XmnI*.

DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL GEN γ^G CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *XmnI*

Las muestras del gen γ^G sometidas a digestión con la enzima de restricción *XmnI* revelaron los datos mostrados en la Tabla 16 y en la figura 18.

Tabla 16. Resultados de la digestión con la enzima XmnI

MUESTRA	DIGESTIÓN	PMO	MUESTRA	DIGESTIÓN	PMO
1	(-/-)	A	10	(-/-)	E
2	(-/-)	A	11	(-/-)	D
3	(-/-)	C	12	(+/-)	D
4	(+/-)	E	13	(-/-)	A
5	(-/-)	B	14	(-/-)	C
6	(-/-)	B	15	(-/-)	D
7	(-/-)	A	16	(-/-)	A
8	(-/-)	A	17	(-/-)	D
9	(-/-)	B			

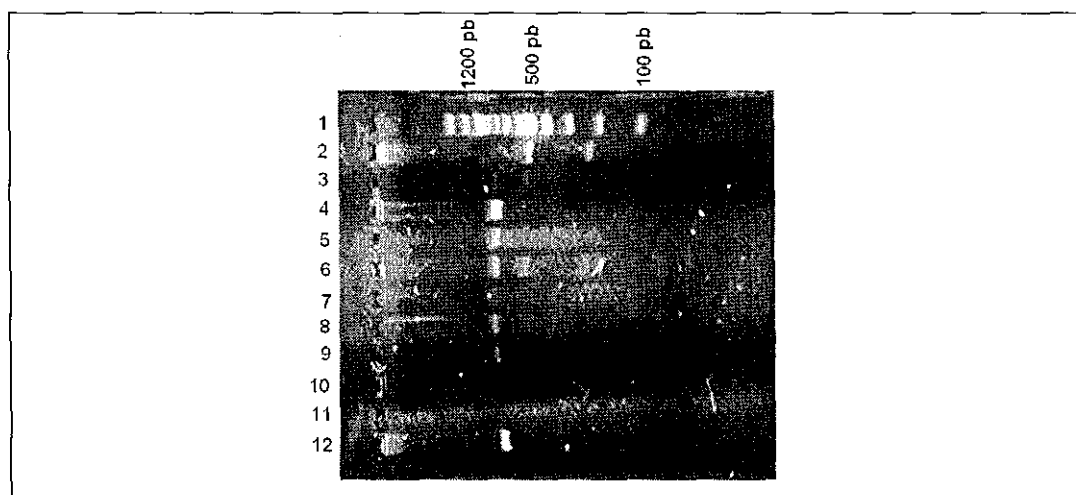


Figura 18. Se observan los productos de la digestión, el primer carril es el marcador de 100 pb, los carriles 1 y 12 son dos controles (+/+) y (-/-) respectivamente, en los carriles 3 y 6 se observan dos heterocigotos para la mutación.

PATRONES DE BANDEO OBSERVADOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE PARA EL GEN GLOBÍNICO γ^A

En las figuras 19 y 20 se muestran los patrones de migración observados en este trabajo. El patrón de bandeo número I se encontró en una muestra. El patrón de bandeo II se presentó en 64 muestras. El patrón III se apreció en 5 muestras. Se observaron 10 muestras con el patrón IV. Las 2 muestras

restantes tuvieron el patrón de bandeo V. Las frecuencias relativas para cada patrón fueron 0.82%, 78.20%, 6.10%, 12.20% y 2.50% respectivamente.

