

50524
40 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

16

FRECUENCIA DE HEMOGLOBINA-S EN
POBLACIONES MEXICANAS Y HAPLOTIPOS
BETA-S EN PACIENTES CON ANEMIA DE
CÉLULAS FALCIFORMES. INVESTIGACIÓN
DE LABORATORIO

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTADA POR:

JORGE NORBERTO GARCÍA AZUARA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. EN CS. ROSENDA ISABEL
PEÑALOZA ESPINOSA



MÉXICO D.F.

JUNIO DEL 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

2

FRECUENCIA DE HEMOGLOBINA-S EN POBLACIONES MEXICANAS Y
HAPLOTIPOS BETA-S EN PACIENTES CON ANEMIA DE CÉLULAS
FALCIFORMES. INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

JORGE NORBERTO GARCÍA AZUARA

TESIS PRESENTADA A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EL HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO
MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA EN CIENCIAS ROSENDA ISABEL
PEÑALOZA ESPINOSA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

GARCÍA AZUARA JORGE NORBERTO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: "Frecuencia de hemoglobina S en poblaciones mexicanas y haplotipos beta-S en pacientes con anemia de células falciformes. Investigación de laboratorio".

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

- PRESIDENTE M. en C. ROSALINDA ESCALANTE PUEGO
- VOCAL * DRA. en C. ROSENDA I. PEÑALOZA ESPINOSA
- SECRETARIO Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN
- SUPLENTE Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS
- SUPLENTE DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA

Rosalinda Escalante

Rosenda I. Peñaloza Espinosa

Patricia Vidal Millán

Gustavo Miranda Contreras

María Teresa Corona Ortega

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 03 de Diciembre de -2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ-MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

ZARAGOZA
JEFATURA DE LA CARRERA
DE Q. F. A.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El esqueleto de la ciencia son los hechos, pero los músculos y los nervios son el significado que se les confiere, y el alma de la ciencia son las ideas.

Ruy Perez Tamayo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A G R A D E C I M I E N T O S

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mi novia que en un futuro no muy lejano lo dejará de ser para convertirse en mi esposa.

Le doy las gracias por su apoyo incondicional por mostrarme con el ejemplo que nada es difícil y que todo se puede realizar con empeño y esfuerzo. Por los días que no puede estar con ella, para poder realizar este proyecto que hoy se culmina.

Solo te puedo decir una sola cosa

Gracias amor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis padres con los que siempre he contado y espero seguir contando con ellos.

Les agradezco la inversión que han hecho en mí. Pues cada peso que sembraron en mí hoy se ve hecho realidad en nuestro objetivo mutuo.

Gracias mamá por todo lo que me enseñaste al igual que tu papá. Pues ello aun que no lo crean se ve aquí plasmado

Gracias a ustedes dos que son mis más fuertes pilares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis hermanos que siempre me apoyaron sin entender en ocasiones que era lo que hacía pero que siempre estaban ahí sin molestar, ni haciendo ruido, contribuyendo a su manera para llegar a esta meta.

Gracias

Mucho ayuda el que no estorba.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis amigos que sin saber que era lo que hacía y sin preguntar estuvieron ahí animándome. Pero en especial quiero agradecer a Hugo Salas Cuevas las facilidades que me han brindado para poder plasmar en el papel este trabajo. Ya que sin él no hubiese quedado así.

Gracias amigos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis asesores, que aunque no pude estar en contacto directo con ellos en algunas ocasiones, gracias por ayudarme a integrar todos estos conceptos y guiarme para poder culminar este trabajo, ya que ellos me dieron ideas para mejorarlo y que así quedara lo mejor posible.

Gracias:

Dra. Rosenda Isabel Peñalosa

Dra. Teresa Corona

Maestra Rosalinda Escalante

Q.F.B. Patricia Vidal

Q.B.P. Gustavo Miranda

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Q.B.P. Beatriz Nieva García Jefa del área de hematología del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI.

Q.C. María Arcelia Hernández Maya por las muestras otorgadas para este proyecto.

Dra. Leonor Buentello del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM por las muestras brindadas para este proyecto.

Dr. Fabio Salamanca Gómez Jefe de la U.M.I en genética humana

Gracias de todo corazón y fue un placer haber trabajado con ustedes.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A los que ya no están aquí, pero que nos dejan un legado que en vida fue de lo mejor. Me refiero Antonio Saens y a Osvaldo Estrada Rosiles. Pues gracias a que ellos me apoyaron en momentos de flaqueza es que estoy hoy aquí.

No les puedo decir nada más que gracias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice

I.	Introducción.....	1
II.	Generalidades	
	Eritrocito.....	2
	Hemoglobina.....	3
	Locus α Globina.....	5
	Locus β globina.....	5
	Hemoglobinopatías.....	7
	Hemoglobinopatías estructurales.....	7
	Genética de las anomalías de la hemoglobina.....	8
	Ley Hardy- Weinberg.....	8
	Nomenclatura de las hemoglobinas anormales.....	9
	La mutación en la hemoglobina.....	10
	Rasgo de las células falciformes.....	12
	Fisiopatología.....	13
	Variantes genéticas.....	15
	Manifestaciones Clínicas.....	16
	Interacciones con la Malaria.....	17
	Haplotipos del gen beta globina.....	19
III.	Planteamiento del problema.....	22
IV.	Objetivo General.....	22
V.	Objetivos particulares.....	22

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VI. Hipótesis.....23

VII. Diseño de investigación.....23

VIII. Población.....23

IX. Criterios de inclusión.....25

X. Criterios de exclusión.....25

XI. Criterios de eliminación.....25

XII. Diagrama de flujo.....26

XIII. Material

- Recolección de muestras sanguíneas.....27
- Separación de rojos y blancos.....27
- Electroforesis de Hemoglobinas.....27
- Extracción de DNA.....27
- Concentración DNA.....28
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....28
- Electroforesis.....28
- Corte con enzimas de restricción.....28

XIV. Metodología

- Extracción del DNA de sangre periférica.....29
- Electroforesis.....30
- Técnica para leer concentración de DNA.....31
- Amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....33
- Corte con enzimas de restricción.....35
- Extracción de DNA del gel de agarosa.....37

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Electroforesis de Hemoglobinas.....38
- XV. Resultados
 - Resultados de las frecuencias de hemoglobinas.....41
 - Resultados de la caracterización de haplotipos de los tres pacientes homocigotos de Hb S.....48
- XVI. Discusión de Resultados.....53
- XVII. Conclusión.....56
- XVIII. Bibliografía.....57

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de Tablas

- 1. Hemoglobinas Humanas.....4
- 2. Ejemplos de herencia mendeliana de las hemoglobinopatías.....8
- 3. Frecuencia de variantes del gen globina en diferentes grupos étnicos en una población de recién nacidos de California.
^bHbSS incluye HbS/beta⁰-talasemia.....15
- 4. Porcentaje de hemoglobinas encontradas en las poblaciones.....41
- 5. Frecuencia de alelos A y S en las poblaciones estudiadas.....41
- 6. Límites superior e inferior del % de hemoglobina.....42
- 7. Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de Poza Rica Veracruz.....42
- 8. Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de Ixhuatlancillo Veracruz.....42
- 9. Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de San Pedro Atocpan.....43
- 10. Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de Santa Ana Tlacoteco.....43
- 11. Resultados de cortes con enzimas de restricción.....52
- 12. Frecuencia de Hb S en las costas del Golfo y del Pacífico de México.....54
- 13. Frecuencia de Hb S en poblaciones Indígenas de México.....55

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Índice de Figuras

- 1. Estructura de la hemoglobina adulta.....3
- 2. Familia de los genes alfa y beta.....6
- 3. Eritrocitos en forma de hoz.....10
- 4. Representación esquemática en la sustitución de un aminoácido en la enfermedad de las células falciformes.....11
- 5. El glóbulo rojo con hemoglobina anormal (S) cambia su forma a una hoz cuando tiene poco oxígeno.....13
- 6. Representación esquemática de la polimerización de la hemoglobina S.....13
- 7. Eritrocitos normales y en forma de hoz en circulación.....14
- 8. Ciclo de la malaria.....17
- 9. Sitios de corte con Endonucleasas de Restricción en el gen β globina.....19
- 10. Distribución de haplotipos de hemoglobina S en África y Asia.....20
- 11. Poza Rica, Veracruz.....23
- 12. Ixhuatlancillo, Veracruz.....24
- 13. Mapa de Milpa Alta.....24
- 14. Dos ejemplos de las electroforesis realizadas a las cuatro poblaciones en estudio, donde se observa corrimiento de Hb AA, AS, AF y SS.....41
- 15. Electroforesis de los amplificados de las regiones 1,2 y 5 de la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β^S48
- 16. Electroforesis de los amplificados de la región 4 de la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β^S49

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

17. Electroforesis de los amplificados de las regiones 6, 7,
y repetición de C5, C2 y C1 la familia β globina en tres
homocigotos para la mutación β^s50
18. Electroforesis de los amplificados de la región 3 de
la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β^s51

Índice de Gráficos

- 1. Porcentaje y frecuencia de las distintas hemoglobinas en una población de mestizos de Poza Rica, Veracruz.....44
- 2. Porcentaje y frecuencia de las distintas hemoglobinas en una población de habla náhuatl de San Pedro Atocpan.....45
- 3. Porcentaje y frecuencia de las distintas hemoglobinas en una población de habla náhuatl de Santa Ana Tlacotenco.....46
- 4. Porcentaje y frecuencia de las distintas hemoglobinas en una población de habla náhuatl de Ixhuatlancillo, Veracruz.....47

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Índice de abreviaturas

A	adenina	SS	Homocigoto S
α	alfa	PO ₂	Presión Parcial de Oxígeno
DNA	ácido desexorribonucleico	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EDTA	Acido etilendiamino Tetracetico.	LCR	región de control del locus
Glu	ácido glutámico	CAR	República Central Africana.
ACF	anemia de las células falciformes	rpm	revoluciones por minuto
β	beta	ATP	trifosfato de adenosina
NaCl	Cloruro de sodio	TAE	Tris acetato EDTA
Mg Cl ₂	Cloruro de magnesio	UV	Ultra violeta
δ	delta	Val	valina
DPG	2,3difosfoglicerato	ζ	zeta
DNTP	deoxinucleótidos trifosfatos	SDS	
ϵ	épsilon		
γ	gama		
GR	glóbulo rojo		
Hb	hemoglobina		
G	guanina		
AS	Heterocigoto AS o Rasgo de células		
Hb	Hemoglobina		
HbA	Hemoglobina Adulta		
HbA ₂	Mayor porcentaje Hemoglobina Adulta		
Hb F	Menor porcentaje Hemoglobina fetal		
Hb S	Hemoglobina S		
Hb SC	Hemoglobina SC		

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I. Introducción

La frecuencia de hemoglobina S (mutación β^s de las cadenas beta globina) es una condición poco estudiada en la República Mexicana. Debido a que la población elegida contiene una mezcla de genes indígenas, europeos y africanos en diferente proporción, la posibilidad de que se presente la anemia de las células falciformes es alta en poblaciones costeras y baja en poblaciones centrales de la República Mexicana.

Por lo que en esta ocasión se estudio la frecuencia de ésta en una población mestiza de la Costa del Golfo (Poza Rica, Veracruz) y tres poblaciones de habla náhuatl (Ixhuatlancillo Veracruz; San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco de la delegación Milpa Alta).

Para tal fin se empleó la técnica de electroforesis de hemoglobinas en medio alcalino, por medio del kit hydrasis de SEBIA. El cual nos permite diferenciar los tipos de hemoglobina S, A y F.

La frecuencia del alelo β^s en la población mestiza estudiada fue mayor que la observada en poblaciones de habla náhuatl.