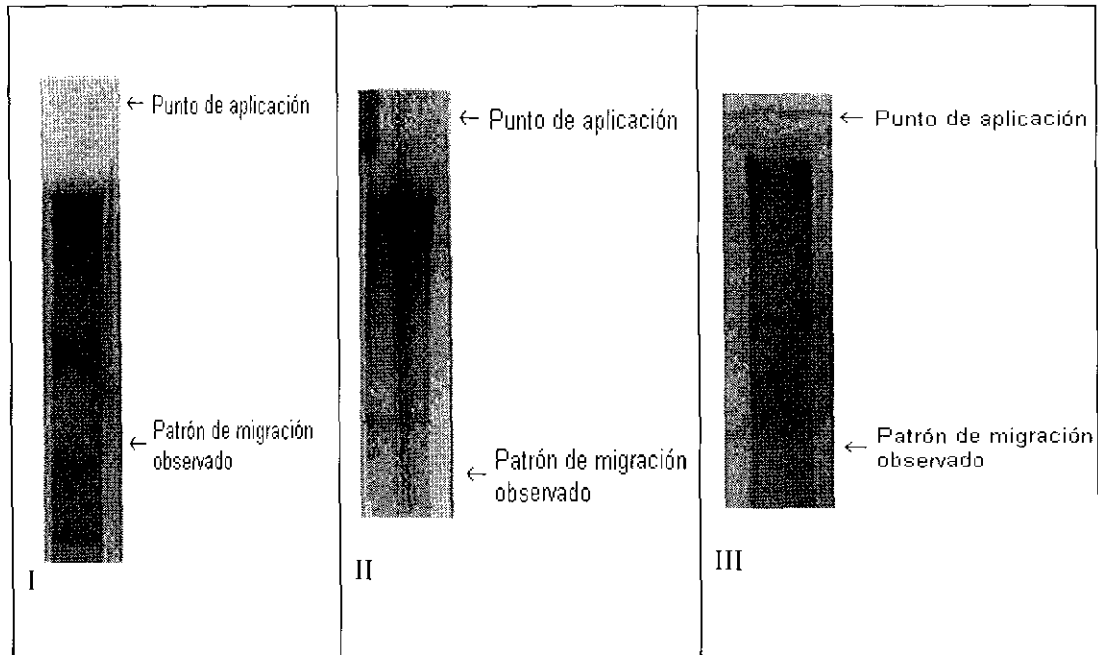


Figura 19. De izquierda a derecha los patrones I, II y III observados en los fragmentos amplificados del gen globínico γ^A .

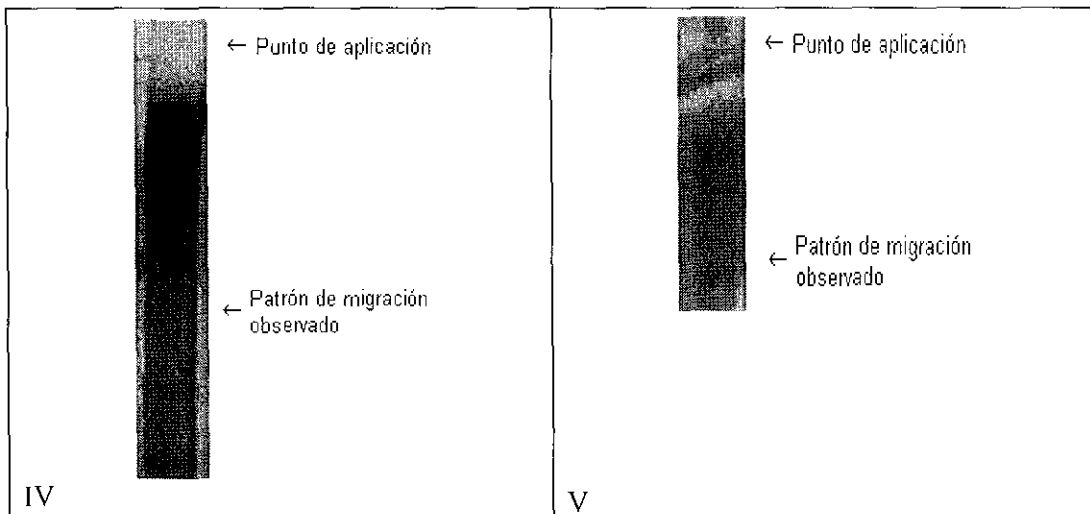


Figura 20. De izquierda a derecha los patrones IV y V observados en los fragmentos amplificados del gen globínico γ^A .

SECUENCIACIÓN DE ADN DE LOS FRAGMENTOS CON LOS PATRONES DE MIGRACIÓN OBSERVADOS EN AMBOS GENES.

Se realizaron 3 ensayos de secuenciación de los fragmentos. 17 para γ^G y 15 para γ^A . En todos los ensayos no se obtuvo una secuencia con los lineamientos adecuados para considerarlas de buena calidad. En las figura 21 y 22 se muestra una fracción de los secuenciogramas obtenidos en los genes γ^G y γ^A respectivamente. Con estos resultados no fue posible establecer diferencias entre los patrones de migración observados en los genes γ^G y γ^A .