Por otra parte se estudiaron los haplotipos de tres pacientes mexicanos con anemia de células falciformes que fueron homocigotos para la mutación β^s . Los anteriores fueron localizados en la población estudiada de Poza Rica, Veracruz. Esto se realizo mediante siete cortes con enzimas de restricción (Xmn I, Hind II (2), Hinc II (2), Inf. I y Hpa I) sobre la región de los genes beta globina (cromosoma 11p región 15.5).

Dos de ellos fueron homocigotos para el haplotipo Bantú y uno heterocigoto Bantú-Arabia Saudita.

Esto nos permite conocer mejor a la población mexicana tanto desde el punto de vista proteico como molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. Generalidades

Eritrocito

El hematíe, eritrocito o glóbulo rojo (GR) es una célula que presenta importantes diferencias con respecto a otras células del organismo. En primer lugar, no tiene núcleo, por lo que le falta la capacidad de división, tampoco tiene mitocondrias o ribosomas, ni ácido desoxirribonucleico (DNA). Sin embargo, el hematíe es una célula compleja y metabólicamente activa cuya vida media es de alrededor de 120 días.

La integridad del GR depende de la interacción de tres unidades que lo capacitan para realizar su función primaria de transporte de oxígeno y CO_2 . Estas tres unidades son la hemoglobina, la membrana eritrocitaria, y los elementos solubles intracelulares (enzimas, coenzimas, y substratos del metabolismo de la glucosa). La alteración de una de estas unidades proteicas da lugar a alteraciones en las otras dos, resultando en un acortamiento de la vida media eritrocitaria (hemólisis)¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hemoglobina

La molécula de hemoglobina (Hb) está compuesta por cuatro porciones diferentes: 1) Un componente proteico llamado globina constituido por cuatro cadenas polipeptídicas que son dos pares diferentes y cada par posee idéntica estructura primaria; 2) cuatro moléculas de protoporfirina IX; 3) cuatro átomos de hierro en estado ferroso que, combinados con protoporfirina IX, forman las cuatro moléculas del grupo hem; 4) una molécula de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) metabolito derivado de la glucólisis anaerobia que favorece la liberación de oxígeno, ubicada en el centro de la unidad de Hb figura 1².

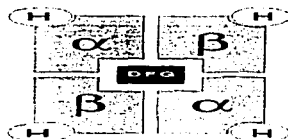


Figura 1 Estructura de la hemoglobina adulta.

Las cadenas polipeptídicas están representadas por las áreas α y β ; los círculos H indican los cuatro grupos hem, integrados a su vez por sendos átomos de hierro combinados por protoporfirina IX; el cuadro central (DFG), esquematiza al 2, 3-difosfoglicerato.

La porción globínica está formada por dos tipos de cadenas: alfa (α) y no-alfa, también llamadas beta (β). Las alfa de 141 aminoácidos y las beta de 146 aminoácidos. Ambas constituyen familias de genes relacionados dando lugar a polipéptidos que se expresan en diferentes estadios del desarrollo humano. Durante los tres primeros meses de vida intrauterina, se sintetizan sucesivamente tres hemoglobinas embrionarias llamadas Gower1 formada por dos tipos de cadena: las zeta (ζ) y las épsilon (ξ) (ζ 2, ξ 2) y Gower2 formada por dos tipos de cadenas alfa y épsilon (α 2 y ξ 2). Finalmente la hemoglobina Portland formada por cadenas zeta y gama (γ) (ζ 2 y γ 2). En el cuarto mes del embarazo se sintetiza la hemoglobina fetal que predomina en esa época de la gestación (α 2, γ 2) y disminuye después del nacimiento. Las hemoglobinas del adulto HbA1 (α 2, β 2) y la HbA2 formada por cadenas alfa y delta (δ) (α 2, δ 2) alcanzan su nivel más alto

después de los 6 meses de edad. HbA1 constituye el 96%, HbA2 (1-3%) y HbF (0-2%) tabla 1.

Tabla 1 Hemoglobinas Humanas

Hemoglobina embrionaria	Hemoglobina Fetal	Hemoglobina adulta:
Gower 1- zeta(2), epsilon(2)	Hb F- alfa(2), gamma(2)	Hb A- alfa(2), beta(2)
Gower 2- alfa(2), epsilon(2)		Hb A2- alfa(2), delta(2)
Portland- zeta(2), gamma(2)		

Los genes que codifican para las cadenas de α globina se encuentran en el brazo corto del cromosoma 16. Los que codifican para las cadenas β están localizadas en el brazo corto del cromosoma 11. Múltiples genes individuales se expresan en cada uno de estos sitios. También existen pseudogenes que están presentes y localizados dentro de la región de la familia de los genes. Al complejo α es llamado "locus α globina" y el complejo beta "locus no alfa o β globina". El balance de la expresión genética entre estos dos "locus" es necesario para la función normal del eritrocito³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Locus α Globina

Cada cromosoma 16 tiene dos genes α globina que son idénticos y están alineados uno después de otro en el cromosoma, (llamados $\alpha 1$ y $\alpha 2$) figura 2. Cada célula tiene dos cromosomas 16, que hacen un total de cuatro genes α globina existentes en cada célula. Cada uno de los cuatro genes produce cerca de $\frac{1}{4}$ de cadenas α , necesarias para la síntesis de hemoglobina. El mecanismo de esta coordinación es desconocido, pero existen elementos promotores 5' para cada gen α y una poderosa región de incremento llamada región de control del locus (LCR), requerida para la óptima expresión del gen³.

Locus β globina

Los genes en el locus β globina están acomodados secuencialmente de 5' a 3' figura 2. En un principio los genes son expresados en el desarrollo embrionario. La secuencia de los genes es: ϵ , γ , δ , y β . Hay dos copias del gen γ en cada cromosoma 11. La diferencia es que uno de ellos tiene una base guanina (G) y el otro una adenina (A). Los otros solo están presentes en una sola copia. Cada célula tiene dos genes β , uno en cada uno de los dos cromosomas 11 en la célula. Los dos genes β expresan la proteína globina en una cantidad precisamente igual que los cuatro genes α ³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

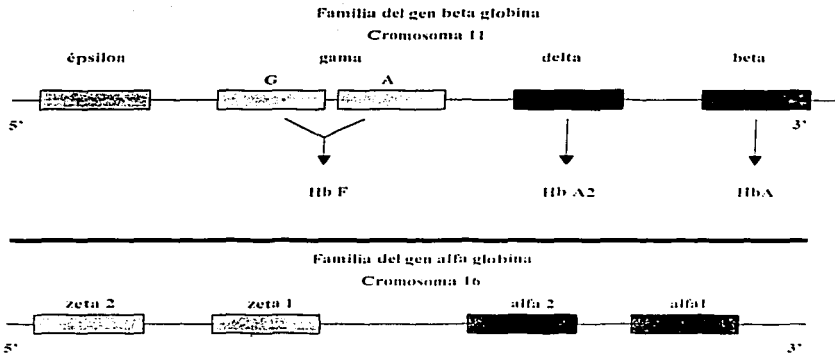


Figura 2 Familia de genes alfa y beta

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Hemoglobinopatías

Son alteraciones cualitativas o cuantitativas de la globina, secundarias a mutaciones genéticas, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural (hemoglobinopatías estructurales), una disminución o ausencia de la síntesis de una cadena globinica estructuralmente normal (Talasemias)¹.

La mayoría de las variantes de la hemoglobina resulta de la sustitución de un aminoácido por otro en algún sitio de las cadenas polipeptídicas que la componen. Sin embargo, en menor proporción también se encuentran otras variaciones estructurales más complejas de la molécula, como la sustitución de dos aminoácidos, el alargamiento de una cadena polipeptídica y las fusiones de cadenas².

Hemoglobinopatías estructurales

Son el resultado de mutaciones a nivel de alguno de los genes que codifican la síntesis de una determinada cadena globinica se consideran hemoglobinopatías solo aquellas mutaciones que afectan regiones esenciales de la molécula y que por tanto, poseen expresividad clínica. En general, las mutaciones de aminoácidos situadas en la superficie de la molécula solo producen modificaciones de carga eléctrica, mientras que los aminoácidos internos ocasionan, casi siempre, una importante alteración estructural y funcional de la hemoglobina y su repercusión clínica suele ser mayor: anemia hemolítica (hemoglobinas inestables), poliglobulia (hemoglobinas con alteración de su afinidad por el oxígeno) o cianosis (Hemoglobinas M)¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Genética de las anomalías de la hemoglobina

La herencia de las variantes de la Hb obedece las leyes de Mendel. En la tabla 2 se indican ejemplos de cinco diferentes patrones hereditarios que pueden encontrarse en los descendientes de los padres cuyas características hipotéticas se señalan.

	S	S		A	S		A	S		S	S		S	S
A	AS	AS	A	AA	AS	A	AA	AS	A	AS	AS	S	SS	SS
A	AS	AS	A	AA	AS	S	AS	SS	S	SS	SS	S	SS	SS
	a)			b)			c)			d)			e)	

Tabla 2 Ejemplos de herencia mendeliana de las hemoglobinopatías. a) Homocigoto AA x homocigoto SS. Descendencia 100% AS. b) Homocigoto AA x heterocigoto AS. Descendencia 50% AA, 50% AS. c) Heterocigoto AS x AS. Descendencia 25% AA, 50% AS, 25% SS. d) Heterocigoto AS x homocigoto SS. Descendencia 50% AS, 50% SS. e) Homocigoto SS x homocigoto SS. descendencia 100% SS.

Una persona que tiene dos variantes de la hemoglobina (por ejemplo Hb SC) se designa como doble heterocigoto o heterocigoto compuesto, y ha heredado una variante anormal diferente de cada uno de sus padres. Otra categoría doble heterocigota es la combinación de una anomalía estructural con otra síntesis; ejemplo de ello sería la Hb S-talasemia beta².

Ley Hardy-Weinberg

La ley prueba: a) que independientemente de que tan raro sea el homocigoto para un gen, la proporción de heterocigotos es sorprendentemente elevada, y b) que la frecuencia de los genes permanece inmutable a través del tiempo⁴.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Nomenclatura de las hemoglobinas anormales

A las variantes de la Hb se les identifica por un nombre propio y una designación científica.

Durante la época en que se efectuaron las primeras investigaciones en el campo de las hemoglobinas anormales, y a medida que se iban identificando las primeras variantes por sus diferencias de motilidad electroforética, se les asignaba el nombre de alguna letra del alfabeto, reservando la letra "A" para el componente mayor de la Hb adulto; la letra "F" para la hemoglobina fetal y la "S" para la hemoglobina de la degranocitosis o anemia de hematíes falciformes, aludiendo a la primera letra del nombre en inglés del padecimiento: *sickle cell anemia*.

Esta nomenclatura funcionó hasta 1956. Para esta fecha habían identificado la ya mencionada Hb S y también las hemoglobinas C, D, E, F, G, H, I y J. Sin embargo, los investigadores advirtieron que muy pronto serían insuficientes las letras del alfabeto para designar a las nuevas variantes y acordaron suspender, hasta la letra J, la nomenclatura basada en este sistema.

La designación científica de las variantes de la hemoglobina se basa en cuatro características: 1) la cadena de polipéptidos afectada; 2) el sitio de la cadena en donde ocurrió la sustitución del aminoácido; 3) el número del segmento de la hélice involucrada en la sustitución, y 4) el tipo de mutación observada. Ejemplo Hb S es Beta 6 (A3) Glu→Val

Lo anterior se puede interpretar como una variante de la cadena beta, que afecta al aminoácido número 6, ubicado en la tercera porción del segmento helicoidal A. La variante esta causada por la sustitución del aminoácido normal ácido glutámico (Glu) en ese sitio de la cadena beta por valina (Val)².