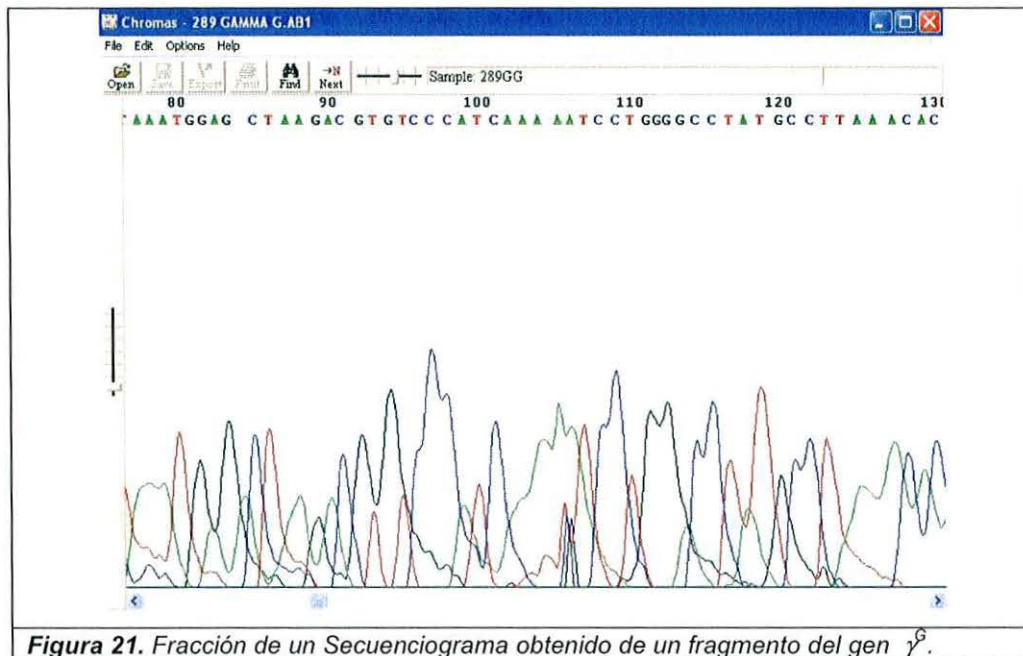


Figura 21. Fracción de un Secuenciograma obtenido de un fragmento del gen γ^G .

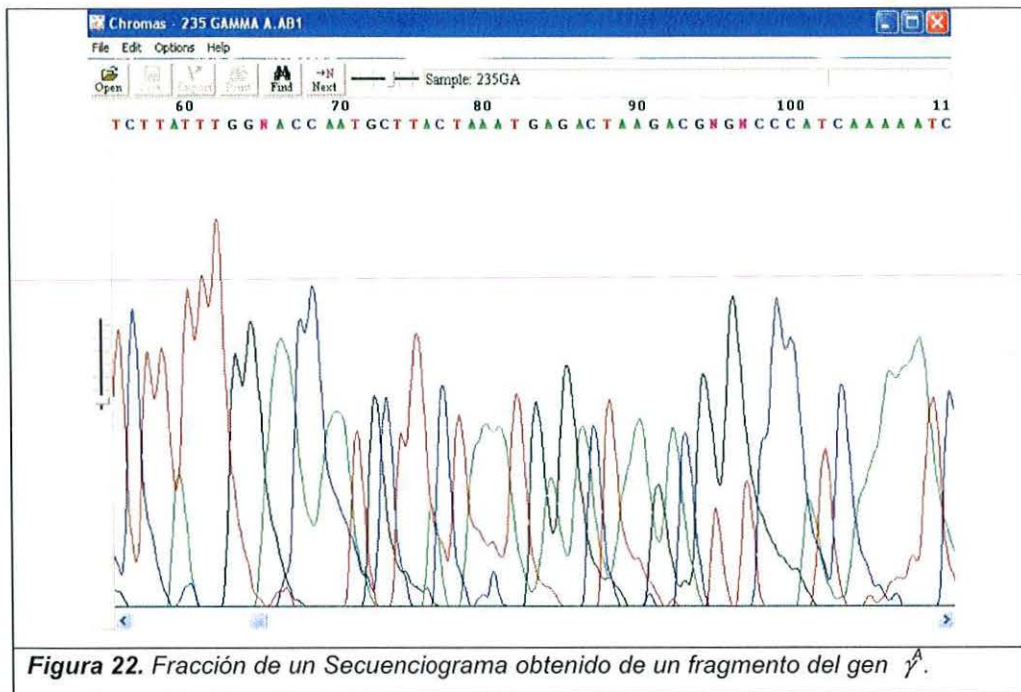


Figura 22. Fracción de un Secuenciograma obtenido de un fragmento del gen γ^A .

VIII. DISCUSIÓN

PATRONES DE BANDEO OBSERVADOS EN LOS AMPLIFICADOS DEL GEN γ^G .

Los patrones de bandeo observados en el gen γ^G del presente trabajo son explicados de la siguiente manera.

El patrón D que presenta una sola banda es debido a que se presenta una secuencia uniforme que tiene propiedades de desnaturalización similares. De tal forma que todos los fragmentos migran juntos. Un dato se contrapone con esta explicación. La muestra 12 presenta un genotipo +/- para la enzima de restricción *XmnI* que identifica un cambio T→C en la posición -158 (Figura 12). Considerando 8 bases vecinas al sitio del cambio, la secuencia es 5'-GAAACGGTTCCTGGCTA-3'. La presencia de timina le confiere una T_m de 57.8°C que comparada con citosina es de 60.4°C. La diferencia de 2.4°C hace suponer que es una zona estable con respecto a las condiciones empleadas en este trabajo.