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La mutación en la hemoglobina

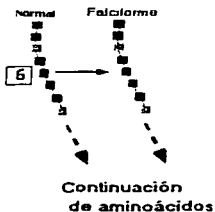
La anemia de las células falciformes (ACF) fue descrita por primera vez por Herrick de Chicago en 1910, en un estudio en el Este de la India. El peculiar alargamiento y la forma de hoz de los eritrocitos observada en sangre periférica, figura 3 sugirió el término de anemia de células falciformes. En 1949 Pauling y colaboradores demostraron que este fenómeno de forma de hoz, se relaciona con una anomalía de la hemoglobina presente en todos los pacientes con este tipo de anemia; esta hemoglobina tiene una migración electroforética anormal. Subsecuentemente, en 1956 la hemoglobina que participa en esta anemia fue caracterizada químicamente por Ingram y fue diferenciada de la hemoglobina del adulto (Hb A, $\alpha_2\beta_2$), por una sustitución de ácido glutámico a valina en la posición 6 de la subunidad β . La caracterización molecular fue demostrada a partir del estado homocigoto (SS) del gen β^S . La anemia de las células falciformes ocurre primordialmente en poblaciones de africanos, pero también se presentan en el Mediterráneo, Medio Este, en algunas regiones de la India y en aquellos países donde ha habido migración de estas poblaciones, como sucedió en nuestro país en la época de la Colonia⁵.



Figura 3 Eritrocitos en forma de hoz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La figura 4, describe los primeros aminoácidos en la subunidad β de la molécula de hemoglobina. Los aminoácidos de la proteína de hemoglobina son representados como series de cajas. El color rosa representa la secuencia normal ácido glutámico en la posición 6. El verde oscuro representa la valina en las células falciformes. Los otros aminoácidos de la hemoglobina en las células falciformes son idénticos a los de la hemoglobina normal.



La molécula de DNA es el material genético fundamental que determina el arreglo de los aminoácidos en todas las proteínas. Los segmentos de DNA que codifican particularmente para proteínas son llamados genes³.

Figura 4 Representación esquemática en la sustitución de un aminoácido en la enfermedad de las células falciformes.

Rasgo de las células falciformes

Si solo uno de los genes β es anormal y el otro es normal (heterocigoto), la persona es un portador de la enfermedad de las células falciformes (AS). Esta condición es conocida como "rasgo de células falciformes". Estos sujetos se hallan habitualmente asintomáticos y la exploración física es negativa. Con raras excepciones las personas con el rasgo de células falciformes son completamente normales. Si ambos genes β codifican para la proteína de las células falciformes, la persona presentara la enfermedad de las células falciformes. La cual es determinada en la concepción, cuando la persona adquiere genes de los padres. También, el rasgo de las células falciformes no hace que se desarrolle la enfermedad. Este particularmente protege a la gente de la patogenicidad de la malaria. La frecuencia de la enfermedad presenta altos niveles en África e India ambas poblaciones presentan protección contra la malaria debido al rasgo de las células falciformes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fisiopatología.

El gen β está localizado en el cromosoma 11 en la región p15.5.

Cuando la Hb S está bien oxigenada es totalmente soluble. Sin embargo, cuando disminuye la presión parcial de oxígeno (PO_2), la molécula de Hb se polimeriza y se forman cristales, que vuelven rígidos a los eritrocitos figura 5.

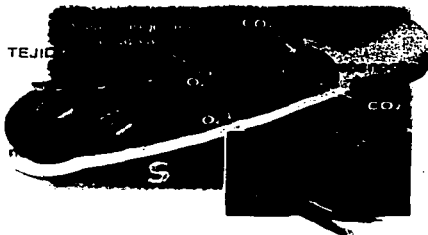


Figura 5 El glóbulo rojo con hemoglobina anormal (S) cambia su forma a una hoz cuando tiene poco oxígeno.

Cuando la hemoglobina S libera al oxígeno en los tejidos periféricos, las moléculas se fijan y forman polímeros. Los polímeros rígidos deforman las células y es la causa de la forma curva que presentan. Un solo eritrocito recorre el aparato circulatorio cuatro veces en un minuto. La hemoglobina S sufre repetidos episodios de polimerización y despolimerización figura 6.



Figura 6: Representación esquemática de la polimerización de la hemoglobina S.

Algunos tipos de moléculas de hemoglobina, tales como la hemoglobina fetal bloquean las interacciones entre la desoxigenación de las moléculas de la hemoglobina S. Todas las personas tienen de 0 a 1% hemoglobina fetal en su circulación. La hemoglobina fetal protege al neonato y a los recién nacidos de los efectos de la hemoglobina S. Desafortunadamente, esta hemoglobina tiende a desaparecer en el primer año de vida.

La figura 7 ilustra los cambios que ocurren en los eritrocitos normales y en los eritrocitos en forma de hoz en la circulación del oxígeno.

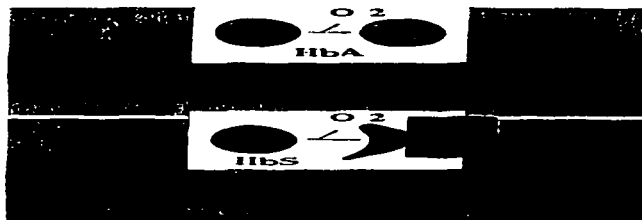


Figura 7 Eritrocitos normales y en forma de hoz en circulación.

Los eritrocitos normales presentan su forma bicóncava antes y después de viajar por el torrente sanguíneo, pues se mueven directamente por los pequeños vasos capilares. En contraste, la polimerización de la hemoglobina deforma los eritrocitos. El problema, sin embargo, no es simplemente la forma. La membrana de estas células es rígida o presentan repetidos episodios de polimerización o despolimerización de la hemoglobina.

Estas células rígidas fallan en el movimiento directo a través de los pequeños vasos sanguíneos, bloqueando el flujo sanguíneo local de la región microscópica del tejido. Al repetirse en muchas ocasiones estos episodios, se produce hipoxia en el tejido. El resultado es dolor, y daño de los órganos³.

Variantes genéticas

De las 600 variantes existentes del gen β varias son patológicas. Los individuos descendientes de africanos exhiben una alta frecuencia de riesgo de presentar el genotipo, pero los individuos descendientes de personas de origen del Mediterráneo, Caribe, Sur y Centro América, Arabia y este de India también muestran una alta frecuencia de riesgo en su genotipo. La tabla 3 enlista la frecuencia específica de algunas variantes alélicas para los genes β en las diferentes poblaciones^{5, 7 y 8}.

Tabla 3 Frecuencia de variantes del gen globina en diferentes grupos étnicos en una población de recién nacidos de California. ^aHbSS incluye HbS/beta⁰-talasemia.

Etnia	Hb SS ^a	Hb AS	Hb S/ beta ^a talasemia	Hb SC	Hb SD	Hb SE
Asiáticos	0/207551	1/1336	0/207551	0/207551		
Indios Asiáticos	0/15843	1/725	1/15843	0/15843		
Negros	1/700	1/14	1/4056	1/1297	1/63885	1/63885
Hispanos	1/45622	1/183	1/729953	1/364976	1/1459906	1/1459906
Medio este	0/21677	1/360	0/21677	0/21677		
Nativos de América	1/18529	1/176	0/18529	0/18529		
Caucásicos	1/158127	1/625	1/553447	0/1106895		

Las variantes que incluyen un gen S y el otro alguna otra variante anormal de la Hb se definen como dobles heterocigotos o heterocigotos compuestos. Entre ellos se encuentran las hemoglobinopatías SC, S-talasemia beta, S-talasemia alfa, S-persistencia hereditaria de la Hb fetal, S-D Los Angeles, S-O Arabe, S-G Filadelfia S-Lepore².

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Manifestaciones Clínicas

La enfermedad de las células falciformes se refiere a un desorden genético autosómico recesivo caracterizado por una variante de la hemoglobina (Hb S).

La primera causa de las manifestaciones clínicas es la polimerización intracelular de la Hb S que ocurre cuando los eritrocitos son parcialmente desoxigenados bajo hipoxia. La polimerización intracelular de la Hb S causa pérdida de flexibilidad en los eritrocitos. Repetidos ciclos de oxigenación y desoxigenación resultan en daño irreversible de la membrana de la célula. La membrana dañada pierde agua y potasio intracelular, y la hidratación progresiva de las células hace más denso al eritrocito. Los eritrocitos con Hb S una vez deformados, producen una oclusión microvascular y anemia hemolítica que son típicas de esta enfermedad.

El mecanismo exacto de la vaso oclusión no está completamente elucidado. Muchos factores juegan un papel importante en la fisiopatología del proceso: adhesión molecular, anomalías de las células endoteliales y factores de coagulación⁹.

Las manifestaciones clínicas más comunes en la enfermedad de las células falciformes son anemia, crisis recurrentes vaso oclusivas e infecciones bacterianas por *S. pneumoniae*¹⁰.

La presentación clínica es similar en todas las hemoglobinopatías S. los pacientes homocigotos Hb S y S- β^s (tal) tienden a presentar patologías más severas que las hemoglobinopatías SC y S- β^s (tal).

Existe evidencia que indica que niveles altos de Hb F provee un efecto protector en la enfermedad¹¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Interacciones con la Malaria

La malaria, también llamada paludismo, es una enfermedad que se transfiere a los humanos mediante un vector (vehículo o agente que transmite una infección). El mosquito *Anófeles* es el vector más común de la malaria.

El parásito llega al vector cuando el mosquito pica a una persona infectada. Luego, el parásito se transfiere a otra persona mediante la picadura de un nuevo mosquito Figura 8. Con menos frecuencia, el plasmodio puede transferirse por la sangre, ya sea mediante una transfusión de sangre infectada o por compartir una aguja contaminada¹².

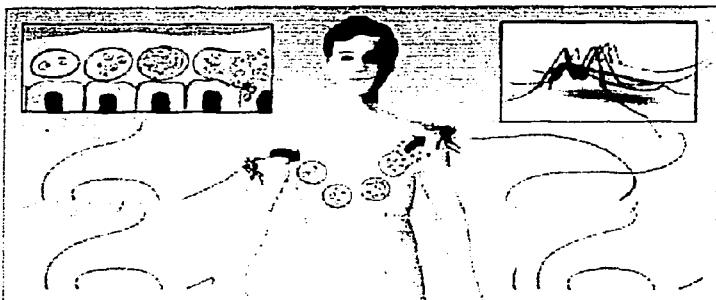


Figura 8 Ciclo de la malaria. El mosquito portador del parásito de la malaria pica a una persona y le inyecta el parásito en la sangre. El parásito se reproduce en el hígado y regresa a la sangre causando varios síntomas. Otro mosquito pica a la persona infectada y el parásito se transmite a un nuevo vector; cuando éste pica a otra persona el ciclo se repite.

Los portadores heterocigotos de la mutación β^S ($A\beta^S$) son resistentes a la infección por el parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, en comparación con la población normal (AA) que sí la padece¹³.

Las investigaciones bioquímicas y los estudios ultraestructura indican que las mitocondrias, incluso quizá las de aspecto atípico que se hallan en ciertas fases del parásito, poseen sistemas enzimáticos dotados de importantes funciones respiratorias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto los hematíes humanos, es posible que las variaciones de la concentración de trifosfato de adenosina (ATP), sustancia que tiene una intervención importante en la utilización de la glucosa por el parásito, afecta directamente al desarrollo de los trofozoitos de *P. falciparum*. Incluso se ha pensado que la baja concentración de ATP (asociación posiblemente a la Hb beta S) puede ser uno de los factores genéticos selectivos que determinan la relativa resistencia de ciertos grupos raciales al paludismo.

De una forma u otra, el parásito intraeritrocítico ingiere el contenido de la célula huésped, el cual puede consistir sobre todo en hemoglobina, cuando se trata de hematíes maduros, o en orgánulos de hematíes y precursores de la hemoglobina en el caso de los reticulocitos y de los eritroblastos. No se sabe en qué medida las distintas hemoglobinas son aceptables para las diferentes especies de parásitos; así por ejemplo, se ignora si, como se ha puesto, la hemoglobina de los hematíes falciformes es inaceptable para el *P. falciparum* y si, en caso que sea así, ello se debe a factores químicos o factores meramente físicos¹³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Haplotipos del gen beta globina

Los haplotipos de la anemia de las células falciformes puede ser descritos como sitios polimórficos donde cortan las endonucleasas de restricción en un gen β mutante Figura 9¹⁴.