Los otros 4 patrones (A, B, C y E) pueden ser explicados por diferencias de secuencia en estado heterocigoto. Cada patrón pudiera tener cambios de bases diferentes que confieren propiedades de desnaturalización distintas. Los fragmentos con más zonas desnaturalizadas migran más lento que los fragmentos con menos zonas desnaturalizadas. Las diferencias en la posición de las bandas son debidas a los sitios donde estos cambios pudieran estar presentes. Por ejemplo, Se describieron dos sitios con variaciones en la región promotora del gen γ^G uno ubicado en -309 (G→A) y el otro en -271 (C→T) las diferentes combinaciones están con asociadas con los haplotipos Benin. Senegal y Bantu o CAR (Month 1990). Las diferentes combinaciones de pudieran llegar a explicar cada uno de los patrones mencionados.

PATRONES DE BANDEO OBSERVADOS EN LOS AMPLIFICADOS DEL GEN γ^A .

Se observó un comportamiento similar entre los patrones de bandeo observados en los segmentos amplificados de los genes γ^G y γ^A . El patrón II

que fue el más frecuente presenta una sola banda. Pudiera ser explicado de la misma forma que el patrón D del gen γ^G .

Los 4 patrones restantes (I, III, IV y V) se presentaron como los del gen γ^G , con al menos dos bandas. Al comparar el patrón de bandeo con un trabajo publicado (Patrinos, 2001) los patrones se asemejan al de dicho trabajo. Pero fueron diferentes a los descritos en un trabajo previo (Regla, 2006) donde se describieron 5 patrones y se describe un cambio en la posición -565 A→G.

De manera similar a la descrita en los patrones de γ^G , explicaríamos la formación de los patrones de γ^A . Considerando la presencia de al menos 4 sitios -588 A→G, -565 A→G, -499 T→A y la delección de 4 pares de bases localizada de -225 a -222 (AGCA). Las diferentes combinaciones nos pudieran formar cada uno de los patrones.

POLIMORFISMO *Xmnl*.

Este polimorfismo ha sido observado ocasionalmente por nuestro grupo en pacientes con talasemia beta (Bustos 1996, Sánchez 1998) y se encuentra asociado al haplotipo 3 (Bustos 1996) con talasemia beta y a los haplotipos Bantú y Árabe-Hindú con el gen β^S (Month 1990).

Desconocemos que haplotipo presentan las dos muestras heterocigotos para el sitio -158 T→C observadas en este trabajo.

SECUENCIACION DE ADN EN LOS FRAGMENTOS SELECCIONADOS CON LOS PATRONES DE BANDEO.

La falta de resultados adecuados para obtener las secuencias de los diferentes patrones nos impidieron concluir adecuadamente este objetivo. Se presentaron diferentes problemas metodológicos que no fueron resueltos de forma satisfactoria. Entre los que podemos mencionar están: a) la utilización de un lote de etanol contaminado, utilizado en la purificación de los amplificadores que servirían como moldes en la reacción de secuenciación; b) la utilización de columnas recicladas, que fueron utilizadas para la purificación de los productos de la reacción de secuenciación.

IX. CONCLUSIONES

1. Los patrones de bandeo en ambos genes globínicos son similares en comportamiento electroforetico bajo las condiciones probadas en este trabajo.
2. La presencia de el sitio -158 T→C no esta asociada a un patrón de bandeo con las condiciones utilizadas en este trabajo.

X. BIBLIOGRAFÍA

Adekile AD. Mild-Phenotype Sickle Cell Disease: Molecular Basis, Clinical Presentation and Management Recommendations. *Curr. Paediatr.* 15:57 – 61. 2005.

Beutler E. The Sickle Cell Diseases and Related Abnormalities. In *Hematology of Williams*. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds). 6th edición. Edit: McGraw Hill. 47:581 – 605. 2001.

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

Bustos R. Hemoglobina Fetal, Haplotipos β y polimorfismos XmnI en pacientes con Talasemia β . Tesis de Licenciatura de QFB. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. 1996.

Colombo B., Svarch E., Martínez G. *Introducción al Estudio de las Hemoglobinopatías*. Edit: Científico-Técnica. La Habana Cuba. 1981.

Efremov DG., Dimovsky AJ., Huisman THJ. The -158 (C \rightarrow T) Promoter Mutation is Responsible for the Increased Transcription of the 3' γ Gene in the Atlanta Type of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Blood*. 83:3350 – 3355. 1994.

Flint J., Harding RM., Boyce AJ., Clegg JB. The Population Genetics of the Haemoglobinopathies in Sickle Cell Disease and Thalassaemia. *Rodgers G.P. Bailliere's Clínica Hematology*. 11(1):1 – 51. 1998.

García, H. Electroforesis en gel de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.* 1(2):31 – 41. 2000.

Gibson JS., Khan A., Speake PF., Ellory JC. O² Dependence of K⁺ Transport in Sickle Cells: The Effect of Different Cell Populations and the Substituted Benzaldehyde 12C79. *FASEB J.* 15: 823 – 832. 2001.

Guyton AC. Glóbulos sanguíneos. inmunidad y coagulación de la sangre. En: *Tratado de Fisiología Médica.* Interamericana: Edit: McGraw-Hill. México. 465-475.1997.

Hardison RC., Chui DHK., Giardine B., Riemer C., Patrinos, GP., Anagnou, N., Miller W., and Wajcman H. Databases of Human Hemoglobin Variants and Other Resources at the Globin Gene Server. (Eds) *Hemoglobin.* 2001. (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>), March 17 2006.

Ibarra B, Perea FJ, Jaloma A, Romero F, González JR. Genética y Hematología. En *Genética Clínica: Diagnostico de las Enfermedades Hereditarias.* Guizar-Vázquez J (Ed).. *El Manual Moderno.* México. 29:499 – 543. 2001.

Ibarra B. Análisis del Haplotipo 5' del Bloque de Genes Globínicos Beta en Pacientes con Hemoglobina S. Tesis de Grado. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. 2005.

Jane SM., Cunningham JM. Understanding Fetal Globin Gene Expression: A Step Towards Effective Hb F Reactivation in Haemoglobinopathies. *Br J Hematol.* 102. 415 – 422. 1998.

Karp, G. Naturaleza del gen y del genoma En: *Biología Celular y Molecular.* Mc Graw Hill-Interamericana. 10:410 – 412. 1998.

Li Q., Duan Z., Stamatoyannopoulos G. Analysis of the Mechanism of Action of non-deletion Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Mutants in Transgenic Mice. *EMBO J.* 20 (1&2):157-164. 2001.

Magaña MT., Ongay Z., Tagle J., Bentura G., Cobian JG., Perea FJ., Casas-Casteñeda M., Sanchez-Lopez YJ., Ibarra B. Analysis of β^S and β^A Genes in a Mexican Population with African Roots. BCMD. 28:121 – 126. 2002.

Month SR. Wood RW., Trifillis PT., Orchowski PJ., Sharon B. Ballas SK., Surrey S. Schwartz E. Analysis of 5' Flanking Regions of the Gamma Globin Genes from Major African Haplotype Backgrounds Associated with Sickle Cell Disease. J Clin Invest, 85:364 – 370. 1990.

Morales-González KR. Caracterización Molecular de Hemoglobinopatías en Individuos de Tuxpan y Tamiahua en el Estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura de QFB, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. 2005.

Muzyamba MC, Campbell EH, Gibson JS. Effect of intracellular magnesium and oxygen tension on K⁺-Cl⁻ cotransport in normal and sickle human red cells. Cell Physiol Biochem. 17(3-4):121-8. 2006

Omori A., Tanabe O., Engel JD., Fukamizu A., Tanimoto K. Adult Stage gamma-Globin Silencing is Mediated by a Promoter Direct Repeat Element. Mol. Cell. Biol. 25(9): 3443 – 3451. 2005.

OMS. Talasemia y otras hemoglobinopatías. Informe de la Secretaría. Consejo Ejecutivo. 118ª Reunión. Punto 5.2. EB118/5. 2006

Pagnier J., Mears JG., Dunda-Belkhodja O., Schaefer-Rego KE., Beldjord C., Nagel RL., Labie D. Evidence for the Multicentric Origin of the Sickle Cell Hemoglobin Gene in Africa. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 81(6):1771 – 1773. 1984.

Patrinos GP., Kollia P., Papapanagiotou E., Loutradi-Anagnostou A., Loukopoulos D., Papadakis MN. $A\gamma$ -Haplotypes: A New Group of Genetic Markers for Thalassemic Mutations Inside the 5' Regulatory Region of the Human $A\gamma$ -Globin Gene. Am. J. Hemat. 66:99 – 104.2001.

Rapaport SI. Introducción a la Hematología. Edit. Masson Doyma. España. 2002.

Regla JA. Identificación de Cambios en la Secuencia de ADN en la Región Promotora de los Genes Gamma-Globínicos de Pacientes Mexicanos con Talasemia Beta. Tesis de Licenciatura de QFB. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. 2006.