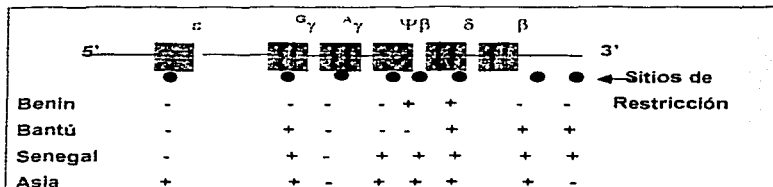


Figura 9. Sitios de corte con Endonucleasas de Restricción en el gen β globina. Los puntos azules indican la localización del sitio donde cortan las endonucleasas de restricción en el análisis del haplotipo de la hemoglobina S (la especificidad de las enzimas de restricción usada en cada sitio no está indicada). Una "+" indica susceptibilidad a la digestión con la enzima de restricción; una "-" indica resistencia a la digestión con la enzima de restricción.

Todos los haplotipos se numeraron para su identificación, pero son más comúnmente conocidos por el área geográfica en que fueron primero identificados: Senegal, Benin, República Central Africana (CAR o Bantú), Camerún y Arabia-India (o Asia)¹⁵. Los haplotipos fueron identificados por investigadores que trabajaron con grupos de personas en varios países primero en el oeste de África¹⁶.

El haplotipo Senegal predomina en esta región, pero también en el oeste de África cerca del río Níger. El haplotipo designado como Benin predomina en Nigeria y países que colindan con el mar de Benin. El haplotipo Bantú o CAR predomina en el centro y sudeste de África Central. El haplotipo Camerún solo predomina en gente de Camerún. El haplotipo Arabia-India usualmente se refiere al haplotipo que predomina en el golfo de Persia y la India.

La existencia de haplotipos específicos para ciertas regiones del mundo sugiere que la mutación en el gen β globina tiene un origen separado de estas

localizaciones figura 10¹⁵.



Figura 10 Distribución de haplotipos de hemoglobina S en África y Asia^{15, 16}

Todas estas áreas en cuestión son nuevas o tienden a ser sitios endémicos de malaria. Esta observación se basa en la idea de la alta incidencia de casos en estas áreas derivados de la selección natural¹⁵. La mutación que produce la anemia de las células falciformes ocurre espontáneamente en un bajo grado. La gente con un gen Hb S y otro gen normal de Hb (presenta el rasgo Hb S) estas personas son más resistentes a la malaria que las personas que tienen los dos genes normales.

En las poblaciones de África, cada haplotipo es asociado con la gravedad de la enfermedad. Las personas con el haplotipo Senegal cursan con una enfermedad menos severa clínicamente, que las personas que presentan el haplotipo CAR/Bantú las cuales cursan una enfermedad más severa. Las personas con el haplotipo Benin cursan con una enfermedad intermedia entre estas dos¹⁸. Tres son los haplotipos más comunes en América: Senegal Benin y Bantú/CAR^{18 y 19}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El haplotipo Bantú incrementa el riesgo de desarrollar complicaciones irreversibles con la edad²⁰; el Senegal presenta un menor riesgo clínico, la severidad del Benin es intermedia²¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. Planteamiento del problema

Debido a que la población elegida contiene una mezcla de genes indígenas, europeos y africanos en diferente proporción, la posibilidad de que se presente la ACF es alta en poblaciones costeras y baja en poblaciones centrales de la República Mexicana.

La importancia del estudio de la frecuencia de portadores de hemoglobina S en población mexicana, radica en conocer su incidencia ya que es posible prevenir el padecimiento de la ACF dando asesoría a los heterocigotos debido a que tienen el 25% de posibilidades de procrear un homocigoto por embarazo.

La población que se eligió no se ha estudiado con anterioridad y es posible encontrar una alta frecuencia de portadores de la mutación beta-S ya que es cercana a la costa del Golfo de México.

IV. Objetivo General

Analizar el tipo de hemoglobina por electroforesis, en cuatro poblaciones Poza Rica e Ixhuatlancillo, Veracruz; San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco de la Delegación Milpa Alta.

Identificar los haplotipos de esta mutación en tres pacientes mexicanos para contribuir a conocer mejor nuestra población.

V. Objetivos particulares

- a. Manejo de equipo para electroforesis de hemoglobinas, así como conocer las condiciones óptimas de trabajo. Y analizar las muestras de las cuatro poblaciones antes mencionadas.
- b. Comparar los resultados de la frecuencia génica del alelo S en la población de mestizos de Poza Rica, Veracruz contra tres de habla Náhuatl (Ixhuatlancillo, Veracruz, San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco, Delegación Milpa Alta).
- c. Aplicar técnicas de biología molecular (extracción de DNA, PCR, Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa) para la caracterización de los haplotipos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La importancia de la determinación de los haplotipo de estos tres pacientes, nos sirve para tener referencia del lugar de donde provienen, además de ser un indicio de la gravedad de la enfermedad.

VI. Hipótesis

Existe una alta frecuencia de portadores de hemoglobina S (variante β^s) observada por electroforesis en población mestiza de Poza Rica, Veracruz en comparación con las de habla Náhuatl de Ixhuatlancillo, Veracruz; San Pedro Atocpan y de Santa Ana Tlacotenco de la Delegación de Milpa Alta, D.F.

Los haplotipos para la mutación Beta-S son africanos.

VII. Diseño de investigación:

Transversal, comparativo.

VIII. Población

Se estudiaron cuatro grupos humanos con individuos mayores de edad (de 18 a 60 años): mestizos de Poza Rica Ver. figura 11, (Población problema) y tres de habla Náhuatl (Poblaciones control) Ixhuatlancillo Veracruz, San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco, Delegación Milpa Alta, D.F., a quienes se les tomaron consentimiento informado y sus datos generales además de una muestra de 5 ml de sangre periférica con anticoagulante EDTA.



Figura 11 Poza Rica, Veracruz²²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ixhuatlancillo Veracruz se localiza; Norte: La Perla. Sur: Nogales y Orizaba. Este: Mariano Escobedo y Orizaba. Oeste: Maltrata²³ figura 12.

Ixhuatlancillo

Figura 12 Ixhuatlancillo, Veracruz²³

Milpa Alta fue un antiguo asentamiento náhuatl. Actualmente es una de las 16 delegaciones políticas que conforman el Distrito Federal. Con una extensión de 27 828 ha, es una de las delegaciones rurales más extensas del valle de México. Los nahuas de Milpa Alta habitan en doce pueblos figura 13: Villa Milpa Alta, que es la cabecera delegacional; San Antonio Tecomitl; San Francisco Tecoxpa; San Jerónimo Miacatlán; San Agustín Ohtenco, todos éstos situados al oriente de la delegación; San Pedro Atocpan, San Pablo Oztotepec, San Bartolomé Xicomulco y San Salvador Cuauhtenco localizados al sureste y, por último, al sur se encuentran San Lorenzo Tlacoyucan, Santa Ana Tlacotenco y San Juan Tepenahuac figura 13.

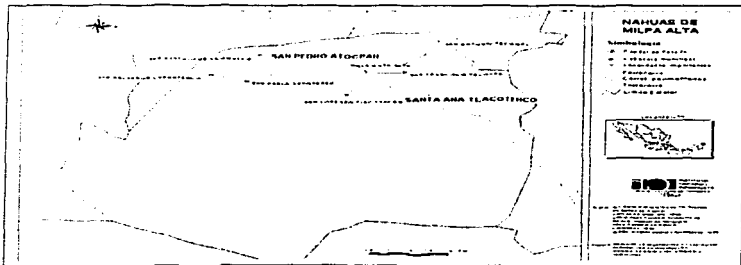


Figura 13 Mapa de Milpa Alta²⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El náhuatl que significa "hombre verdadero", es el nombre con que históricamente se conoce al grupo.

Los pueblos que registran un número mayor de hablantes de náhuatl son Santa Ana Tlacotenco, San Lorenzo Tlacoyucan y San Pablo Oztotepec.

Actualmente los milpaltenses interactúan cotidianamente con la población urbana de la ciudad de México. Para el corte del nopal se contratan indígenas provenientes de Oaxaca, Puebla, Veracruz y Estado de México²⁴.

IX. Criterios de inclusión

- ✓ Individuos adultos, aparentemente sanos, de uno y otro género, no emparentados entre sí, cuyos padres y abuelos hayan nacido en la misma población y acepten participar en el estudio.

X. Criterios de exclusión

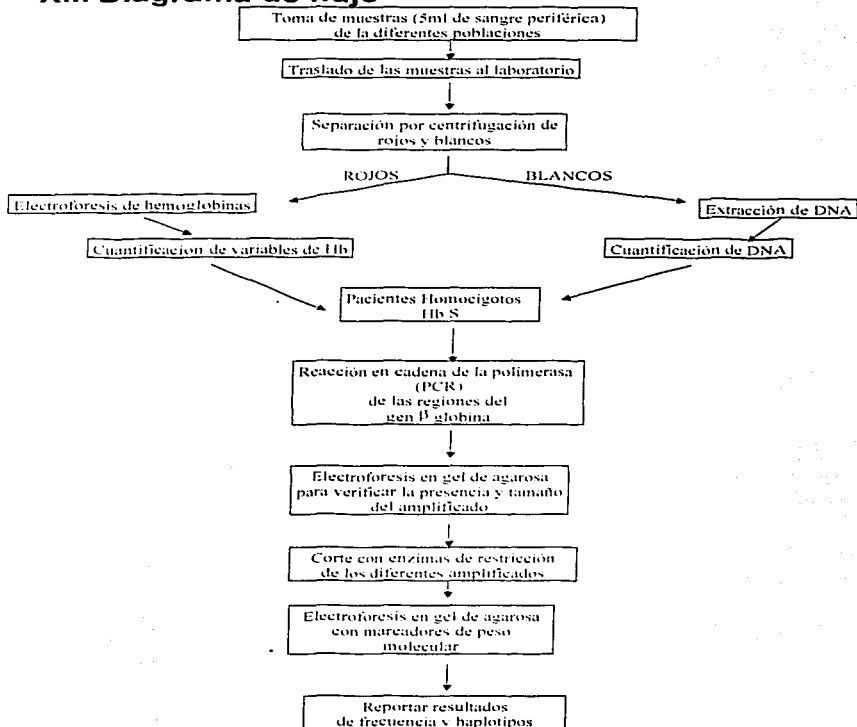
- Individuos menores de edad (menores de 18 años).
- Individuos que no acepten participar.

XI. Criterios de eliminación

- Mujeres embarazadas
- Individuos que no pertenezcan a los lugares señalados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XII. Diagrama de flujo



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XIII. Material

Recolección de muestras sanguíneas

- Cajas de polietileno para su transporte
- Tubos al vacío (Vacutainer) con EDTA disódico como anticoagulante con capacidad de 5ml.
- Ligaduras
- Torundas
- Guantes

Separación de rojos y blancos

- Pipetas Pasteur.
- Chupones para pipetas Pasteur.
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Centrífuga.
- Gradilla.
- Guantes.

Electroforesis de Hemoglobinas

- Pipetas de volumen ajustable 0.5-10 μ l y 20- 200 μ l.
- Puntas desechables para las pipetas.
- Tubos de ensayo 13x100.
- Gradilla.
- Kit Hidragel 15 Hemoglobin:
 - Geles de Agarosa.
 - Esponjas tamponadas (tris barbital pH9.0; azida sódica).
 - Colorante Negro Amido.
 - Solución hemolizante.
 - Aplicadores.
 - Papeles de filtro.
 - Solución decolorante.
 - Solución de lavado Hydrasis.
- Solución salina (NaCl 0.15M (9g/l) en agua destilada o desionizada.)

Equipo y accesorios

- Sistema "Hídrasys sebia".
- Cámara Húmeda.
- Contenedores.
- PC con "Hardware" ("escáner") "software" ("Phoresis") para la determinación semicuantitativa de las bandas del gel.

Extracción de DNA

- Pipetas Pasteur.
- Tubo plástico Eppendorf.
- Solución Hipotónica (Tris HCl 10mM pH 7.8, MgCl₂ 5mM, NaCl 10mM).
- Solución salina.
- SDS.
- Cloruro de sodio saturado.
- Etanol al 100%.
- Etanol al 70%.
- Estufa.
- Agua estéril.
- Refrigerador.
- Microcentrifuga Eppendorf modelo 5415C.
- Guantes.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Concentración DNA

- * Agua estéril.
- * Pipetas semiautomáticas de volumen variable.
- * Puntas desechables para las pipetas.
- * Espectrofotómetro ULTROSPEC 2000 DIGITAL.
- * Celdillas para poder leer la muestra.
- * Guantes.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- ♣ Pipetas de volumen ajustable: 0.5-10 μ L 5-40 μ L 20-200 μ L.
- ♣ Puntas desechables para las pipetas.
- ♣ Tubos Eppendorf.
- ♣ Microtubos para PCR.
- ♣ Campana para PCR.
- ♣ Gradilla.
- ♣ Baño de hielo.
- ♣ Buffer.
- ♣ Mg Cl₂.
- ♣ dNTP's.
- ♣ Agua estéril.
- ♣ Taq polimerasa.
- ♣ Termociclador.
- ♣ Guantes.
- ♣ Primer's Sutton²⁵:
0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12.

Electroforesis

- ≡ Cámara de electroforesis horizontal.
- ≡ Microondas.
- ≡ Matraz Erlen Meyer.
- ≡ Fuente de poder 250 volt.
- ≡ Pipeta de volumen ajustable:
0.5-10 μ l
- ≡ Papel parafilm.
- ≡ Buffer TAE (Tris acetato EDTA).
- ≡ Agarosa.
- ≡ Bromuro de etilo.
- ≡ Guantes.

Corte con enzimas de restricción

- Pipetas de volumen ajustable.
- Puntas desechables para las pipetas.
- Campana para PCR.
- Tubos Eppendorf.
- Termociclador.
- Guantes.
- Amplificado.
- Agua estéril.
- Buffer
- Enzima para cortar:
 - XmnI.
 - HdIII.
 - HclI.
 - Hfl.
 - HpaI.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

XIV. Metodología

Extracción del DNA de sangre periférica

- 1) Extraer 5ml de sangre más 50 μ l de EDTA 0.5M pH8.
- 2) Mezclar y centrifugar 20 minutos a 3 000rpm.
- 3) Retirar la capa de blancos con una pipeta Pasteur y llevar a un tubo de plástico Eppendorf de 1.5ml.
- 4) Agregar solución hipotónica (Tris HCl 10mM pH7.8, $MgCl_2$ 5mM, NaCl 10mM) a $\frac{3}{4}$ partes del volumen del tubo.
- 5) Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente; centrifugar 10 minutos a 3 500rpm.
- 6) Desechar el sobrenadante. Lavar una vez más con solución hipotónica.
- 7) Mezclar y centrifugar 10 minutos a 3 500rpm.
- 8) Desechar el sobrenadante.
- 9) Pasar a dos tubos de 1.5ml.
- 10) Resuspender en 443 μ l cada uno de NaCl 5mM dejar reposar 5 minutos.
- 11) Agregar 23 μ l de SDS al 10% a cada uno.
- 12) Agitar suavemente de 5 a 10 minutos manualmente.
- 13) Agregar 154 μ l de NaCl saturado.
- 14) Agitar y centrifugar 15 minutos a 10 000rpm.
- 15) Extraer con fenol-cloroformo ó precipitar con etanol al 100% 2.5 volúmenes.
- 16) Hacer 3 lavados con etanol al 70%.
- 17) Dejar secar en estufa por 15 minutos (para evaporar el etanol)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Electroforesis

El término electroforesis se puede definir como la separación de macromoléculas de acuerdo a su carga eléctrica, a través de un medio aplicando un campo eléctrico. La velocidad migración es función de la densidad de carga, por lo que se podrán separar unas partículas de otras con arreglo de esta propiedad. A su vez la densidad de carga de la partícula será función de una serie de parámetros que marcan las condiciones experimentales de la electroforesis: pH, fuerza iónica, gradientes de voltaje, interacciones de soporte etc.

- I. Preparar el gel de agarosa al 1%.
 - a) Pesar 0.2g de agarosa
 - b) Disolver con 20ml de TAE 1X (Tris acetato EDTA pH8).
 - c) Poner a calentar a 50°C o hasta ebullición en el microondas no dejar más tiempo pues se puede derramar o consumir.
- II. Esperar a que se enfríe (lo que soporte la mano); y agregar 1µl de bromuro de etilo 10µg/ µl, agitar.
- III. Enjuagar con agua corriente la placa para electroforesis (dejarla húmeda), y colocarla en la cámara. Con las ligas en posición vertical, verificar que las ligas estén bien colocadas.
- IV. Verter el gel en la placa para electroforesis y colocar el peine. Esperar a que solidifique.
- V. Ya solidificado el gel sacar el peine y la placa colocarla en posición horizontal. Llenar la cámara con el buffer TAE 1 X.
- VI. En papel parafin colocar una gota de colorante por muestra y mezclar con cada uno de ellos respectivamente.
- VII. Colocar la muestra homogeneizada con el colorante en el pocillo.
- VIII. Conectar la cámara y correr a 110mAmpers. Por 30 minutos.

Nota: Verificar hacia que dirección corre la muestra para que no se salga del gel.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Técnica para leer concentración de DNA

Se lee la concentración de una muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm que pertenece al espectro de ultra violeta (UV) la cual abarca de 100 a 400nm.

El espectrofotómetro que utilizamos es el "ULTROSPEC 2000" digital.

- ☐ Se enciende el equipo.
- ☐ Permitir que pase la etapa de autocalibración.
- ☐ Presionar la tecla "*fuction*"
- ☐ Con las flechas se selecciona la región en la que se lleva a cabo la lectura para así encender o apagar la lámpara con la tecla "*enter*".
- ☐ La tecla "*Stop*" sirve para salir. Se deja calentar por 30 minutos.
- ☐ Al cabo de este tiempo se presiona la tecla *modo* se selecciona *absorbancia* con las flechas horizontales, posteriormente *ácidos nucleicos* y con las flechas verticales DNA se presiona la tecla "*enter*".
- ☐ En la pantalla aparecerá la palabra "*insert reference*" lo que indica que podemos poner el blanco. Presionamos la tecla "*enter*".
- ☐ Aparecerá la palabra "*Bakgrown*" presionamos "*enter*".
- ☐ Aparecerá "*Set reference*" presionar la tecla "*set reference*".
- ☐ Aparecerá en pantalla "*Settin reference...*" en unos instantes se quitará
- ☐ Ya ajustado el blanco podemos comenzar a leer nuestras muestras.
- ☐ El volumen total de la celdilla es de 100 μ l.
- ☐ El blanco que utilizamos es agua; y colocamos 98 μ l de esta para leer el blanco.
- ☐ Posteriormente colocamos 2 μ l de la muestra y homogeizamos dentro de la celdilla.
- ☐ Presionamos la tecla "*Run*" y comienza a leer.
- ☐ Nos reporta lecturas a 260nm (DNA) 280nm (PROTEÍNAS) y la relación entre estas dos 260/280 Presionando la tecla "*↵*".
- ☐ Registrar las lecturas.
- ☐ Al terminar se presiona la tecla "*Stop*" y posteriormente "*Fuction*" para apagar la lámpara de UV y se apaga el equipo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ¶ El cálculo de la concentración se realiza de la siguiente manera: 1 densidad óptica es a 50ng/ μ l nuestra lectura a 260nm es a X. Este resultado se multiplica a su vez por el factor de dilución que en este caso es 1:50.
- ¶ Al terminar de utilizar las celdillas enjuagar con etanol y dejar escurrir en un trozo de papel, para posteriormente guardarlas en su caja.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica ampliamente usada para la amplificación específica de una secuencia de DNA. Una simple reacción de PCR consiste de un set de Primers que cortan una secuencia de DNA, una DNA polimerasa termoestable, y cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) en una solución buffer que estabiliza la reacción.

La pureza y la concentración de los compuestos tiene un profundo efecto en el transcurso de la reacción.

- A. Limpiar con etanol la campana (PCR CHAMBER).
- B. Colocar dentro las puntas (amarillas y blancas) pipetas y tubos. Todos destapados.
- C. Encender la lámpara de UV por 10 minutos.
- D. Al cabo de este tiempo, limpiar con etanol una ampollita de agua para inyectables y destaparla.
- E. Reactivos para una reacción.

Buffer 10X	2.5µl
MgCl ₂ 50mM	0.8µl
dNTP's 2.5mM	2.5µl
Primer (*) 20pM	1.25µl
Primer (**) 20pM	1.25µl
H ₂ O	15.45µl
Taq polimerasa	0.25µl
DNA 200ng	≈1.0µl
Volumen total	25µl

*, **. Como se realizan amplificados de diferentes regiones del gen β globina se utilizarán diferentes primers que están listados en la tabla siguiente²⁵:

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Primers	Sutton	Temperatura	Pb	Enzima corte	Fragmentos
0-1	5' γ	52°C	655	Xmn I	205/450
2-3	5' γ	54°C	782	Hind III	436/346
3-4	5' γ	55.9°C	769	Hind III	406/360
5-6	5' β	49°C	701	Hinc II	340/361
7-8	3' β	47°C	614	Hinc II	295/297
9-10	5' β	48°C	384	Hinf I	142/241
11-12	3' β	49°C	628	Hpa I	161/467

F Colocar primero el agua, posteriormente el buffer, $MgCl_2$, dNTP's, primer * y **, Taq polimerasa mezclar y por último DNA.

NOTA Todos los reactivos deben ponerse en un baño de hielo, excepto la Taq polimerasa que se toma directamente del congelador (-20°C). Para una número mayor de reacciones multiplicar por el número que se tenga contempladas de estas y considerar un blanco.

G Marcar los tubos y colocarlos dentro del termociclador bajo las siguientes condiciones:

32 ciclos

94°C/5minutos seguido de 94°C/40segundos; ***°C/30segundos;

70°C/45segundos y un ciclo final de 72°C/7minutos 4°C/∞

*** En este punto se aplicará la temperatura que se encuentra en la tabla donde indica la temperatura específica para cada una de las amplificaciones de las diferentes regiones del gen β globina.

Al terminar la amplificación sacar los tubos y ponerlos en hielo si es que se va a correr la electroforesis, si no guardar los tubos a -20°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Corte con enzimas de restricción

- A. Limpiar con etanol la campana (PCR CHAMBER).
- B. Colocar dentro las puntas (amarillas y blancas) pipetas y tubos. Todos destapados.
- C. Encender la lámpara de UV por 10 minutos.
- D. Al cabo de este tiempo, limpiar con etanol una ampollita de agua para inyectables y destaparla.
- E. Reactivos para una reacción.

Agua	6 μ l
Buffer	1 μ l
Enzima para cortar *	1 μ l
Amplificado	2 μ l

La enzima a utilizar será la correspondiente a la fracción amplificada, que se encuentra en la siguiente tabla²⁹:

Enzima	Sitio	Temperatura	Pb	Enzima corta	Fragmentos
0-1	5'	52°C	655	Xmn I	205/450
2-3	5'	54°C	782	Hind III	436/346
3-4	5'	55.9°C	769	Hind III	406/360
5-6	5'	49°C	701	Hinc II	340/361
7-8	3'	47°C	614	Hinc II	295/297
9-10	5'	48°C	384	Hinf I	142/241
11-12	3'	49°C	628	Hpa I	161/467

- F. Colocar primero el agua, posteriormente el buffer, la enzima para cortar. Mezclar y por último amplificado.