Sánchez, JY. Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal en Tres Familias Mexicanas con Talasemia Beta. Tesis de Licenciatura en Biología. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. 1998.

Sans-Sabrafen J., Besses RC., Vives JL. Defectos Congénitos de la Hemoglobina: Hemoglobinopatías Estructurales. Hematología Clínica. Editorial Harcourt. España. 9:183 – 222. 2002.

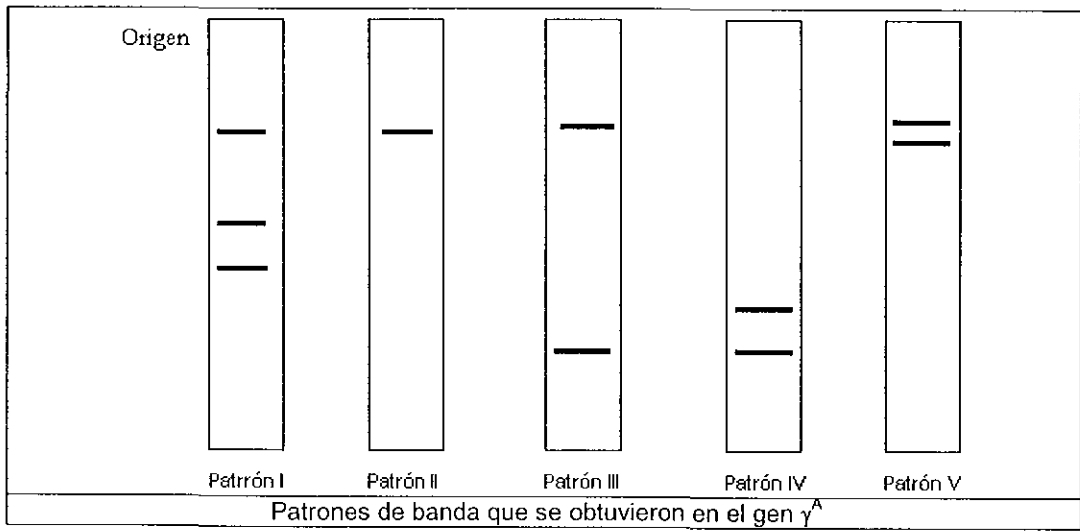
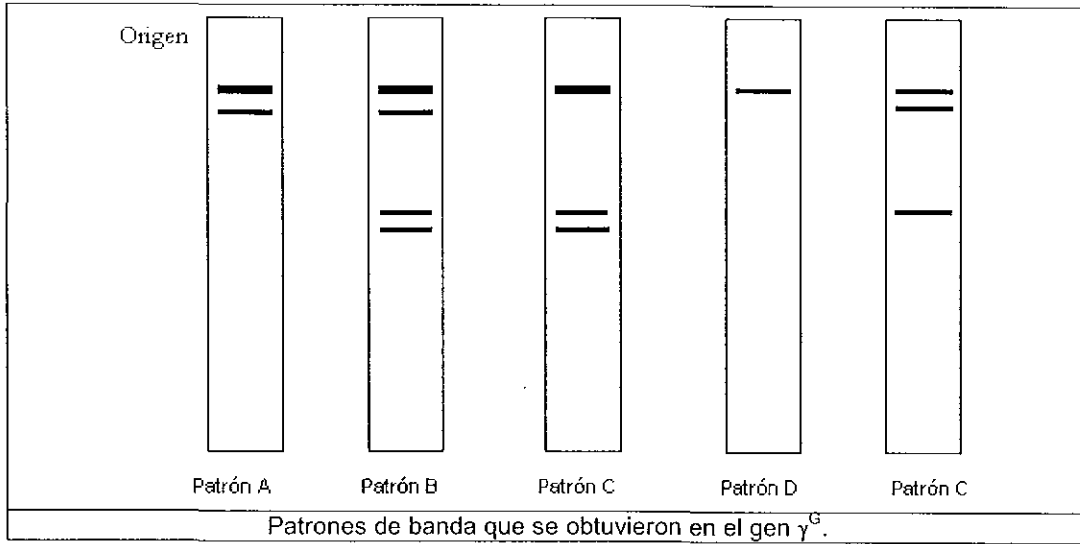
Thein SL. Genetic Modifiers of β -thalassemia. Haematologica. 90:649 – 660. 2005.

Weatherall DJ., Clegg JB. Inherited Haemoglobin Disorders: An Increasing Health Global Health Problem. Bull WHO. 79(8): 704 – 712. 2001.

Weatherall DJ., Clegg JB., Higgs DR, Wood WG. The Hemoglobinopathies in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw Hill, New York. III. 4571 – 4636. 2001.