NOTA Todos los reactivos deben ponerse en un baño de hielo, excepto la Taq polimerasa que se toma directamente del refrigerador. Para una número mayor de reacciones multiplicar por el número que se tenga contempladas de estas y considerar un blanco.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

- G. Marcar los tubos y colocarlos dentro del termociclador bajo las siguientes condiciones:
37°C por 2 horas.
- H. Al terminar correr electroforesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Extracción de DNA del gel de agarosa

Esta técnica nos permite obtener las bandas de DNA que nos son de interés además de poder purificarlo.

- ♥ Colocar el gel en la cámara de UV.
- ♥ Encender el UV y localizar las bandas de interés (no exceder pues el UV muta el DNA).
- ♥ Cortar las bandas con una navaja estéril y colocarlas en un tubo perforado con fibra de vidrio esterilizada.
- ♥ Este tubo colocarlo en un Eppendorf de 1.5ml y meter a congelador de -70°C.
- ♥ Cortar las tapas(no tirarlas pues se utilizaran después).
- ♥ Centrifugar a 10 000rpm a 4°C por 10 minutos.
- ♥ Medir el volumen del sobrenadante; agregar la mitad del volumen de acetato de amonio 7.5M ó 1/3 si el acetato de amonio es 3M.
- ♥ Agregar 2 volúmenes de etanol al 100%. Agitar 5 minutos y centrifugar 10 minutos a 10 000rpm a 4°C.
- ♥ Tirar el sobrenadante y el precipitado lavarlo con etanol al 70% (3 veces).
- ♥ Dejar secar el precipitado a 50°C y resuspender en 12µl de agua.
- ♥ Tomar 1µl para electroforesis y otro para cuantificar la concentración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Electroforesis de Hemoglobinas

- Ⓜ Muestras de sangre fresca con anticoagulante, son recomendadas para este análisis. Anticoagulantes comunes como EDTA o citrato son aceptables. Las muestras pueden ser almacenadas de 2 a 8°C por 5 días.
- Ⓜ Centrifugar la muestra de sangre a 5 000rpm por 5 minutos.
- Ⓜ Desechar el plasma.
- Ⓜ Lavar los glóbulos rojos 2 veces con 10 volúmenes de solución salina
- Ⓜ Hemolizar 5 μ l de glóbulos rojos con 130 μ l de solución hemolizante.
- Ⓜ Vortexear por 10 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Ⓜ Centrifugar 10 minutos a 5 000rpm.
- Ⓜ Encender el HYDRASYS LC **Sebia** y seleccionar el programa de migración correspondiente.
- Ⓜ Sacar la cámara húmeda del refrigerador.
- Ⓜ Sacar uno de los aplicadores o los que se necesiten de la caja.
- Ⓜ Ponerlo en una superficie plana, con los números de los pocillos hacia arriba.
- Ⓜ Aplicar 5 μ l del homogeneizado (muestra más solución hemolizante) en cada pocillo. La carga de cada aplicador debe realizarse en menos de 2 minutos.
- Ⓜ Inmediatamente después de última aplicación de muestra, proceda como sigue:
 - * Abra la cámara húmeda.
 - * Tomar el aplicador por el marco protector de los dientes.
 - * Poner en las ranuras, **CON LOS DIENTES HACIA ARRIBA**.
 - * Cerrar la cámara húmeda.
 - * Esperar durante un mínimo de 5 minutos.
- Ⓜ Proceder del mismo modo con el segundo aplicador al analizar 30 muestras.
- Ⓜ Abrir la tapa del módulo de migración y eleve el soporte de los electrodos y el aplicador.
- Ⓜ Sacar las esponjas con solución amortiguadora de su envoltorio, tomarlas por los extremos de plástico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ⑩ Ponga la esponja con solución amortiguadora en el soporte de los electrodos engarzando los extremos agujerados en los polos del soporte. El lado de la esponja tamponada en el que están sujetos los extremos de plástico entre en contacto con el electrodo.
 - ⑪ Sacar el gel de su envoltorio.
 - ⑫ Absorber el exceso de líquido de la superficie de líquido de la superficie del gel con papel filtro fino. No presione el gel, y saque el papel inmediatamente.
 - ⑬ Aplicar 200µl de agua destilada o desionizada en el tercio inferior del marco impreso en la placa del módulo de migración.
 - ⑭ Colocar el lado inferior del gel contra el tope situado debajo del marco impreso.
 - ⑮ Doblar el gel hasta que el reverso del plástico contacte con la gota de agua que está debajo. Haga descender el gel sobre la placa asegurándose de que no se formen burbujas de aire, distribuyendo el agua por debajo de todo el gel, asegurándose de que el gel esté alineado con el marco impreso.
 - ⑯ Bajar ambos soportes. **NO FORCE HACIA ABAJO.**
 - ⑰ Abrir la cámara húmeda.
 - ⑱ Tomar el aplicador por el marco protector de los dientes. Rompa el marco protector con cuidado.
 - ⑲ Colocar el aplicador en la posición # 4. **IMPORTANTE:** Los números impresos en el aplicador de muestra deben estar siempre dirigidos hacia el operario.
 - ⑳ Cerrar la tapa del módulo de migración del HYDRASYS LC.
 - ㉑ Iniciar el procedimiento de migración inmediatamente presionando la tecla verde > del lado izquierdo del teclado.
 - ㉒ La muestra migra bajo las siguientes condiciones: 340V constantes 25°C.
- ∅ **Coloración decoloración**
- ∅ Cuando el gel este listo para la decoloración, sacarlo del módulo de migración y ponerlo en el soporte del gel como sigue:
 - ∅ Abrir el soporte del gel.
 - ∅ Ponerlo en la superficie plana.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Ø Colocar el gel en las ranuras de las varillas laterales, con el lado de la agarosa hacia el operario.
- Ø Cerrar las varillas, asegurándose de que el gel esté colocado correctamente.
- Ø Poner el soporte del gel en el compartimiento de coloración y seleccionar el programa Hb total .
- Ø Presionar la tecla verde > para iniciar la coloración.
- Ø Al terminar sacar la placa ya teñida
- Ø Colocarla en el escáner
- Ø Leer.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XV. Resultados

Resultados de las frecuencias de hemoglobinas

Con el propósito de ejemplificar los resultados obtenidos en las electroforesis de hemoglobinas en medio alcalino, la figura 14 nos muestra el corrimiento de las hemoglobinas AA, AF, SS, y AS obtenidos en el estudio.

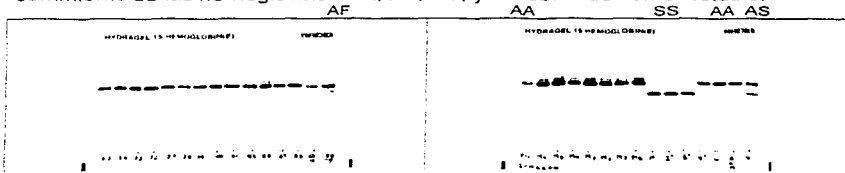


Figura 14 Dos ejemplos de las electroforesis realizadas a las cuatro poblaciones en estudio, donde se observa corrimiento de Hb AA, AS, AF y SS.

El porcentaje de las hemoglobinas (AA; SA y SS) encontradas en cada una de las poblaciones estudiadas se expone en la tabla 4 en la cual observamos que el porcentaje más alto de hemoglobina SA se encontró en la población de Poza Rica Veracruz. Siendo ausente en las poblaciones de San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco y casi nulo en Ixhuatlancillo Veracruz.

Tabla 4 Porcentaje de hemoglobinas encontradas en las poblaciones.

Población	n	% Hb AA	% Hb SS	% Hb SA
Poza Rica Veracruz	89	185.39	-	14.61
Ixhuatlancillo Veracruz	46	97.82	-	2.17
San Pedro Atocpan	74	100	-	-
Santa Ana Tlacotenco	42	100	-	-

n = Numero de muestras estudiadas

La frecuencia de los alelos A y S en las poblaciones estudiadas se pueden ver en la tabla 5. La cual nos muestra que la frecuencia del alelo S es alta en la población de Poza Rica Veracruz en comparación con la de las demás poblaciones estudiadas.

Tabla 5 Frecuencia de alelos A y S en las poblaciones estudiadas

Poblaciones	n	S	A	Total
Poza Rica	89	0.0730	0.9269	0.9999
San Pedro Atocpan	72	—	1.0	1.0
Santa Ana Tlacotenco	42	—	1.0	1.0
Ixhuatlancillo	46	0.0109	0.9891	0.99997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los límites del porcentaje de Hb A1 A2 F y S de las cuatro poblaciones se expone en la siguiente tabla:

Tabla 6 Límites superior e inferior del % de hemoglobina

Hemoglobinas	Poza Rica Veracruz	Ixhuatlancillo Veracruz	San Pedro Atocpan	Santa Ana Huasteco
Hb A1 Superior	100%	100%	100%	99.1%
Hb A1 Inferior	0.9%	89.3%	97.1%	96.7%
Hb A2 Superior	2.8%	4.2%	2.9%	3.3%
Hb A2 Inferior	0	0	0	0.9%
Hb F Superior	1.9%	1.5%	1.7%	3.4%
Hb F Inferior	0	0	0	0
Hb S Superior	99.1%	10.7%		
Hb S Inferior	0	0		

El equilibrio Hardy-Weinberg de cada una de nuestras poblaciones se evaluó en las tablas 7-10. Mostrando que las cuatro poblaciones se encuentran dentro del equilibrio.

Tabla 7 Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de Poza Rica Veracruz

	No	%	%	No	d	d ²	χ^2
	Observado	Esperado	Esperado				
A	176	188.39	82.17	1315	12.82	18.23	0.1125
AS	13	14.61	16.93	18.06	2.06	4.24	0.2815
S	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	191	-	-	-	-	-	0.3930

Frecuencia Génica: A = 0.9955 S = 0.0934 $\chi^2 = 0.39 =$ No Significativo

Tabla 8 Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de Ixhuatlancillo Veracruz

	No	%	%	No	d	d ²	χ^2
	Observado	Esperado	Esperado				
A	48	97.83	97.83	48	-	-	-
AS	1	2.17	2.16	1	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	46	-	-	-	-	-	-

Frecuencia Génica: A = 0.9891 S = 0.0109 $\chi^2 = 0 =$ No Significativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9 Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de San Pedro Atocpan

	No	%	%	No	d	d'	χ^2
		Observado	Esperado				
A	72	100.00	100.00	72	-	-	-
AS	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	72						

Frecuencia Genica: A= 1.0000 S=0.0000 $\chi^2 = 0 =$ No Significativo

Tabla 10 Equilibrio Hardy-Weinberg de la población de Santa Ana Tlacotenco

	No	%	%	No	d	d'	χ^2
		Observado	Esperado				
A	42	100.00	100.00	42	-	-	-
AS	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	42						

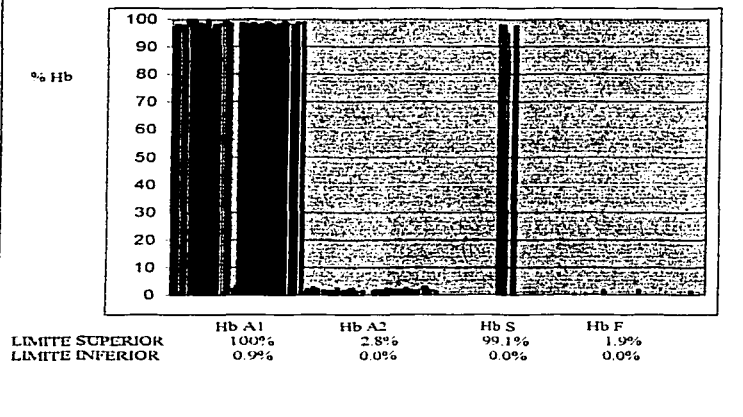
Frecuencia Genica: A= 1.0000 S=0.0000 $\chi^2 = 0 =$ No Significativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los siguientes gráficos muestran la frecuencia y el porcentaje de las diferentes hemoglobinas (A, S y F) encontradas en cada una de las poblaciones estudiadas.