Westermeier, R. Electrophoresis En: Electrophoresis in Practice. Edit, Wiley – VCH. Germany. 1:3-25. 2005.

ANEXO 1



ANEXO 2

FAMILIA/ MUESTRA	Hb	HCT	RDW	HbFb	HbFs	HbA	GEN	PTR γ^c	Xmn I	PTR γ^A
I-1	10.7	34.9	16.5	1.11	2.42	5.98	β^A/β^{al}	A	⊙	II
I-2	4.4	14.8	19.7	9.43	10.46	3.14	β^S/β^S	A		IV
II-3	10.8	35.5	17.7	12	12.9	1.54	β^S/β^S	A	⊙	II
III-4	16.6	49.3	14	0.73	1.4	3.36	β^A/β^A	E	⊙	II
III-5	14.5	45.0	15.2	0.78	1.09	4.87	β^A/β^S	A		II
III-6	14.7	45.6	14.7	0.77	1.05	4.7	β^A/β^A	D		IV
III-7	13.2	41.2	15.8	0.88	1.33	6.05	β^A/β^S	D		II
III-8	14.6	46	14.8	1.42	1.03	3.68	β^A/β^S	C		II
III-9	13.7	42.2	18.3	1.33	1.48	3.97	β^A/β^S	C	⊙	II
IV-10	11.7	35.0	16.1	5.26	6.56	1.76	β^S/β^S	C		II
IV-11	14.5	46	14.2	1.35	1.9	2.14	β^A/β^S	B	⊙	II
IV-12	13.5	42.6	15.4	1.9	1.56	2.48	β^A/β^S	B		II
V-13	7.4	24.3	25.1	8.82	8.42	2.73	β^S/β^S	A		II
V-14	13.7	41.8	15	1.17	1.54	1.5	β^A/β^S	B	⊙	II
VI-15	7.5	25	25.6	11.4	12.71	1.82	β^S/β^S	A		II
VI-16	14.9	46.9	15.5	5.47	14.9	1.87	β^A/β^S	A	⊙	II
VII-17	14.4	43.0	15.6	1.15	1.31	1.64	β^A/β^S	C		II
VIII-18	5.7	18.2	20.5	19.4	16.1	45.5	β^S/β^S	A		II
VIII-19	12.9	39.5	15.3	3.15	2.72	21.6	β^A/β^S	C	⊙	IV
VIII-20	15.3	47.9	13.2	1.5	1.97	23.8	β^A/β^S	A		II
IX-21	-	-	-	-	-	-	-	B		II
IX-22	-	-	-	-	-	-	-	B	⊙	III
IX-23	-	-	-	-	-	-	-	D		II
X-24	13.5	40.9	15.5	1.57	2.12	5.81	β^A/β^S	A		II
X-25	13.3	40.0	14.5	1.55	1.44	3.26	β^A/β^A	E	⊙	II
XI-26	13.3	40.9	32.6	3.66	2.45	1.53	β^A/β^S	C		IV
XI-27	15.2	46.0	16.9	3.3	1.28	3.47	β^A/β^S	D		II
XII-28	14.0	45.9	13.3	0.49	0.46	3.04	β^A/β^S	A		II
XII-29	15.3	47.6	14.4	0.47	0.24	2.82	β^A/β^S	D		II
XII-30	16.2	52.1	13.7	0.72	0.49	3.18	β^A/β^S	D	⊙	II
XII-31	15.0	49.0	13.7	0.25	0.59	2.91	β^A/β^A	A		III
XIII-32	13.7	41.2	13.1	.99	1.21	1.68	β^A/β^A	D		II
XIII-33	15.1	4.59	13.0	1.13	1.03	3.04	β^A/β^A	A		II
XIII-34	-	-	-	1.09	0.73	2.02	β^A/β^A	D		IV
XIII-35	16.5	49.5	14.4	0.81	1.79	1.96	β^A/β^S	D		II
XIV-36	5.6	17.5	24.1	6.83	7.64	2.52	β^S/β^{al}	A		II
XIV-37	10.6	3.58	1.51	2.43	1.35	4.21	β^A/β^{al}	A		II
XV-38	7.6	23.2	23.2	2.60	2.53	-	β^S/β^S	B		II
XV-39	10.6	3.32	19.1	1.30	1.56	3.90	β^A/β^S	A		II
XV-40	1.15	3.62	15.6	1.14	2.29	-	β^A/β^S	D		IV
XV-41	1.48	4.59	1.41	1.30	1.50	1.91	β^A/β^A	D	⊙	II
XV-42	1.39	4.37	14.4	1.31	1.92	2.84	β^A/β^S	A		II
XV-43	1.61	4.84	15.4	0.66	0.62	3.97	$\beta^S/\beta^{S??}$	D		IV
XVI-44	1.12	3.51	13.7	2.06	3.41	3.39	-	A	⊙	II
XVI-45	10.0	37.8	20	1.13	1.35	4.90	-	A		V
XVI-46	8.6	31.9	24.2	-	1.29	5.18	-	A		II
XVI-47	15.2	48.0	14.6	0.98	1.60	73.72	-	D		II
XVII-48	15.2	45.4	13.2	1.66	1.35	2.63	β^A/β^S	A		II
XVIII-49	10.5	33.4	14.9	1.75	1.93	6.73	β^A/β^{al}	D		II
XIX-50	13.7	40.7	15.2	1.47	1.52	2.12	$\beta^A/\beta^{A??}$	C	⊙	IV
XIX-51	15.0	44.1	14.3	1.66	1.73	2.55	$\beta^A/\beta^{A??}$	A		IV
XIX-52	15.7	47.6	15.4	1.87	1.97	2.20	$\beta^A/\beta^{A??}$	A		IV
XX-53	11.5	34.7	16.7	1.42	1.45	-	β^A/β^S	A		I
XX-54	14.9	44.5	33.4	1.13	1.37	0.00	β^A/β^S	A		II
XX-55	12.4	37.2	15.3	1.7	1.69	-	β^A/β^S	A		II
XX-56	12.1	36.5	13.9	1.29	1.48	0.00	β^A/β^S	D	⊙	III
XXI-57	8.8	28.9	-	8.4	7.12	0.00	β^S/β^{al}	A		II
XXI-58	12.2	39.6	-	1.55	2.60	2.55	$\beta^A/\beta^{A??}$	C		II
XXI-59	8.4	27.3	19.0	4.00	3.9	-	$\beta^A/\beta^{A??}$	A		II
XXI-60	13.7	41.8	14.1	1.07	1.11	-	$\beta^A/\beta^{A??}$	D		II
XXII-61	44.5	7.1	12.8	0.94	1.60	2.12	β^A/β^S	A		II
XXIII-62	25.8	103.0	20.8	11.00	9.84	1.92	β^A/β^S	A		II
XXIV-63	38.8	97.0	14.6	1.53	1.35	-	β^A/β^S	A	⊙	II

FAMILIA/ MUESTRA	Hb	HCT	RDW	HbFb	HbFs	HbA	GEN	PTR γ^c	Xmn I	PTR γ^A
XXV-64	-	-	-	-	-	2.99	β^A/β^S	E		III
XXV-65	11.2	34.0	13.7	-	1.74	2.14	β^A/β^S	D		II
XXV-66	11.9	35.9	13.8	1.80	1.08	2.10	β^A/β^A	A		II
XXV-67	11.1	34.4	16.9	1.05	0.93	1.41	β^A/β^S	E		II
XXV-68	14.4	44.3	14.3	1.66	1.35	3.30	β^A/β^S	D	®	II
XXVI-69	8.5	23.7	-	5.00	4.92	2.59	β^A/β^S	B		II
XXVI-70	-	-	-	1.90	1.5	1.66	β^A/β^S	D		V
XXVI-71	14.2	41.5	-	2.00	1.66	1.45	β^A/β^S	A		II
XXVII-72	12.2	37.1	-	1.30	1.44	1.90	β^S/β^{lat}	A		II
XXVII-73	15.0	45.1	-	1.5	1.23	2.40	β^S/β^{lat}	A		II
XXVII-74	13.0	40.8	-	1.42	1.19	2.00	β^S/β^{lat}	C		II
XXVIII-75	15.6	44.6	14.9	2.00	1.84	1.99	β^A/β^S	A		II
XXVIII-76	12.6	36.7	14.6	1.23	1.30	2.80	β^A/β^S	D		II
XXVIII-77	13.4	38.2	12.6	2.00	1.90	2.60	β^A/β^S	D		II
XXVIII-78	15.5	44.0	13.7	1.60	1.90	2.50	β^A/β^S	D		II
XXVIII-79	15.6	43.7	14.3	2.00	2.00	3.00	β^A/β^S	A		II
XXVIII-80	14.8	41.4	14.3	1.90	1.84	2.60	β^A/β^S	A		II
XXVIII-81	14.1	40.5	14.3	2.00	1.76	2.60	β^A/β^S	A		II
XXVIII-82	13.3	40.5	16.6	2.00	1.90	1.9	β^A/β^S	D		II

HbFb = Hemoglobina Fetal Betke

HbFs = Hemoglobina Fetal Singer

Hb A = Hemoglobina Adulta

GEN = Genotipo

PTR = Patrón

BIBLIOTECA CUCBA