El gráfico 1 muestra el porcentaje y frecuencia de las diferentes hemoglobinas en la población de mestizos de Poza Rica Veracruz donde observamos una mayor frecuencia de Hb A1 con una ligera baja. Un porcentaje normal de Hb A2 en la mayoría de la población y se presenta también algunas barras altas las cuales indican los tres pacientes homocigotos para la Hb S y finalmente algunos casos de Hb F que están dentro de lo normal.

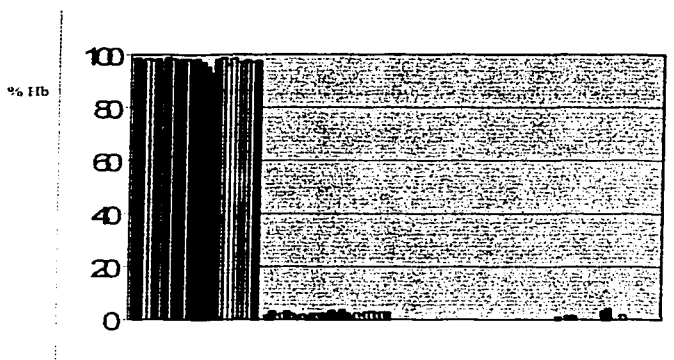
GRAFICO 1. PORCENTAJE Y FRECUENCIA DE LAS DISTINTAS HEMOGLOBINAS EN UNA POBLACIÓN DE MESTIZOS DE POZA RICA, VERACRUZ.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gráfico 2 muestra el porcentaje y frecuencia de las diferentes hemoglobinas en la población de habla náhuatl de San Pedro Atocpan donde observamos una mayor frecuencia de Hb A1. Un porcentaje normal de Hb A2 y finalmente algunos casos de Hb F que están dentro de lo normal. La Hb S se encuentra ausente dentro de esta población.

GRAFICO 2 PORCENTAJE Y FRECUENCIA DE LAS DISTINTAS HEMOGLOBINAS EN UNA POBLACION DE HABLA NAHUATL DE SAN PEDRO ATOCPAN

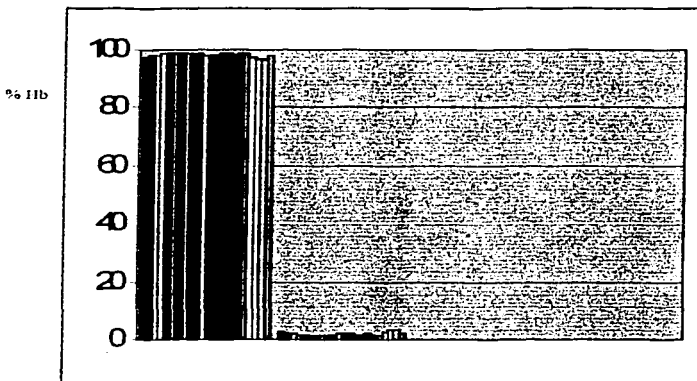


LIMITE SUPERIOR	Hb A1	Hb A2	Hb S	Hb F
LIMITE INFERIOR	100.0%	2.9%	0.0%	1.7%
	97.1%	0.0%	0.0%	0.0%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gráfico 3 muestra el porcentaje y frecuencia de las diferentes hemoglobinas en la población de habla náhuatl de Santa Ana Tlacotenco donde observamos una mayor frecuencia de Hb A1. Un porcentaje normal de Hb A2. La Hb S se encuentra ausente dentro de esta población, lo mismo que la Hb fetal, lo cual es normal

GRAFICO 3. PORCENTAJE Y FRECUENCIA DE LAS DISTINTAS HEMOGLOBINAS EN UNA POBLACIÓN DE HABLA NAHUATL DE SANTA ANA TLACOTENCO



LIMITE SUPERIOR
LIMITE INFERIOR

Hb A1
99.1%
96.7%

Hb A2
3.3%
0.9%

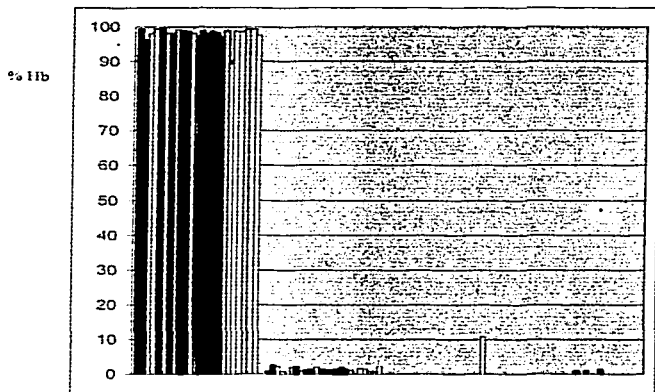
Hb S
0.0%
0.0%

Hb F
3.4%
0.0%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gráfico 4 muestra el porcentaje y frecuencia de las diferentes hemoglobinas en la población de habla náhuatl de Ixhuatlancillo Veracruz donde observamos una mayor frecuencia de Hb A1. Un porcentaje normal de Hb A2 y finalmente algunos casos de Hb F que están dentro de lo normal. La Hb S se encuentra en un bajo porcentaje o es casi nula dentro de esta población.

GRAFICO 4. PORCENTAJE Y FRECUENCIA DE LAS DISTINTAS HEMOGLOBINAS EN UNA POBLACIÓN DE HABLA NAHUATL DE IXHUATLANCILLO, VERACRUZ



LIMITE SUPERIOR
LIMITE INFERIOR

Hb A1
100.0%
89.3%

Hb A2
4.2%
0.0%

Hb S
10.7%
0.0%

Hb F
1.5%
0.0%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados de la caracterización de haplotipos de los tres pacientes homocigotos de Hb S

Las siguientes figuras ilustran las electroforesis de los amplificados de las diferentes regiones de la familia beta globina junto con los cortes con las diferentes enzimas de restricción

Los productos de los amplificados de las regiones 1,2,5 de la familia β globina se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

- El marcador de peso molecular se encuentra en ambos extremos.
- Los pacientes M y F no hubo corte con la enzima Xmn I en la región 1.
- El paciente C si presenta corte con la enzima Xmn I en la región 1.
- Los pacientes M, F y C presentan corte con la enzima Hind III en la región 2.
- Los pacientes M y F no hay corte con la enzima Hinc II en la región 5.
- El paciente C presenta corte con la enzima Hinc II en la región 5.

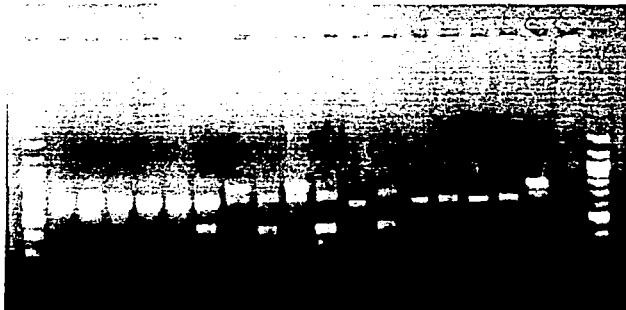


FIGURA 15: Electroforesis de los amplificados de las regiones 1,2 y 5 de la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β S.

Mar= marcador de peso molecular; M= paciente 1, F= paciente 2; C= paciente 3.

C=cortado S/C= sin cortar

Enzimas utilizadas: 1= Xmn I; 2=Hind III; 5= Hinc II.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los productos de los amplificadores de la región 4 de la familia β globina se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

- Los pacientes M y F no hay corte con la enzima Hinc II en la región 4.
- El paciente C si hay corte con la enzima Hinc II en la región 4.

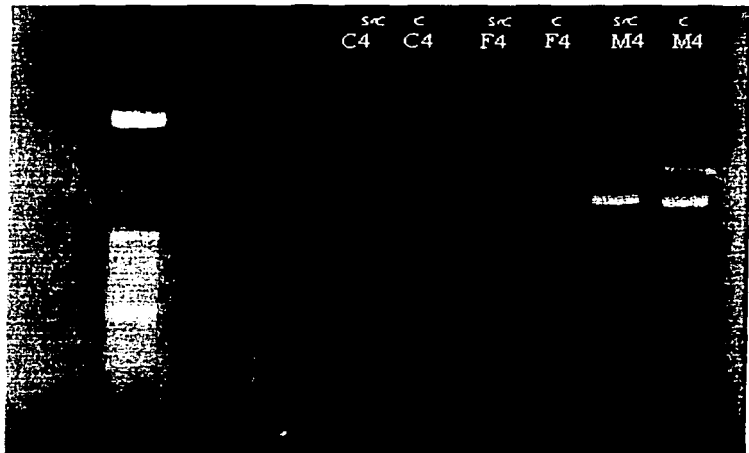


FIGURA 16: Electroforesis de los amplificadores de la región 4 de la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β^0 .

M= paciente 1. F= paciente 2; C= paciente 3; C=cortado, S/C= sin cortar.

Enzima utilizada: Hinc II

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los productos de los amplificadores de las regiones 6 y 7 de la familia β globina se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

- Los C y F no hay corte con la enzima Hinf I en la región 6.
- El paciente M si hay corte con la enzima Hinf I en la región 6.
- Los pacientes M, F y C presentan corte con la enzima Hpa I en la región 7.

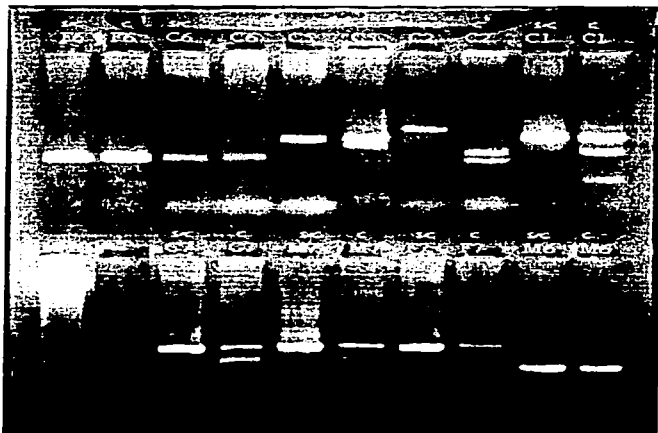


FIGURA 17: Electroforesis de los amplificadores de las regiones 6, 7, y repetición de C5, C2 y C1 la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β^S .
 Mar= marcador de peso molecular; M= paciente 1, F= paciente 2; C= paciente 3;
 C=cortado; S/C= sin cortar.
 Enzimas utilizadas: 6=Hinf I y 7= Hpa I

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Los productos de los amplificadores de la región 3 de la familia β globina se analizaron por electroforesis en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

- Los pacientes M, F y C No hay corte con la enzima Hind III en la región 3

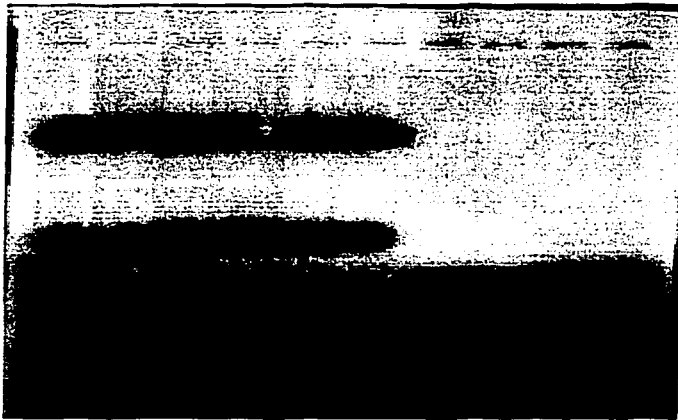


FIGURA 18: Electroforesis de los amplificadores de la región 3 de la familia β globina en tres homocigotos para la mutación β^S

Mar= marcador de peso molecular; M= paciente 1; F= paciente 2; C= paciente 3;

C=cortado, S/C= sin cortar.

Enzima empleada: Hind III

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto a la caracterización de los haplotipos las electroforesis de los cortes con las enzimas nos arrojaron los siguientes resultados:

Tabla 11 Resultados de cortes con enzimas de restricción

	Sutton	1	2	3	4	5	6	7	Haplotipos
	Enzimas	XmaI	HindIII	HindIII	HincII	HincII	HinfI	HpaI	
Paciente	1 ^a	-	+	-	-	-	+	+	Bantú
Paciente	2 ^a	-	+	-	-	-	-	+	Bantú
Paciente	3 ^a	+	+	-	+	+	-	+	Bantú/ Arabia- Saudita

Lo que nos indica que el paciente 1 presenta el haplotipo Bantú al igual que el paciente 2. Y el paciente 3 es heterocigoto para el haplotipo Bantú / Arabia Saudita.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XVI. Discusión de Resultados

Del total de individuos estudiados en Poza Rica Veracruz, solo se tomaron en cuenta los que no tienen parentesco para el calculo del equilibrio Hardy-Weinberg ya que esto afecta el equilibrio dirigiéndolo en una dirección. Como se muestra en la tabla 7 a 10 la población estudiada se encuentra en equilibrio génico. En la tabla 5 se observa que la frecuencia de individuos de Poza Rica presentó el mayor índice de portadores de Hb S. Ésta se comparó con las tres poblaciones control de habla náhuatl donde sólo la de Ixhuatlancillo, Veracruz mostró una frecuencia del 2% contra el 15% de Poza Rica, Veracruz y el 0% de los dos restantes. Estos datos concuerdan con lo informado por otros investigadores^{2, 4, 26, 27 y 28}.

Algunos investigadores que muestrearon otras poblaciones de regiones en las costas occidental y oriental de la república, observaron una frecuencia variable de heterocigotos para Hb S. De aquí se destaca que en algunas poblaciones como Tamiahua, en la costa del Golfo, y Cuajinicuilapa y San Marcos en el Pacifico, presentan una elevada frecuencia de heterocigotos de Hb S, semejante a la encontrada en Poza Rica, Veracruz.

Esto se explica por la migración de africanos ocurrida durante la colonia a nuestro país. Se calcula que en 1640 fueron traídos a México 150,000 esclavos africanos, cuya mayor proporción es de origen Bantú y que su migración tiene lugar principalmente por la costa oriental de México y en menor proporción por la occidental^{4 y 25}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 12. Frecuencia de Hb S en las costas del Golfo y del Pacífico de México

Comunidades de la costa del Golfo					
	Sujetos	AS%	SS%	Otras	
1.	Tamiahua Veracruz**	109	11.0	0	1(AC)
2.	Tamiahua Veracruz**	200	6	0	30 Talasemia β
3.	Saladero Veracruz	119	4.2	0	0
4.	Veracruz	147	1.4	0	1(A+"LENTA")
5.	Paraiso Tabasco	160	6.9	0	1(A+"RAPIDA")
6.	El Carmen Campeche	109	2.8	0	0
7.	Hueyapam de Ocampo	200	9.0	0	0
8.	Cosamaloapan				
9.	Tlacotalpan	200	3.5	0.5	1(TAL BETA)
10.	Acutla	200	2.5	0	0
11.	Chacaltianguis	200	1.5	0	0
12.	Curtlahuac	200	2.0	0	0
		400	0.5	0	2(TALAS BETA) 1(AC)
Comunidades de la Costa del Pacífico					
1.	Pochutla	749	0.4	0	
2.	S. Pedro Mixtepec	335	2.9	0	
3.	Cuajmuculapa				
4.	Ometepec	592	11.1	0	
5.	Nochistlahuac	408	4.1	0	
6.	San Marcos	41	0	0	
7.	Acapulco	143	11.2	0	
8.	La Sabana	119	10.1	0	
		200	2.5	0	5 (PIIIF) 1 (S + PIIIF)

**Tomada de [illegible]

Por otra parte los resultados de las tres poblaciones de habla náhuatl coinciden también con las tablas donde observamos que la hemoglobina S está prácticamente ausente en indígenas.

El equilibrio Hardy-Weiberg nos plantea que independientemente de que tan raro sea el homocigoto para un gen, la proporción de heterocigotos es sorprendentemente elevada y que la frecuencia de los genes permanece inmutable a través del tiempo⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 13. Frecuencia de Hb S en poblaciones Indígenas de México

Grupo	Subgrupo	Sujetos	AS	Otras
Macro-maya	Maya	333	0	0
	Maya S	413	1	0 TAL BETA
	Chol	165	0	1ª - CHIAPAS
	Totonaco	104	0	0
	Tzeltal	57	0	0
	Chontal	101	2	0
	Tzotzil	63	0	0
	Tzeltal-tzotzil	163	0	0
	Istateco	312	0	0
	Lacandon	89	0	0
	Mixe	63	0	0
Zoque	31	0	0	
Macro-mixteco	Chimanteco	70	0	0
	Zapoteco	127	0	0
	Mazateco	261	0	1ª - MEXICO
	Mixteco	154	0	0
Macro-nahua	Popoloco	17	0	0
	Nahua	752	0	2ª - MEXICO
	Yaqui	96	0	0
	Tarahuama	99	0	0
Tarasco	Cora	101	0	0
	Tarasco	133	0	0

Con respecto a los haplotipos, 5 de los 6 cromosomas encontrados fueron Bantú y uno Arabia-Saudita, que está de acuerdo a lo informado^{26y 27}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XVII. CONCLUSIÓN

1. Se consiguió el manejo del equipo de electroforesis de hemoglobinas bajo condiciones óptimas y se analizaron las muestras de Poza Rica, Veracruz; Ixhuatlancillo, Veracruz; San Pedro y Santa Ana Tlacotenco de la delegación Milpa Alta, D.F.
2. La frecuencia de la hemoglobina S (frecuencia del alelo S) mutación β^s fue de 0.0730, 0.0000 y de 0.0109 en población mestiza de Poza Rica, San Pedro Atocpan, Santa Ana Tlacotenco e Ixhuatlancillo respectivamente.
3. Se compararon los resultados de las poblaciones estudiadas, encontrando mayor frecuencia en mestizos con respecto a los de habla náhuatl. Lo que cumple con la hipótesis.
4. Al aplicar técnicas de biología molecular (extracción de DNA, PCR, digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa) se logró la caracterización de los haplotipos de los tres pacientes mexicanos con anemia de las células falciformes.
5. Los haplotipos de la mutación β^s son africanos: dos homocigotos del tipo Bantú y un heterocigoto Bantú/ Arabia-Saudita que también es Africano.

Este trabajo ayuda a la caracterización de la población mexicana.

Se recomienda estudiar un número mayor de individuos, además de algunos otros poblados del estado de Veracruz para así poder comparar y tener un estudio más completo de Veracruz con respecto a la anemia de las células falciformes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XVIII. Bibliografía

1. Malcora, J. Et al.. Hemoglobinopatias y Talasemias. BSCP Can Ped; 2001; 25 no. 2.
2. Ruiz Reyes G. Hemoglobinopatias y talasemias. In: Ruiz Arguelles GJ, editor. Fundamentos de Hematología. México: Editorial Panamericana; 1994.
3. Bunn HF, Forget B. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia: WB Saunders. 1986.
4. Lisker R. Estructura genética de la población mexicana. Aspectos médicos y antropológicos. México. Salvat. 1981.
5. Rochette J. et al. Disorders of hemoglobin Structure and Synthesis. In Jameson J, Larry, editor. Principles of Molecular Medicine. USA: Editorial Humana Press. 1998.
6. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM™). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 141900: 6-26-98. WWW URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
7. Lorey FW, Arnopp J and Cunningham G. Distribution of hemoglobinopathy variants by ethnicity in a multiethnic state. Genet Epidemiol 1996; 13:501-512.
8. Sickle Cell Disease Guideline Panel. Sickle cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in newborns and infants. Clinical Practice Guideline No. 6. AHCPR Pub. No. 93-0562. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. April 1993.
9. Bunn H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Eng J Med. 1997; 337: 762-769.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. Colombo B., Svarch E., Martínez G. *Genética y clínica de las hemoglobinas humanas*. La Habana. Ed Pueblo y Educación, 1994.
11. Bailey K., Morris J.S., Thomas P et al. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1992; 67:517-520.
12. www.tusalud.com.mx/121502.htm
13. Aluoch JR. Higher resistance to Plasmodium falciparum infection in patients with homozygous sickle cell disease in western Kenya. *Trop Med Int Health*. 1997; 2: 568-571.
14. Powars, D, et al. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 1993; 147:1197-1202.
15. Oner C, Dimovski AJ, Olivieri NF, Schiliro G, Codrington JF, Fattoum S, Adekile AD, Oner R, Yuregir, GT, Altay C, et al.. Beta S haplotypes in various world populations. *Hum Genetics* 1992; 89:99-104.
16. Atlas Mundial Microsoft encarta 2000.
17. Adekile AD, Kitundu MN, Gu LH, Lanclos KD, Adeodu OO, Huisman TH.. Haplotypes in SS patients from Nigeria; characterization of one atypical beta S haplotype no. 19 (Benin) associated with elevated HB F and high G gamma levels. *Am Hematol* 1992; 65:41-45.
18. Carlson J, Nash GB, Gabutti V, al-Yaman F, Wahlgren M.. Natural protection against severe Plasmodium falciparum malaria due to impaired rosette formation. *Blood* 1994; 84:3909-3814.
19. Powars, D, et. al. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. *Am J Ped Hematology-Oncology* 1994;16:55-61.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

20. Hattori Y, Kutlar F, Kutlar A, McKie, VC, Huisman THJ.. Haplotypes of β^S chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. Hemoglobin 1989; 10: 623-642.
21. Nagel R., Fabry M., Pagnier J. Hematological and genetic markers in sickle cell disease. Sem. Hematol. 1991; 28: 180-201.
22. Powars D.R. Sickle cell anemia: β S-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. Sem. Hematol. 1991; 28: 202-208
23. www.hoteles.com.mx/veracruz/_derived/default.asp_txt_veracruz.gif
24. www.ixhuatlancillo.gob.mx
25. Ramírez Contreras A. Pueblos Indígenas De México. Serie De Monografías. Instituto Nacional Indigenista México 2002.
26. Sutton M, Bouhassira EE, Angel NL: "Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the Determination of β -like globin gene cluster haplotypes. Am. J. Hematol. 1989; 32: 66-69.
27. Cabannes R, Sendrail A, Boulox C, Carles-Trochain E. Study of hemoglobins in a population of Yucatan. Comparison with other Mexican groups. Acta Haematol 1971; 43:369-74.
28. Peñaloza R, García-Carmona A, Alvarez C, Zavala C, Salamanca F: Frequency of haplotypes in beta globin gene cluster in a selected sample of mexican population. Am J Hum Biol 1995; 7: 45-49.
29. Peñaloza R. y Lisker R: Marcadores Genéticos Importancia Antropológica y Biológica. E. Genética Clínica Editores J J Guizar-Vázquez Ed Manual Moderno México 2001.
30. Ruiz Reyes G. Hemoglobinas anormales y talasemias en la república mexicana. Rev Invest Clin Mex 1998; 50:163-170.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

31. Ruíz Argüelles G J, et al 2001. Heterozygous β -Thalassemia: Not Infrequent in Mexico. Archives of Medical Reserach 2001; 32:293-295.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN