

03021

3

24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS



**ANALISIS MOLECULAR DEL
SISTEMA ABO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

LAURA ESPINOSA ASUAR

DIRECTOR DE TESIS:

DR ALEJANDRO GARCIA CARRANCA

MEXICO D.F.
**TESIS CON
FALLA DE CRISIS**

1996



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.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESUMEN

En base a un análisis lógico-matemático de las ecuaciones para el sistema ABO, planteadas por Felix Bernstein en 1924, un grupo de la Facultad de Filosofía y Letras (Padilla *et al* 1996) desarrolló un conjunto de fórmulas matemáticas e introdujo una nueva variable, "s", asociada a la frecuencia del gameto AB, compatible con la existencia de dos genes ligados para este sistema. Al utilizar estas nuevas fórmulas con datos de poblaciones reales, se encontró que la sumatoria de las frecuencias cierra a la unidad, a diferencia de lo obtenido al usar las ecuaciones de Bernstein (que consideran un solo gen multialélico para el sistema ABO), en donde casi nunca la sumatoria de las frecuencias cierra a la unidad. Estos antecedentes permitieron suponer la existencia de alelos recesivos en individuos AB (siendo esto imposible de acuerdo con la teoría actual de un solo gen).

Recientemente se han clonado y caracterizado los genes que codifican para las glicosiltransferasas que sintetizan los antígenos A y B (Yamamoto *et al.* 1990), y se han desarrollado metodologías de PCR que permiten analizar molecularmente este sistema. El gen de la glicosiltransferasa del tipo O está inactivado por una delección en el sitio 261, la cual crea un sitio de reconocimiento para la enzima KpnI; esta característica nos permitió buscar alelos recesivos del tipo O en 15 individuos AB, de los cuales en un caso se observó la presencia de alelos recesivos. Se demostró que este caso no tiene los dos alelos A y B, además del recesivo ya detectado, y el análisis en otras dos posiciones del gen (297 y 701) indicó la presencia de un alelo del tipo A, por lo que este individuo puede tratarse de un caso *cis*-AB (subtipo poco frecuente en el que un solo alelo codifica para una enzima bifuncional).

Estos datos sugieren que la existencia de dos genes para el sistema ABO es poco probable. La nueva variable "s" propuesta puede significar que en las poblaciones existen alelos del tipo *cis*-AB, los cuales codifican para transferasas bifuncionales; la frecuencia de esta clase de alelos que forman gametos AB quedaría representada por esta cuarta variable. Fenómenos que implican pequeños desajustes o desbalances en la expresión de los grupos ABO en la población también pueden estar representados por la variable "s".

Vo.Bo.



Dr. Alejandro García Carrancá

ÍNDICE

Agradecimientos	III
Abreviaturas	VI
I INTRODUCCIÓN	1
1 Antecedentes	1
1.1. El proyecto ABO	1
2. Estructura bioquímica del antígeno ABO	3
2.1. Desarrollo embrionario	5
3. Glicosiltransferasas y síntesis del antígeno ABO	6
3.1. Glicosiltransferasas del grupo ABO	6
3.1.1. Genes "secretor" y "H"	6
3.1.2. Glicosiltransferasa ABO	8
3.2. Glicosiltransferasas en general	9
3.2.1. Estructura	9
3.2.2. Proceso de glicosilación	10
4. Estructura molecular	11
4.1. Estructura del gen ABO	12
4.2. Transcritos ABO	12
4.3. Homología con otros genes	14
4.4. Alelos ABO	15
4.4.1. Los tres alelos principales: A1, B y O	15
4.4.2. Subtipos menores	17
4.4.3. Alelos del tipo <i>cis</i> AB	18
4.5. Genotipificación molecular del gen ABO utilizando la técnica de PCR	20
4.5.1. Generalidades	20
4.5.2. Genotipificación por PCR	21
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
III HIPÓTESIS	24
IV OBJETIVOS	25
V MATERIAL Y MÉTODOS	26
1. Procesamiento de muestras de sangre periférica	26
1.1. Fenotipificación	26
1.2. Extracción del DNA genómico	26
1.3. Cuantificación del DNA	27
2. Amplificación de los fragmentos del gen ABO mediante el método de PCR	27
2.1. Estandarización de la técnica de PCR	28
2.2. Amplificación del sitio 261	28
2.2.1. Amplificación estándar	28
2.2.2. Amplificación con marca radioactiva	29
2.3. Amplificación del sitio 703	29

3	Genotipificación	30
3.1	Digestión de los fragmentos con enzimas de restricción	30
3.2	Geles de acrilamida	30
4	Secuenciación de productos de PCR en el exon VI	31
4.1	Obtención de fragmentos	31
4.2	Secuenciación directa de fragmentos de PCR	32
4.3	Gel de secuencia	32
VI	RESULTADOS	33
1.	Obtención de muestras de sangre	33
2.	Estandarización de la técnica de PCR	33
3.	Métodos de amplificación por PCR	35
3.1.	Técnicas para el sitio 261	35
3.2.	Análisis de individuos AB en el sitio 261	38
3.2.1	Casos con análisis familiar	38
3.2.2	Casos aislados	39
3.2.3	Secuenciación de alelos dominantes	40
3.3.	Región 703	42
VII	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
1.	La técnica de PCR y sus aplicaciones	44
1.1.	Aplicaciones del método de secuenciación	44
1.2.	Aplicaciones como método de tipificación en hospitales	44
2.	El proyecto ABO	45
2.1.	Análisis molecular de los casos	46
2.1.1	Casos individuales	46
2.1.2	Casos familiares	47
2.2.	¿Uno o dos genes?	47
2.2.1.	Explicación para el ajuste de las fórmulas	47
2.2.2.	Otra explicación: los alelos bifuncionales	49
3	Perspectivas	50
VIII	CONCLUSIONES	51
IX	REFERENCIAS	52

AGRADECIMIENTOS

Al primero que debo y quiero agradecer es a mi director de tesis, el Dr. Alejandro García Carrancá, por todo el apoyo y la confianza que he sentido durante estos años. Gracias por la gran importancia y libertad que le das al desarrollo académico de tus alumnos, que es lo que te ha hecho un tutor tan solicitado.

A los integrantes del jurado, por su amabilidad, apoyo y comprensión en este proceso que dependía de una beca: Dra. Carmen Gómez Eichelmann, Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Alejandro García Carrancá, Dra. María Teresa Tussí Luna, Dr. Roberto Coria Ortega.

Agradezco a la UNAM, mi Universidad, por ofrecerme tantas posibilidades y seguir ofreciendo otras tantas más.

Quisiera agradecer al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a toda la gente que sin su trabajo tan dedicado no hubiera sido posible esta tesis:

Al personal de la Biblioteca, en especial al Lic. Brito, Alfonso, Magda, Lucía, Braulio y Alfredo: la mayor parte de las referencias de esta tesis existen gracias a ellos.

Al personal de la UACPyP, tan amables y eficientes que lograron suavizar la espantosa y desgastante etapa de trámites que implica la tesis.

A José el fotógrafo, agradezco su paciencia y disposición ante tanto trabajo urgente.

Al proyecto CCH del que he sido parte desde hace 8 años y del que he aprendido casi todo lo que sé.

A todos los maestros que sin saberlo, han influido para llegar a donde estoy el día de hoy, escribiendo esta tesis: a los primeros, con los que elegí este camino de la ciencia cuando yo era una chamaca "decolyana": Juan Cristóbal, Silvia y Julio; a los que tuvieron y tienen paciencia infinita con los biomédicos principiantes, en especial a Saúl, Roberto e Imelda, Áuster y Carmen Gómez, porque la primera formación es para toda la vida.

A los que me dieron la mano con comentarios y sugerencias sobre este trabajo, en especial al maestro Hugo Padilla, a Gabriel Gutiérrez, Carla, Benito y Fabio; a mi mamá por su enorme ayuda en la edición de esta tesis.

A Rosenda Peñaloza por su colaboración tan importante en la recolección de las sangres.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni que me ha abierto las puertas de su laboratorio cada vez que lo he necesitado, y a mis ex-compañeros de laboratorio Ana Luisa Martha, Keo, Maribel, Humberto, Víctor, Rolando, Nicolás, Elizabeth y Oreste, por demostrarme que aún cuento con ellos: en especial a Keo y Humberto que me ayudaron con las figuras de esta tesis

Al Dr. Lino Díaz de León por aquellas épocas en las que tuvo que hacerse cargo de los biomédicos y nos demostró siempre su apoyo

A mis compañeros de generación, en especial Denhí e Irene, por haber sabido apoyarnos en los momentos de histeria; finalmente valió la pena seguir.

A mis compañeros y cuates del labo: Vero, Manuel, Néstor, Miriam, Lupis, Fabio, Carla, Olga, Benito, César, Enrique, Salomón, Marce, Lety, Mayra, la señora Julia, Jorge, Emilio, Hilda, y Víctor. Los viejos compañeros y los nuevos están revueltos pero no importa. A los viejos quisiera decirles que guardo muy buenos recuerdos, y gracias por su apoyo en los tiempos difíciles. A todos los que estamos ahora, les agradezco la posibilidad de trabajar con ustedes en un espacio de discusión académica que me permite seguir pensando.

A mi vieja escuela Decroly, por ese espacio tan cálido y humano de hoy y siempre, a Carola, Ada, Hilda, Lupe y Pilar porque lo hicieron posible; a todos los pequeños "decrolyanos" que hoy me devuelven los recuerdos, "pido la palabra" para decirles: gracias por enseñarme otra vez lo que es mi escuela.

A mis cuates, los que siempre están allí:

Alejandra Ibarrola, por una amistad de toda la vida.

Denhí y Enrique, por todos esos ratos tan alegres y divertidos, por todos esos serios, en los que hasta lágrimas hubo.

Eli y Gabriel, por el valor y coraje de los dos, que es contagioso.

Carla y Gino, gracias por estar presentes y por guiarme en este camino tan lleno de baches que ustedes ya han recorrido.

Nadia, porque las distancias no terminan con las amistades. Cuauhtémoc, por esas divertidas pláticas que recuerdo con alegría.

Ernesto, Toña, Julia, Alma y Chava, por los buenos tiempos, por todo lo que aprendimos juntos.

A mi nueva familia:

Carmen, Enrique y Mónica, por todo el cariño y por esas comidas de los domingos.
Gaby, Héctor y el pequeño Julián, gracias por dejarme ser parte de ustedes.
Gabriel, Licha y "Anesi", porque da gusto sentir la confianza y el cariño como si hubieran estado allí siempre. Por abrirme las puertas de su casa y dejarme aprender cómo comienza la vida.

A Javier González y a Nacho Canals quisiera decirles que no tienen idea de cuánto los quiero. Su ejemplo de honestidad y de entereza, de lucha por la vida, me ha acompañado desde hace muchísimo tiempo.

A la familia Espinosa porque en el mar la vida es más sabrosa, y a la familia Asuar porque su tierra es otra sin dejar de ser mía.

A mis abuelos, tan lejos y tan cerca:

Mis dos abuelas, Lalá y Pura, mujeres que en su tiempo lucharon por ser diferentes, por ser independientes y fuertes. Me duele infinitamente pensar en perderlas, y ojalá puedan irse sabiendo que su ejemplo lo mantendré en mí para siempre.
Mi abuelo Félix, defensor incansable de sus ideales, arraigado a la vida.
Mi abuelo Francisco, tan cariñoso y enojón, distinción que heredó a toda la familia.

A mi mamá y a mi papá, quisiera despedirme de ustedes con esta tesis, y decirles: ya me voy a vivir mi vida, gracias a ustedes estoy lista, gracias por haberme dado todo lo necesario para crecer, para vivir. Gracias.

A mi hermano: ya sabes que cuentas conmigo, y yo sé que cuento contigo. Gracias por ser un hermano tan chido.

Por último quisiera dedicar esta tesis a Alejandro, porque allí estás cuando te necesito, por tu comprensión y cariño en estos días, por nosotros, porque me has enseñado que también los pleitos son importantes, por mirar y construir el futuro juntos como lo hemos hecho, porque hemos aprendido a mirarlo sin miedo.

ABREVIATURAS

cDNA	Acido desoxiribonucleico complementario
GalNAc	N-Acetil-Galactosamina
Gal	Galactosa
GalT	Galactosiltransferasa
GlcNAc	N-Acetil-Glucosamina
Glc	Glucosa
Man	Manosa
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RER	Reticulo Endoplásmico Rugoso
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por Retro-Transcripción
dNTPs	dioxinucleótidos-trifosfato

I INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

En esta introducción se pretende abarcar un panorama general sobre distintos aspectos del sistema ABO. En esta primera parte se definen algunos términos, y se describe cómo se dio inicio a este proyecto. El resto de la introducción se organizó en base a la cronología de cada uno de los descubrimientos que se han publicado sobre este sistema, hasta terminar con los datos más recientes en biología molecular. Aunque la tesis está relacionada principalmente con el área de biología molecular, considero que es importante mostrar la complejidad del sistema y conservar una idea global de este tema.

La denominación "antígeno de grupo sanguíneo" ha sido aplicada a moléculas antigénicas que se localizan en la membrana de los eritrocitos, aunque también se han encontrado en la mayoría de los tipos celulares epiteliales y en otros tejidos. Estudios filogenéticos han establecido que los antígenos ABH aparecen tempranamente en la evolución en tejidos ectodérmicos y endodérmicos de vertebrados cuyos eritrocitos no presentan antígenos y en forma más tardía en tejidos mesenquimatosos (Oriol *et al.* 1992). Sólo el hombre y algunos simios antropoides, el orangután y el gorila, expresan antígenos ABH en eritrocitos además de expresarlos en otros tejidos (Oriol *et al.* 1986), por lo que es más correcto utilizar la denominación "grupo histo-sanguíneo ABO" en lugar de grupo sanguíneo únicamente.

A pesar de la importancia del conocimiento del grupo ABO para los trasplantes de órganos, así como para las transfusiones, y pese a su importancia en diferentes campos de la medicina (en particular la medicina legal), el sistema ABO todavía es poco conocido. Recientemente se ha empezado a comprender cómo se construyen las moléculas de este grupo histo-sanguíneo, y a entrever, a través de situaciones patológicas como los cánceres y algunas infecciones, cuáles pueden ser sus funciones (Hakomori 1993).

1.1. EL "PROYECTO ABO".

A principios de siglo, Landsteiner observa que los eritrocitos se aglutinan en presencia de distintos tipos de sueros humanos, y de este modo pudo determinar, en 1900, los tipos de sueros que aglutinaban a distintos tipos de glóbulos. Definía así los **grupos sanguíneos**, descubrimiento por el que recibió el premio Nobel de medicina en 1930. Como resultado de sus trabajos y los desarrollados por A.

Decastello y A. Sturli, en Viena, se distinguen 4 grupos sanguíneos principales, llamados A, B, AB y O.

Posteriormente, en 1908, Epstein y Ottenberg sugirieron que los grupos ABO eran heredados como caracter mendeliano dominante, y ello fue comprobado en 1910 por Dungen y Hirzfeld, aun cuando el modo exacto del proceso hereditario no fue determinado sino hasta 1924 por Bernstein, quien postula la teoría de los **alelos múltiples**, en la cual propone la existencia de un solo gen para definir el tipo sanguíneo (Bernstein 1924), pero establece la posibilidad de que el *locus* correspondiente a este gen pueda ser ocupado por **uno de los tres** alelos distintos (I^A , I^B y I^O).

Hugo Padilla y Gabriel Garduño Soto (Facultad de Filosofía y Letras) han analizado el área lógica de la teoría de Bernstein y han encontrado errores en las bases de su planteamiento (Padilla *et al.* 1996). Considerando la existencia de dos genes ligados, con sus respectivos alelos, desarrollaron fórmulas que describen los grupos histo-sanguíneos en las poblaciones con mayor precisión. Este grupo analizó los datos de distintas poblaciones, tanto desde la perspectiva de Bernstein -donde las frecuencias alélicas o gaméticas p , q y r se asocian a los alelos o gametos A B y O, respectivamente-- como bajo la perspectiva de 4 variables, p , q , r y s asociadas a los gametos Ab, aB, ab y AB. El hallazgo matemático a partir del nuevo planteamiento que incluye dos genes ligados fue sorprendente, ya que en todas las poblaciones estudiadas (Mourant 1977) la sumatoria de las frecuencias p , q , r y s siempre cierra a la unidad, a diferencia de lo obtenido al usar las ecuaciones de Bernstein, donde la sumatoria de las frecuencias p , q y r sólo cierra a la unidad en un 2% de todas las poblaciones estudiadas.

El conjunto de las nuevas fórmulas es el siguiente:

Considerando que la sumatoria de las frecuencias gaméticas es: $p+q+r+s=1$, la representación de los fenotipos en una población estaría dada por:

$$A= 2pr + p^2$$

$$B= 2qr + q^2$$

$$O=r^2$$

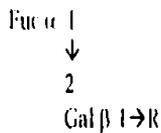
$$AB= s^2 + 2sp + 2sq + 2sr + 2pq$$

Con este hallazgo, el grupo de la Facultad de Filosofía y Letras interaccionó en 1993 con el laboratorio del Dr. García Carrancá, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con el fin de obtener datos experimentales que apoyaran esta nueva teoría; desde entonces estos dos grupos de trabajo han colaborado en "el proyecto ABO" para elucidar este problema, tanto a nivel teórico como a nivel experimental.

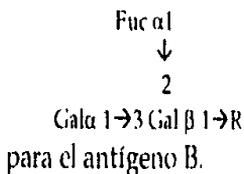
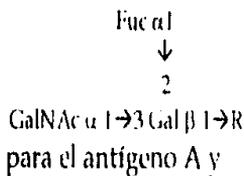
2. ESTRUCTURA BIOQUÍMICA DEL ANTÍGENO ABO

En 1960, oligosacáridos obtenidos de mucinas purificados de fluidos de quistes ováricos fueron el material para analizar la naturaleza química de las estructuras que determinan los grupos histo-sanguíneos (A, B y H) (Morgan y Watkins 1959; Kabat 1973; Ginsburg 1972).

La degradación secuencial de estas cadenas de oligosacáridos con exoglicosidasas reveló que el remover un solo residuo de azúcar no reductor resultaba en la pérdida de la antigenicidad y se desarrollaba una especificidad antigénica nueva y distinta (Watkins 1962). Este procedimiento pudo repetirse secuencialmente en la cadena tanto como la disponibilidad de exoglicosidasas y de anticuerpos lo permitio, demostrando que cada estructura nueva de carbohidratos funciona como un determinante antigénico, y que la antigenicidad de cada estructura depende de la adición de **una sola unidad** de azúcar. De esta manera se identificaron tres determinantes antigénicos mínimos di o trisacáridos para cada grupo sanguíneo; para el determinante H se identificó el disacárido



y para los determinantes A y B los trisacáridos:



Los individuos del grupo histo-sanguíneo A o B se caracterizan por la presencia de antígenos A o B, respectivamente. Los individuos del grupo histo-sanguíneo O expresan el antígeno O (H) precursor de los antígenos A o B, como se explicará más adelante.

Estos determinantes se encuentran en los extremos no reductores de cadenas oligosacáridas. Estas cadenas forman parte de glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de los **eritrocitos y otros tejidos**. En secreciones de quistes ováricos y glándulas mucosas del tracto intestinal, tracto genital y respiratorio se han detectado como parte de glicoproteínas macromoleculares (mucinas). También se encuentran como oligosacáridos libres en leche y orina (Watkins 1980; Watkins *et al.* 1988).

Las glicoproteínas que poseen cadenas de carbohidratos con epitopes ABH unen estas cadenas en dos formas: por glicosilación del grupo amino de una asparagina que forme parte de la secuencia consenso NXS/I (glicosilación tipo N), o bien, a través del grupo hidroxilo de una serina o treonina (glicosilación tipo O). En el caso de los glicolípidos, la biosíntesis de estas cadenas de carbohidratos se inicia en una ceramida (N-fatiacil-esfingosina) (Hakomori y Kannagi 1986).

Existe un gran polimorfismo estructural en estos antígenos inducido por la variación de la cadena precursora. Se han clasificado los determinantes ABH en base a 6 tipos de cadenas precursoras de acuerdo con la estructura del disacárido base, así pues existen 6 estructuras que funcionan como **sitios aceptores** para la construcción del **epitope H**:

Tipo 1Gal β 1-3GlcNac1-R

Tipo 2Gal β 1-4GlcNac1-R

Tipo 3Gal α 1-3GalNac1-R

Tipo 4Gal β 1-3GlcNac1-R

Tipo 5Gal β 1-3Gal1-R

Tipo 6Gal β 1-4Glc-R

Cada **isotipo de los antígenos ABO** tiene un patrón de expresión característico en los tejidos y fluidos:

El antígeno ABO **sintetizado a partir de la cadena precursora tipo 1** está presente en la mayor parte de los epitelios secretores (tales como el epitelio de las glándulas salivales, mamarias, etc) esto es, en tejidos derivados de endodermo. En el caso de eritrocitos y linfocitos, estos antígenos son expresados debido a la absorción de glicolípidos circulantes del plasma (Marcus 1969). Antígenos ABO que poseen estructuras base tipo 2 están presentes en tejidos derivados del ectodermo o del mesodermo, principalmente en los glóbulos rojos y en las otras células sanguíneas y epiteliales (Hakomori 1993). Estos epitopes en las otras cadenas han sido descritos en la superficie de células normales y tumorales en

cantidades pequeñas, comparadas con los dos primeros tipos. el tipo 3 en glicoconjugados de tejido epitelial de intestino, pulmones y glándula submaxilar, el tipo 4 asociado a glicolípidos, particularmente los de riñón humano (King 1994, Clausen *et al.* 1989), y se sabe que la síntesis de las estructuras base 3 y 4 está influenciada por otros sistemas además del sistema ABC (en el caso de estructuras tipo 3 asociadas a A), el tipo 5 se ha sintetizado artificialmente y hasta ahora no se ha encontrado en tejidos vivos; y el tipo 6 está presente en secreciones exócrinas como leche y orina (Oriol 1990).

2.1. DESARROLLO EMBRIONARIO

Para tener un panorama más completo de los conocimientos de los grupos sanguíneos, es necesario mencionar algunas particularidades durante el desarrollo embrionario. El estudio de estos antígenos en el embrión ha demostrado la existencia de una nueva subdivisión en las cadenas del tipo 2. En el adulto predomina la cadena tipo 2 denominada "ramificada" o antígeno *I*. Esta cadena se sintetiza por la adición de varias cadenas cortas a una estructura base, la cual recibe el nombre de cadena "no ramificada" o antígeno *i*, que está presente en el feto. Las cadenas ramificadas contienen varios antígenos de los grupos histo-sanguíneos, mientras que las cadenas no ramificadas llevan sólo uno. De este modo las células fetales están menos expuestas que las células adultas a los anticuerpos anti-A y anti-B dirigidos contra los grupos histo-sanguíneos. Este fenómeno podría contribuir a proteger al feto del sistema inmunitario de la madre si esta última es de otro grupo (Hakomori 1981).

En los embriones humanos más pequeños que se han estudiado (5-8mm, que corresponden a la quinta semana de desarrollo), la mayoría de los tejidos expresan antígenos ABH, independientemente del fenotipo secretor del individuo. Los antígenos ABH epiteliales alcanzan su expresión máxima a los 35mm (aprox. 9 semanas), después de lo cual la expresión disminuye (Szulman 1964). Es muy interesante que en algunos órganos esta disminución coincide con la aparición de algunas funciones específicas de los órganos, como la secreción de mucosidad en el tracto digestivo (Szulman 1965).

3. GLICOSILTRANSFERASAS Y SÍNTESIS DEL ANTÍGENO ABO

Al descubrirse las estructuras antigénicas de los grupos histo-sanguíneos, Watkins en 1959 predice que los genes ABO, H y Lewis codifican para glicosiltransferasas que añaden el último azúcar a estructuras precursoras, y de esta manera se sintetiza cada determinante antigénico. Esta propuesta fue confirmada más tarde por la caracterización de diversas glicosiltransferasas humanas por Watkins y Ginsburg en 1972 (Watkins 1972; Ginsburg 1972). Los antígenos ABH no son productos primarios de genes, sino que son productos de una reacción enzimática catalizada por "glicosiltransferasas". Se encontró que individuos A poseen actividad de α 1-3 N-acetil-galactosaminil-transferasa (transferasa A), mientras que individuos B tienen actividad de α 1-3 galactosil-transferasa (transferasa B). Individuos AB poseen ambas, y los individuos O ninguna.

Hoy se sabe que la glicosilación es un proceso complejo que involucra a un gran número de genes; cada uno codifica una glicosiltransferasa particular que cataliza la adición de un monosacárido específico a un sustrato aceptor bien definido (Paulson *et al.* 1989) y por lo tanto, para que se exprese el antígeno del grupo histo-sanguíneo ABO deben estar presentes en la célula las glicosiltransferasas que sintetizan las cadenas precursoras. Es importante subrayar que el producto de la reacción de una enzima se convierte en el sustrato para la reacción que sigue, siendo éste el mecanismo general para la síntesis de cadenas de oligosacáridos (Watkins 1986). La concentración necesaria de sustrato donador, esto es, azúcares activados por nucleótidos, y cofactores como iones metálicos también son requisitos para la síntesis (Watkins *et al.* 1988).

3.1. LAS GLICOSILTRANSFERASAS DEL GRUPO ABO

3.1.1. Genes "Secretor" y "H"

La glicosiltransferasa H sintetiza el epítipo H, sustrato para la construcción del epítipo ABO: cada cadena precursora (tipos 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) puede recibir una fucosa unida en α 1-2 a la galactosa terminal para formar el determinante H monofucosilado (figura 1); no hay que olvidar que esta enzima está codificada por dos genes, uno llamado H y otro llamado Se, como se detalla más adelante.

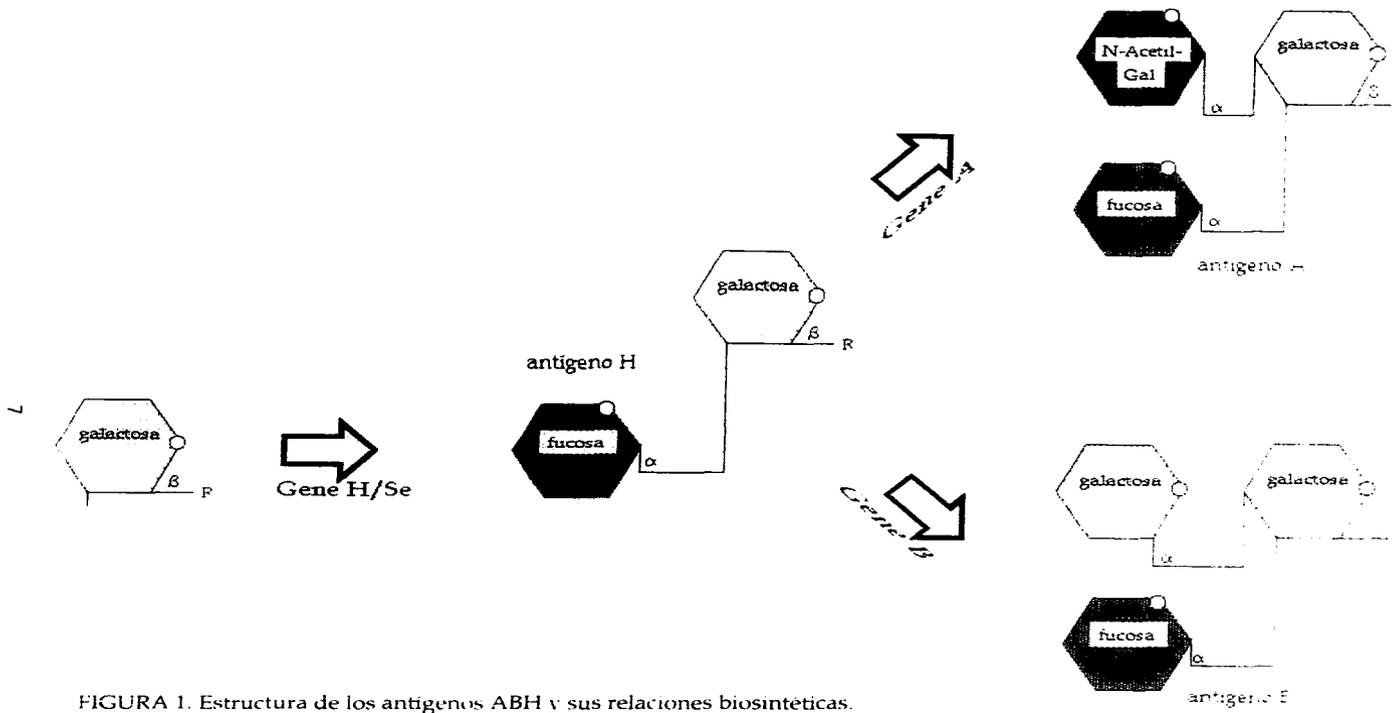


FIGURA 1. Estructura de los antígenos ABH y sus relaciones biosintéticas.

Se ha planteado la existencia de dos genes distintos que codifican para glicosiltransferasas que son capaces de sintetizar, de manera independiente, el epítotope H: el gen H y el gen *Se* (Lemieux 1978). Esta posibilidad ha sido largamente discutida en la última década, y los experimentos que se han publicado han apuntado en este sentido (Kumazaky y Yoshida 1984, Betteridge y Watkins 1985, Le Pendu *et al.* 1985). Se ha identificado una α -2 fucosiltransferasa que actúa preferencialmente sobre la cadena precursora tipo 2, a la cual se le ha denominado como codificada por el gen H, a diferencia del gen *Se*, que codifica también una α -2 fucosiltransferasa que actúa preferencialmente sobre la cadena tipo 1 (Oriol 1981, Sarnesto *et al.* 1992, Larsen *et al.* 1990). La actividad de estas enzimas sobre las estructuras 3, 4, 5 y 6 aún no se ha estudiado (Clausen 1989).

Todos los eritrocitos expresan antígenos ABH excepto aquellos individuos que poseen un fenotipo muy poco común denominado Bombay. Se ha demostrado, gracias a los trabajos de caracterización y clonación del gen H (Larsen *et al.* 1990b), que estos individuos tienen este gen inactivado por una mutación sin sentido (Kelly *et al.* 1994), por lo tanto se considera que en los eritrocitos el gen H es la forma activa que participa en la síntesis de los antígenos ABO.

Por otro lado, la mayoría de los individuos son capaces de secretar los antígenos de los grupos histo-sanguíneos (Watkins 1980). Alrededor del 80% excretan los antígenos A, B o H en la leche, la saliva, el jugo gástrico, el espermatozoide, etc. Estos sujetos se dicen secretores, en oposición al 20% restante que se llaman no secretores. Este fenómeno está relacionado con el gen *Se*. Aunque este control genético se conoce desde el principio de los años 30, todavía no se conocen completamente los mecanismos bioquímicos y genéticos implicados. En los sujetos secretores, el gen *Se* dominante es la forma activa en los epitelios glandulares, donde estimula la producción del antígeno H por el tejido (que lo secreta), lo que es incapaz de hacer la forma *se* recesiva.

3.1.2. Glicosiltransferasas ABO

El paso final de la síntesis del epítotope ABO es catalizado por la **glicosiltransferasa A o B**: el determinante H monofucosilado recibirá una GalNAc (transferida por la glicosiltransferasa A) o una Gal (transferida por la glicosiltransferasa B) para formar los epítotospes A o B mientras que los individuos O (H) carecen de esta actividad y mantienen el antígeno H sin modificar. Así pues, el *locus* ABO codifica para una enzima glicosiltransferasa que añade otro azúcar al antígeno O(H). El **alelo A**

produce una enzima que utiliza el cofactor UDP N-Acetil galactosamina, formando el antígeno A, y el alelo B a su vez produce una enzima que utiliza como cofactor UDP Galactosa (figura 1).

Una observación importante y muy discutida hasta ahora es que ambas enzimas de los grupos histo-sanguíneos tienen la capacidad potencial de sintetizar el determinante antigénico contrario (Watkins 1986), la glicosiltransferasa B puede transferir GalNAc en lugar de Gal a su sustrato, y viceversa. Estas observaciones se han hecho bajo ciertas condiciones experimentales *in vitro* y se ha refutado que no existe alguna prueba *in vivo* que sostenga esta afirmación (Schachter 1994).

3.2 GLICOSILTRANSFERASAS EN GENERAL.

Se ha estimado que se requieren más de 100 glicosiltransferasas para sintetizar la mayoría de las estructuras de glicanos que hasta ahora se conocen (Stultset *et al.* 1989). A la fecha sólo una pequeña parte de estas glicosiltransferasas ha sido purificada homogéneamente para obtener la secuencia de aminoácidos y el cDNA correspondiente. Los intentos de aislar estas enzimas no han sido fáciles ya que existen en cantidades mínimas en células y tejidos, y muchas de las glicosiltransferasas están unidas a la membrana, por esto es que hasta la fecha se han podido purificar y clonar muy pocas de ellas.

Existe poca homología entre las glicosiltransferasas que han podido caracterizarse a nivel genómico, incluso entre glicosiltransferasas que utilizan el mismo sustrato donador y/o aceptor (excepto la familia de α 1-3/4 fucosiltransferasas). No se ha encontrado un patrón común de estructura de intrones-exones, ni una correlación entre los exones y los dominios proteicos (Joziassse *et al.* 1992), aunque sí existe homología a nivel estructural, ya que la estructura de los dominios de estas enzimas es similar entre ellas.

3.2.1 Estructura

Todas las glicosiltransferasas que se localizan en Golgi son monoméricas (Kleene y Berger 1993) y comparten estructuras con **dominios proteicos similares**. La secuencia de aminoácidos que se dedujo de la glicosiltransferasa A indica que posee una estructura de dominios similar a la ya descrita para las otras glicosiltransferasas clonadas y caracterizadas hasta hoy (Joziassse *et al.* 1992), cuyos dominios son los siguientes:

El amino-terminal consiste en una cola citoplásmica corta que posee cargas positivas, las cuales se cree que son necesarias para adquirir una topología de

membrana correcta. Poseen un dominio transmembranal cuya secuencia hidrofóbica sirve para dirigir a la enzima hacia la membrana de Golgi y para su anclaje en la membrana. La región del tallo en el lumen (con 50 a 100 aminoácidos accesibles a rompimiento catalítico por proteasas) podría servir como bisagra flexible para el dominio catalítico, y finalmente un dominio catalítico globular compacto, resistente a proteasas. En esta zona y la región del tallo pueden encontrarse sitios de fosforilación y sitios de glicosilación. De acuerdo a este modelo, estas glicosiltransferasas de Golgi comparten la topología de proteínas de membrana tipo II (Kleene y Berger 1993).

Estas transferasas poseen dos sitios de unión, una región de unión para el azúcar (donador) y otro para el sustrato (aceptor), generalmente este último puede acomodar más de un azúcar terminal, o una porción del aceptor lejana al sitio de reacción. No se conoce la estructura tridimensional de estos dominios (Joziasse *et al.* 1992), por lo cual aun no es posible entender cómo residuos de aminoácidos que se encuentran muy separados entre sí pueden acercarse para crear tanto los sitios de unión al sustrato como los sitios catalíticos en estas enzimas (Schachter 1994).

3.2.2 Proceso de glicosilación

Todos los procesos de glicosilación se llevan a cabo en el Reticulo Endoplasmico y en el Aparato de Golgi, incluyendo la síntesis de las cadenas de carbohidratos que en su extremo no reductor poseen un antígeno ABC. Como ya se ha mencionado, estas cadenas de carbohidratos pueden estar unidas a proteínas o a lípidos.

La glicosilación de residuos de asparagina en proteínas (N-glicosilación) es iniciada en el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER), donde una transferasa transfiere el oligosacárido $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_6\text{Glc}$ unido a un dolicol-fosfato. Sustracciones subsecuentes por exoglicosidasas en el RER dejan una estructura base mínima de $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_1$ para ser glicosilada posteriormente por N-acetilglucosaminiltransferasas y otras transferasas presentes en el complejo de Golgi (para una revisión ver Kornferld y Kornferld 1985).

La glicosilación en serina y treonina (O-glicosilación) es iniciada por la adición de un monosacárido de GalNAc catalizado por una transferasa localizada probablemente en *cis*-Golgi o RER tardío (Dekker y Strous 1990; Sadler 1984; Tooze *et al.* 1988). Hasta ahora no se ha encontrado una secuencia consenso, aunque se ha observado una correlación débil con residuos de prolina y glicina adyacentes al sitio de glicosilación.

Menos información existe en la topografía para la biosíntesis de los glicoesfingolípidos. La ceramida es sintetizada en el retículo endoplasmico (Walter *et al.* 1983) y datos recientes de Trinchera (Trinchera *et al.* 1991) sugieren que la adición inicial del monosacárido de glucosa ocurre en el lado citoplásmico del aparato de Golgi.

La síntesis de la última parte de las cadenas de carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos se cree que se lleva a cabo por la acción de glicosiltransferasas localizadas en el aparato de Golgi. Muchos estudios han indicado que las glicosiltransferasas en Golgi presentan una organización en las cisternas de *cis* a *trans* dependiendo del orden de su actividad secuencial (Roth 1987); de acuerdo con este dato, las ABO glicosiltransferasas se han localizado en el lado *trans* de la pila de cisternas del aparato de Golgi (Paulson *et al.* 1989; Roth 1988).

Existen también formas solubles de estas transferasas que seguramente son producto de las proteasas endógenas sobre las glicosiltransferasas unidas a membrana. Estas enzimas solubles se detectan en leche y fluidos corporales (suero, por ejemplo). La falta de homología entre las distintas glicosiltransferasas sugiere que existen proteasas específicas implicadas en la liberación del dominio soluble y por lo tanto sería una forma de control para remover del aparato de Golgi alguna glicosiltransferasa en particular, aunque no existen datos experimentales que apoyen esta hipótesis (Clausen *et al.* 1992).

4. ESTRUCTURA MOLECULAR

En el año 1976, el sitio del *locus* ABO humano es mapeado en el cromosoma 9q34, unido al *loci* para el síndrome de nail-patella (NA) y al de adenilato cinasa (AK1) (Westervel *et al.* 1976; Ferguson-Smith *et al.* 1976), y recientemente se han confirmado estos datos por hibridización *in situ* en cromosomas metafásicos (Bennet *et al.* 1995).

Hace relativamente poco fue posible purificar homogéneamente la glicosiltransferasa A de los grupos histo-sanguíneos (Clausen *et al.* 1990; Navaratnam *et al.* 1990) de tejido de pulmón humano y de mucosa intestinal, con lo que se obtuvo la secuencia parcial de aminoácidos de esta enzima. En base a esta secuencia parcial, se utilizaron oligonucleótidos complementarios al gene para sintetizar (con el método de RT-PCR) pequeñas sondas que fueron usadas para hibridar con una librería de cDNA de la línea celular MKN45 humana; de esta

forma se clonó y secuenció un DNA complementario que codifica para esta transferasa (Yamamoto *et al.* 1990a).

A partir de este trabajo, se ha podido conocer cada vez mas las bases moleculares de las glicosiltransferasas codificadas por varios subgrupos de alelos en el locus ABO humano (Yamamoto *et al.* 1990b; Yamamoto *et al.* 1992; Yamamoto *et al.* 1993a, Yamamoto *et al.* 1993b; Yamamoto *et al.* 1993c; Yamamoto *et al.* 1993d).

4.1. ESTRUCTURA DEL GEN ABO

Este gen consiste de 7 exones que abarcan 18 kb del DNA (figura 2). El tamaño de los exones varía de 28 a 688 pb, y la mayor parte de la secuencia codificante se encuentra en el exón 7 (Bennet *et al.* 1995)

La región hidrofóbica, que al parecer es el dominio transmembranal de la enzima (residuos de aminoácidos 17-37), está codificada casi en su totalidad en el exón 2, con los últimos 4 aminoácidos de esta región localizados en el exón 3; el extremo amino-terminal de la forma soluble de la transferasa A (el aminoácido 54, es decir, el probable sitio de corte proteolítico) en el exón 4 (Yamamoto *et al.* 1995)

4.2. TRANSCRITOS ABO

Existe evidencia del uso alternativo de exones en los transcritos del gene ABO en diferentes órganos humanos (Bennet *et al.* 1995). Con la técnica de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos localizados en exón I y VII se han detectado mensajeros que difieren en tamaño. Es importante mencionar que el procesamiento alternativo de los transcritos de los genes ABO podría excluir los exones III-IV **sin producirse cambios en el marco de lectura**. Éste no fue el caso para la mayoría de estos transcritos, en los que se ha encontrado que no contienen el exón VI. Se sabe que la falta de este exón (que posee la delección del sitio 261 para la mayoría de los alelos tipo O) introduce un codón de terminación y por lo tanto se produce una proteína truncada e inactiva (Yamamoto *et al.* 1995)



FIGURA 2. Organización genómica del locus ABO. Los números entre los exones (cajas negras) indican el tamaño en pares de bases de cada intrón. En la parte inferior se indican las bases en las que terminan y/o inician los distintos exones (Bennet *et al.* 1995).

4.3 HOMOLOGÍA CON OTROS GENES

De las pocas excepciones en las que se observa **homología génica** entre glicosiltransferasas es la homología entre las transferasas del grupo histosanguíneo ABO con la α 1-3 galactosiltransferasa encontrada en animales (Joziase *et al.* 1989; Larsen *et al.* 1989a; Yamamoto y Hakomori 1990). La α 1-3 GalT y la transferasa B transfieren el mismo azúcar (galactosa) y crean el mismo tipo de enlace glicosídico (α 1-3) pero utilizan distintos sustratos aceptores. El sitio aceptor para la transferasa B (recordemos que es el epítipo H) consiste en una fucosa unida a una galactosa por medio de un enlace α 1-2 mientras que los aceptores para la α 1-3 GalT no tienen esta fucosa (Yamamoto *et al.* 1995).

La homología se limita a los dos últimos exones de ambos genes ABO (exón VI y VII) y del gene murino para la α 1-3 Gal T (exón VIII y IX), lo que sugiere que ocurrió algún tipo de "barajeo de exones" en el curso de la evolución de estos genes. Es interesante además que estos dos genes comparten una estructura similar en la organización del marco de lectura (Bennet *et al.* 1995).

La α 1-3 GalT está presente en todos los animales excepto en los **monos del viejo mundo**, y tiene una estructura primaria y tamaño similar a otras transferasas (Joziase *et al.* 1989; Joziase *et al.* 1992; Shaper 1989). Este gene en el hombre contiene defectos estructurales (Larsen *et al.* 1990a).

Joziase y colaboradores (Joziase *et al.* 1991) identificó dos secuencias α 1-3 galactosiltransferasas en humanos. Una está organizada como un pseudo-gene que no contiene intrones y se localiza en el cromosoma 12q14-q15 (clona HGT-2), y tiene en los tres marcos de lectura múltiples inserciones y deleciones y codones sin sentido. La otra secuencia sí contiene intrones y reside en el cromosoma 9 en q33-q34 (Henion *et al.* 1994; Shaper *et al.* 1992), por lo que al menos uno de estos genes co-localiza con el locus ABO (Bennet *et al.* 1995). Este pseudogene no procesado contiene dos mutaciones y un codón sin sentido que rompen el marco de lectura.

La similitud entre estos genes en el humano (55% de identidad) indica que posiblemente todos ellos se derivan de un mismo gene ancestral del que hubo duplicación génica y la divergencia subsecuente (Scachter 1994). Los pseudogenes no funcionales probablemente reemplazaron al gen funcional para la α 1-3 GalT en los monos del viejo mundo algún tiempo después de la divergencia de los monos del nuevo mundo y los del viejo mundo (Bennet *et al.* 1995).

En un intento por encontrar otros genes homólogos, Yamamoto clonó un fragmento "homólogo pero no idéntico" a ninguno de estos dos genes; la función de este gene (llamado hgt4) no ha sido determinada (Yamamoto *et al.* 1991).

4.4 ALLELOS ABC

La comparación entre las secuencias de nucleótidos de regiones codificantes en distintos alelos ABC ha llevado a la identificación de diferencias (mutaciones) que podrían conferir especificidades diferentes y por lo tanto explicar las distintas actividades de las transferasas codificadas por estos alelos (Yamamoto 1995).

En la figura 3 se resumen las mutaciones que se han reportado hasta ahora para los alelos descritos, y en el texto se explicará con más detalle las características de cada uno.

4.4.1. Los tres alelos principales: A¹, B, O

Después de obtener la secuencia del alelo A, se construyeron cDNAs de líneas celulares de adenocarcinoma de colon de tipo O, AB y B. Se encontró que existen 7 diferencias entre los alelos A y B, y que de éstas sólo 4 (posiciones 526, 703, 796 y 803) implican cambios en 4 aminoácidos que se encuentran en el sitio catalítico de la enzima; por lo tanto estos cambios son los que afectan al reconocimiento del tipo de cofactor que la enzima utiliza. Fabricando híbridos de estos dos cDNAs, se ha demostrado que 2 aminoácidos son cruciales para la especificidad de la actividad enzimática: Leucina 266 y Glicina 268 confieren a la enzima A la capacidad de reconocer la N-acetilgalactosamina. Metionina 266 y Alanina 268 hacen que la enzima B reconozca una galactosa (Yamamoto *et al.* 1990b), aunque estudios posteriores en el alelo *cis*-AB han indicado que los otros dos aminoácidos también tienen un papel muy importante (Yamamoto *et al.* 1993b).

En la mayoría de los alelos tipo O se ha encontrado que existe una deleción en la posición 261 que cambia el marco de lectura y provoca que la traducción termine de manera prematura produciéndose una proteína truncada (Yamamoto 1990). El primer alelo de este tipo reportado (O¹) posee una secuencia idéntica al alelo A, excepto por esta deleción.

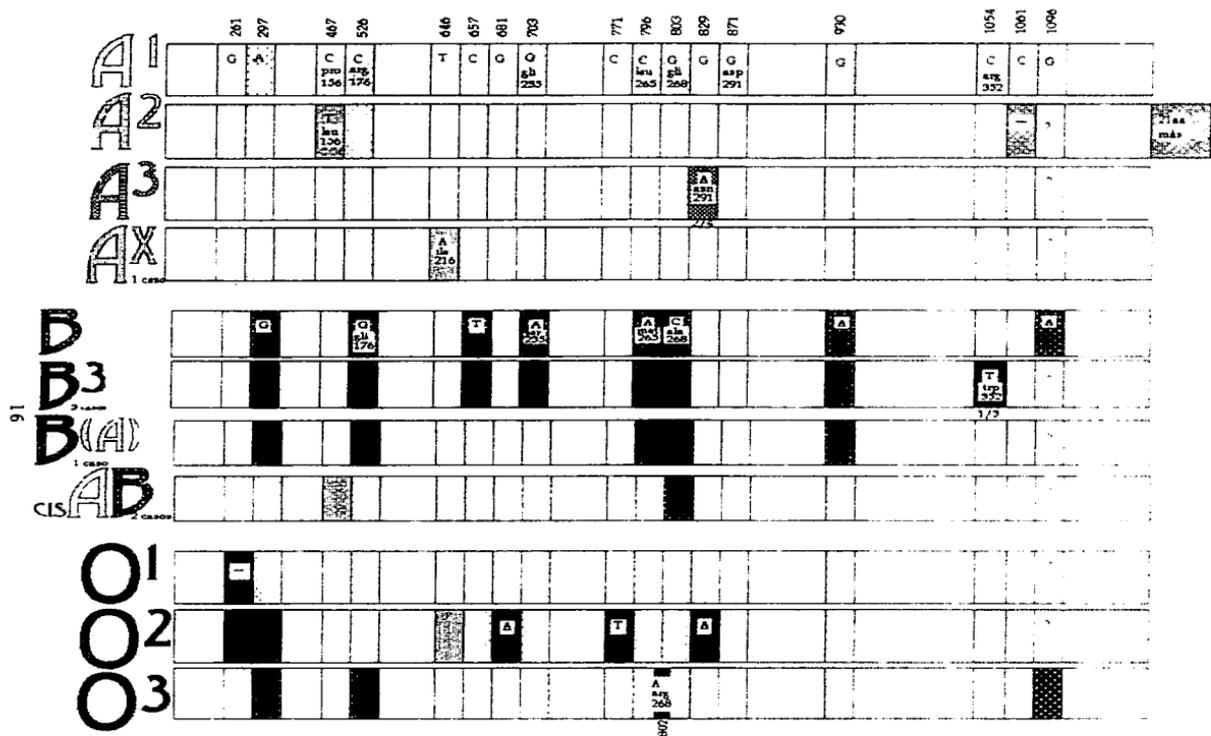


FIGURA 3 Comparación entre las secuencias nucleotídicas de los alelos del sistema ABO humano. En algunos subtipos se menciona el número de casos analizados.

Yoshida (Yoshida *et al.* 1979) identificó con anticuerpos policlonales glicosiltransferasas A o B en el suero de individuos O, sugiriendo la existencia de una proteína inactiva similar a las transferasa A o B. En estudios posteriores por Greenwell y Watkins (Greenwell *et al.* 1987) se demostró que existe actividad muy débil, similar a la transferasa A² en plasma concentrado de individuos O, por lo que se sugirió que todos los individuos son potencialmente capaces de sintetizar antígenos A o B (Watkins 1988). La explicación más factible para este fenómeno ha sido el descubrimiento de nuevos tipos de alelos O que podrían tener una mínima actividad enzimática. En un análisis de 300 donadores daneses (Grunnet *et al.* 1994), se encontró un nuevo tipo de alelo O (llamado O³) sin la delección 261, caracterizada como B en la posición 526 y A en la posición 703 con una sustitución característica en la posición 802 (esta mutación produce un cambio de glicina 268 a arginina 268; esto produce distorsiones en el sitio catalítico, lo que convierte a esta proteína en una enzima no funcional), y se ha sugerido que esta enzima podría ser la que Yoshida había detectado. Yamamoto también reportó un tercer tipo de alelo O (O⁴), con delección en 261, y una sustitución característica del alelo B. Podrían encontrarse otro tipo de alelos O, si se toma en cuenta los análisis de Johnson y Hopkinson (1992) en el que detectan 4 productos diferentes en individuos O por medio de electroforesis desnaturante de los productos de PCR del exón correspondiente a la zona 261.

4.4.2. Subtipos menores: A², A³, A^x, A^m, A^{el}, B³, B^x, B^m, B^{el}

Además de los subgrupos A¹ o A², existen otros subgrupos débiles A³, A^x, A^m, y A^{el}, al igual que para el alelo B existen los subgrupos correspondientes B³, B^x, B^m y B^{el}, aunque son menos frecuentes (Yamamoto 1995).

Las bases químicas de los subgrupos han sido poco entendida. No se sabe si existe una diferencia cualitativa en la estructura del antígeno de estos subgrupos o si la diferencia radica únicamente en la actividad de las glicosiltransferasas ABO (Economidou *et al.* 1964; Mohn *et al.* 1977; Kisailus y Kabat 1973). La clasificación de estos subgrupos se estableció en base a tres criterios distintos: el grado de aglutinación de los eritrocitos, la presencia o ausencia de anticuerpos en el suero y la presencia o ausencia de sustancia inmunodominante en la saliva (Yamamoto 1995). La teoría más aceptada es que estos subgrupos se diferencian entre sí por la **cantidad** de antígeno que se detecta en la superficie de los eritrocitos.

Existen estudios que indican que la actividad enzimática de la transferasa A² es menor a la de A¹, y que la de otros subtipos es aún menor (Scachter *et al.* 1973,

Carton *et al.* 1978). El análisis molecular de algunos de estos subgrupos ha comprobado que algunos de ellos tienen mutaciones características que afectan la actividad enzimática. En otros casos no se ha podido homogeneizar el tipo de mutaciones de acuerdo al subgrupo (como en el caso de individuos A¹ y B³) (Yamamoto 1995). Esta falta de información se debe principalmente a la pequeña cantidad de individuos de estos grupos raros que se ha analizado (se reporta para cada subtipo o subgrupo de 2 a 4 individuos), y por otra parte, los datos hasta hoy obtenidos (de la mayor parte de los subgrupos y alelos raros,) se refieren únicamente a los dos exones mayores, y no se han analizado cambios en los extremos amino-terminales (Clausen 1994). Variaciones en el codón de inicio, en la secuencia de la señal transmembranal así como en la región del tallo y posiblemente el inicio del dominio catalítico podrían significar cambios importantes para la proteína resultante, en la citolocalización o para el corte proteolítico (Paulson *et al.* 1989a)

4.4.3. Alelos del tipo *cis*-AB

Se ha caracterizado un grupo llamado "*cis*-AB", detectado ya desde los años 70 en familias de individuos AB que producían descendencia AB (Hummel *et al.* 1977).

Estos individuos sólo pueden detectarse en familias en las que existe descendencia proveniente de padres *cis*-AB x O y aparecen hijos con fenotipo AB (figura 4). Otras 2 posibilidades para su detección por análisis familiar son las cruza del genotipo *cis*-AB/O X AO o BO, y que la descendencia sea de fenotipo O. Cualquier otra posibilidad se comporta dentro de las opciones calculadas para cualquier cruce AB con cualquiera de los 4 fenotipos, por lo que no es posible detectarlo.

Estos individuos *cis*-AB expresan simultáneamente antígenos A y B que están especificados por una sola unidad genética en un cromosoma. El término *cis*-AB se utilizó para discriminar este genotipo AB del genotipo AB ordinario en el cual dos alelos (A y B) están presentes en dos cromosomas separados (*trans*). El análisis molecular indica que se trata de un alelo que codifica una transferasa con actividad enzimática doble, tanto de A como de B, ya que los 2 casos analizados tuvieron una sustitución similar a B en el nucleótido 803, mientras que el resto del alelo es idéntico a A (Yamamoto *et al.* 1993b).

Otro alelo con estas características de **bifuncionalidad** es el llamado B^(A); no se sabe cuántos alelos polimórficos con esta característica pueden existir en la población sin haberse detectado

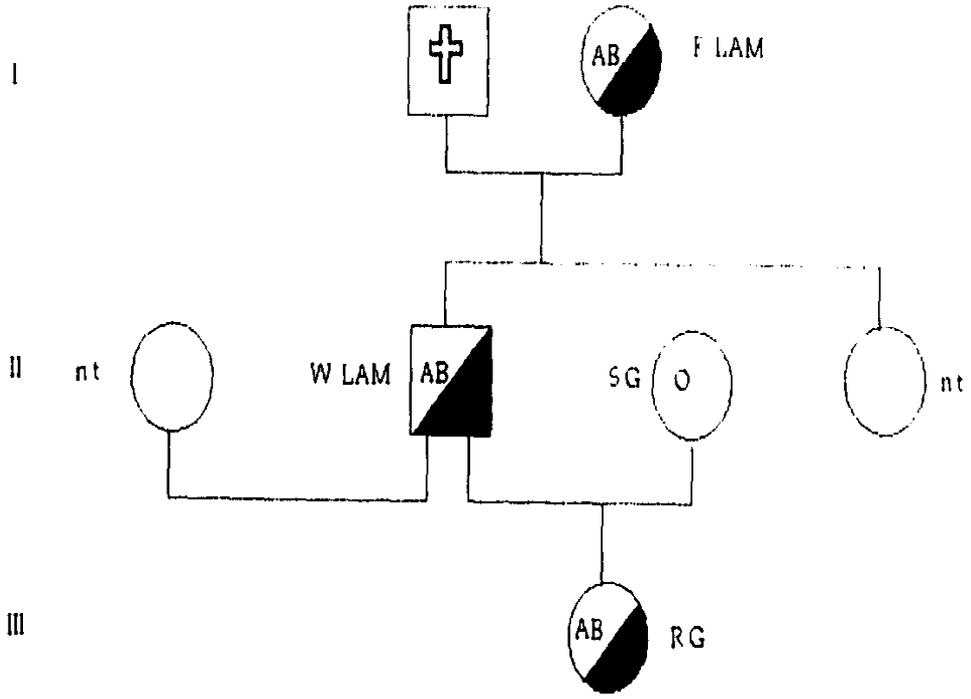


FIGURA 4. Árbol genealógico de la familia Lam/G (portadores del alelo *cis*-AB). El fenotipo fue detectado en la tercera generación, resultado de la cruce AB x O (Hummel *et al.* 1977).

Incluso con genotipificación a nivel molecular con las técnicas que se han reportado recientemente (como se describe más adelante), no es posible identificar molecularmente a estos individuos a menos que se utilice la secuenciación del cDNA correspondiente. Si es posible obtener datos que no correspondan con la genotipificación, por ejemplo, si un individuo es genotipificado como AB y los resultados de la genotipificación demuestran que es un heterocigoto para A, es posible que se trate de un individuo *as-AB*, y podría considerarse el clonar y secuenciar su genoma, aunque cabe también la posibilidad de un error en la genotipificación. La manera más segura de detectar estos casos es cuando la herencia del alelo en forma *as* se ha comprobado a través de estudios familiares.

4.5 GENOTIPIFICACION MOLECULAR DEL GENF ABO UTILIZANDO LA TECNICA DE PCR

4.5.1. Generalidades

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar millones de veces regiones pequeñas del genoma, siempre y cuando se conozca la secuencia de ambos lados de la región de interés. El método de PCR se basa en la amplificación de DNA *in vitro*, catalizada por una polimerasa extraída de una bacteria termofílica (por lo que resiste altas temperaturas) utilizando 2 oligonucleótidos sintéticos, cada uno complementario a ambas hebras en los dos extremos de la región a amplificar: la polimerasa copia la secuencia de DNA que existe entre los dos oligonucleótidos.

Se comienza con pequeñas cantidades de DNA (generalmente de extractos de genomas completos), y se amplifica la región en fragmentos que pueden ser visualizados mediante electroforesis con alguna tinción o autorradiografía.

El DNA es amplificado mediante cambios de temperatura que se repiten ciclicamente: el primer paso es la desnaturalización del DNA por un incremento de temperatura (96°C) lo que permite la separación de las cadenas complementarias de DNA; posteriormente hay una disminución de temperatura (25-65°C) lo cual permite la unión o alineamiento del DNA con las dos secuencias de oligonucleótidos (el exceso de oligonucleótidos en la reacción permite que hibriden específicamente a la secuencia del DNA de interés); y finalmente hay un incremento de temperatura (72°C) en el cual la polimerasa copia la secuencia del DNA (uniendo nucleótidos trifosfato) desde el extremo 3-OH de cada oligonucleótido. Estos tres pasos se repiten durante cierto número de ciclos, lo que

permite un incremento exponencial en el número de copias de DNA, alrededor de los 35 ciclos se alcanza una meseta en la que se acumulan más templados y más oligonucleótidos de los que la enzima puede extender durante el ciclo, y el incremento en el número de copias se vuelve lineal.

De esta manera, partiendo de pequeñas cantidades de DNA, es posible caracterizar y analizar regiones de interés en el genoma.

4.5.2. Genotipificación por PCR

El análisis molecular de los genes ABO en el DNA genómico depende de la existencia de sitios de restricción alelo-específicos que se han encontrado en las secuencias del cDNA de individuos A, B y O (Yamamoto *et al.* 1990b).

Estos sitios de restricción se detectan utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos que amplifican regiones del gene que contienen sitios característicos de cada alelo (figura 5).

El DNA amplificado se corta con la enzima de restricción que corresponda, para después analizar el fragmento en electroforesis, y se obtiene una correlación perfecta entre la presencia de los fragmentos de restricción y el fenotipo de la muestra. El modelo ha sido corroborado por varios laboratorios utilizando técnicas similares (Matsuki *et al.* 1994; O Keefe y Dobrovic 1993; Olsson y Chester 1995; Stroncek *et al.* 1995; Ugozzoli y Wallace 1992; Chang *et al.* 1992). Grunnet y su equipo (Grunnet *et al.* 1994) analizaron 300 individuos de distintos fenotipos, y en general se encontró correlación con lo descrito, aunque se ha planteado la existencia de polimorfismos en la población que no se detectan con este método. Recientemente un grupo japonés publicó la detección y caracterización de este tipo de alelos con la técnica de SSCP (Ogasawara *et al.* 1996), con lo que inicia poco a poco el camino hacia la caracterización molecular de los polimorfismos alélicos en las poblaciones.

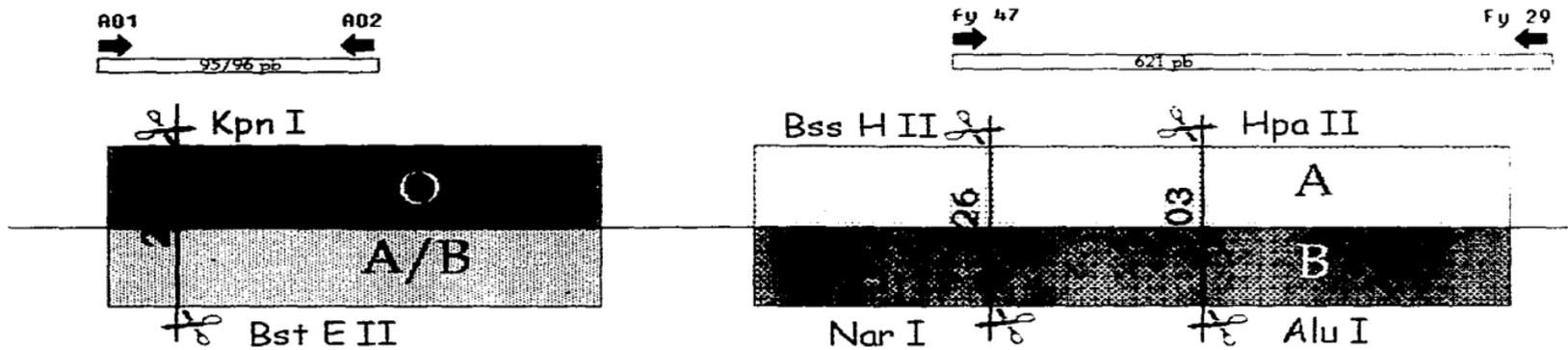


FIGURA 5 Estrategia molecular para la genotipificación del sistema ABO. Se indican los sitios de restricción alelo específicos que se han reportado para los exones VI y VII del gen. Hacia arriba se muestran algunos fragmentos amplificados en este trabajo, indicando el nombre de los iniciadores (flechas) utilizados.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base a la evidencia teórica que propone considerar dos genes ligados, se planteó como posibilidad la existencia de alelos recesivos en individuos AB (siendo esto imposible de acuerdo con la teoría de Bernstein), y fue necesario plantear y desarrollar una estrategia experimental del problema que resolviera de manera sencilla esta cuestión.

Como se mencionó en la introducción, la delección del gen para la glicosiltransferasa O en la posición 261 crea un sitio de reconocimiento para la enzima KpnI. Esta característica nos permitió buscar alelos del tipo O (recesivos) en individuos AB, y nos permitió, además, la separación de este alelo recesivo para analizar por secuenciación directa los alelos dominantes que no son cortados con esta enzima, y de esta forma evaluar si es posible la existencia de individuos *trans* AB con alelos recesivos.

III HIPÓTESIS

La falta de precisión en las fórmulas de Bernstein se debe a la existencia de dos genes ligados en el sistema ABO. Por lo tanto, si existen dos genes ligados entonces se detectarán alelos recesivos en individuos AB.

I. HIPÓTESIS ALTERNATIVA

La falta de precisión en las fórmulas de Bernstein se debe a la existencia de alelos del tipo *cis*-AB (representados en las nuevas fórmulas por la variable "s").

IV OBJETIVOS

1 GENERAL.

Analizar molecularmente el gen que codifica para el grupo histo-sanguíneo ABO en individuos AB con el fin de aportar evidencias que permitan evaluar si se trata de dos genes ligados.

2 PARTICULARES

- Implementar la técnica de PCR reportada para genotipificar molecularmente los grupos sanguíneos (Yamamoto *et al* 1990b, Chang *et al* 1992, O Keele y Dovrovik 1993)
- Analizar el sitio 261 con estas técnicas para buscar alelos recesivos en individuos tipificados como AB
- Implementar una estrategia sencilla que permita demostrar molecularmente la existencia de individuos *trans* AB que contengan alelos recesivos

V MATERIAL Y MÉTODOS

1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se colectaron 26 muestras de sangre periférica de distintos fenotipos, (15 AB, 3 A, 2 B Y 60), de donadores del Centro Medico Siglo XXI y de algunos donadores del laboratorio.

1.1 FENOTIPIFICACION

La sangre se clasificó mediante el método de aglutinación de eritrocitos, utilizando anticuerpos monoclonales anti-A, anti-B y anti-AB de ratón (Sanofi Pasteur) con la metodología siguiente

Se preparó una suspensión del 3 al 5% (V/V) de sangre en solución salina isotónica (0.85%). Se depositó en tubos eppendorf una gota del antisuero apropiado y se añadió una gota de suspensión de sangre en cada tubo. Se homogeneizó la mezcla con un movimiento de agitación suave y se centrifugó durante 1 minuto a 2000 rpm. El depósito de centrifugación de cada uno de los tubos se resuspendió y se examinó macroscópicamente si existía aglutinación: si el depósito de centrifugación persiste se considera un resultado positivo pues indica la presencia del antígeno correspondiente. Si no persiste, el resultado es negativo, pues no ha sido detectada la presencia del antígeno correspondiente

1.2 EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

El rendimiento de DNA con esta metodología es de aprox. 10-30 mg de DNA por cada mililitro de sangre y se obtiene sin degradación (Kempter 1992). Se tomaron 15ml de sangre y se mezclaron con 2.5 ml de EDTA 0.5% (pH=7.6) para evitar su coagulación (no se usó heparina porque inhibe enzimas de restricción y a la Taq polimerasa). Se dividió la muestra en dos y se centrifugó durante 10 minutos a 3000rpm. A partir de aquí las muestras se trabajaron por separado y de forma idéntica. Se tomó con una pipeta Pasteur la capa de leucocitos (capa blanca) que se forma en la interfase entre el suero y los eritrocitos, sin importar que haya eritrocitos contaminantes. Se pasó la capa a un tubo limpio y esterilizado (Corex, Falcon). Se agregó al tubo de 30 a 40 ml de solución RCLB (Tris pH7.6 10mM, MgCl₂ 5mM, NaCl 10mM). El tubo se cubrió con parafilm y se agitó fuertemente. Se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. y se eliminó el sobrenadante, de preferencia usando vacío (es necesario tener cuidado de no eliminar la pastilla de leucocitos que queda en el fondo del tubo). Se repitieron los pasos de lavado con

RCl.B al menos dos veces más, hasta que la pastilla de leucocitos estuvo blanca. Esta pastilla se puede guardar por una semana a -20°C después de los lavados, y para guardarla debe estar totalmente seca. Se resuspendió la pastilla en 886 ml de NaCl 5 mM agitando fuertemente con una pipeta Gilson de 1000 μl y se pasó la muestra a un tubo eppendorf. Se agregó al tubo 46 ml de SDS al 10% y se agitó con fuerza. Se agregaron 308 ml de NaCl saturado al tubo y se agitó otra vez el tubo (estas agitaciones son necesarias e importantes). Se centrifugó el tubo 30 minutos a 15krpm y se tomó el sobrenadante para realizar con él 2 extracciones fenólicas (25:24:1 fenol:cloroformo:isoamilico). El DNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol o 2 volúmenes de etanol (no es necesario agregar sal en la precipitación).

1.3 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se prepararon diluciones de las muestras de DNA u oligonucleótidos (generalmente 1:100, aunque dependía de la cantidad de muestra que había). Se hicieron 2 mediciones por espectrofotometría de cada muestra a 260 y 280 nm. Una densidad óptica equivalente a 1 a 260 nm corresponde aproximadamente a (Maniatis *et al.* 82):

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de doble cadena.

40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de cadena sencilla y RNA.

Se obtuvo la relación entre ambas lecturas (260/280), lo que provee una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de DNA y RNA tienen una relación entre sus densidades ópticas 260/280 de 1.8 y 2.0 respectivamente. Si hay contaminación con proteínas o fenol la relación será significativamente menor que los valores anteriores y no puede hacerse una cuantificación exacta.

Se analizó también la concentración y calidad del DNA en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DEL GEN ABO MEDIANTE EL MÉTODO DE PCR

Todos los oligonucleótidos utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron sintetizados por la Unidad de Análisis de Aminoácidos y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Las condiciones reportadas en los artículos no siempre son las óptimas, ya que esta técnica es muy sensible y depende de una gran cantidad de variables, por lo que es necesario que en cada laboratorio se estandaricen las condiciones de amplificación.

Las condiciones iniciales que se utilizaron para la estandarización son las siguientes (Rofls *et al.* 1992): 1 unidad de Taq Polimerasa y su buffer correspondiente, 100 a 200 μM dNTPs, 0.5 μM de oligonucleótidos, 100 a 500 ng de DNA y de 0.5 a 5mM para encontrar el óptimo de magnesio.

2.2 AMPLIFICACIÓN DEL SITIO 261

2.2.1 Amplificación estándar

Se utilizaron los oligonucleótidos reportados por O Keefe y Dovrovik (O Keefe y Dovrovik 1993).

Con estos oligonucleótidos se obtuvo una amplificación más eficiente, por lo que no fue necesario utilizar marca radioactiva.

AO1 5'-TGACACCGTGGAAAGGATGTCCTCGT-3' (Situado entre las bases 231 a 255 de la cadena sentido del exón VI).

AO2 5'-TGAAGTCTCGTTGAGGATGT-3' (Situado entre las bases 280 a 303 de la cadena antisentido en el exón VI del gen).

Ambos amplifican un fragmento de 99 ó 100 pares de bases, que contiene el sitio 261 del exón VI del gen. En el caso de los alelos O se obtiene una banda de 70 pb al digerir este fragmento con la enzima KpnI.

El DNA (de 100 a 500 ng dependiendo de la calidad de la muestra) fue amplificado en 50 μl de una solución que contiene: 1.5 mM de MgCl_2 , 25 pmoles de cada oligonucleótido para una concentración final de 0.5 μM , 200 μM de dideoxinucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Gibco BRL), 1 unidad de Taq polimerasa (Pelquin Elmer Cetus) y su buffer correspondiente. Se utilizó el termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus) con una desnaturalización inicial de 5 minutos ("Hot Start"), seguida de 35 ciclos de reacción: desnaturalización a 94 ° por 24 segundos, alineamiento a 60° por 30 segundos y extensión a 72° por 1 minuto y 50 segundos, con una extensión final de 72 ° por 2 minutos. Las muestras se guardaron a -20° C para su análisis posterior.

2.2.2 Amplificación con marca radioactiva

Para estos ensayos se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Chang y colaboradores (Chang *et al.* 1992)

INX40 5'-AATGTCACAGTC ACTCTCCGC-3' (ubicado del nucleótido 41 al 60 del antisentido en el intrón F del gen)

cDNA233 5'-CACCGTCGGAACGATGTCCTC-3' (ubicado en los nucleótidos 233 a 252 de la cadena sentido del exón b)

Ambos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 199 o 200 pares de bases que contiene el sitio 26I del exón VI. En el caso de un alelo O se obtiene una banda de 171 pares de bases al digerir este fragmento con la enzima KpnI

El DNA (de 100 a 500 ng) fue amplificado en 50 μ l de una solución que contiene 1.5 mM de MgCl₂, 125 μ M de dideoxinucleótidos (dATP, dGTP y dTTP o dCTP, dGTP y dTTP) dependiendo del nucleótido marcado que se utilice), 1 μ Ci de α -³²P-dATP o α -³²P-dCTP (Amersham), 0.5 μ M de oligonucleótidos (INX40 y cDNA233) y 1 unidad de Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus) y su buffer correspondiente. El DNA se amplificó en un termociclador de PCR (Gen Amp PCR System 9600 Perkin-Elmer) utilizando el método de cera de parafina (*AmpliVax™ PCR Gems* Perkin Elmer Cetus #N808-0100) para evitar amplificaciones inespecíficas. La solución se sometió a 25 ciclos de incubación: 94 grados por 2 minutos para desnaturalizar la doble cadena de DNA, 58 grados por 2 minutos para alinear los oligonucleótidos y 72 grados por 3 minutos para la extensión de las cadenas. Las muestras se guardaron a -20° C para su análisis posterior.

2.3 AMPLIFICACIÓN DEL SITIO 703

Se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Yamamoto y Hakomori (Yamamoto y Hakomori 1990)

Fy-29 5'-CGTTCGCTAAAACCAAG-3' (ubicado en la cadena antisentido del último intrón del gen).

Fy-47 5'-TGCTGGAGGTGCCCGCCTAC-3' (ubicado en las bases 512 a 531 de la cadena sentido del exón VII).

Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 621 pares de bases que contiene el sitio 703 del exón VII del gen. En este segmento del gene existen varios sitios Hpa II además del característico de los alelos A. Por esta razón el fragmento obtenido por PCR se digiere en varios pedazos (independientemente del genotipo de la muestra), en todos los casos debe desaparecer el fragmento de 621 pb y se obtiene una banda de 309 pares de bases, lo que sirve como indicador

de una digestión completa. Si existe el sitio HpaII en el nucleótido 703 característico de los alelos A, en el gel aparecerá una banda de 188 pares de bases; si este sitio no está presente en la muestra analizada, se obtendrá una banda de 205 pares de bases que no fue digerida por esta enzima.

El DNA (de 100 a 500 ng) fue amplificado en 50 µl de una solución que contiene 1.5 mM de MgCl₂, 25 pmoles de cada oligonucleótido para una concentración final de 0.5 µM, 200 µM de dideoxynucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Gibco BRL), 1 unidad de Taq polimerasa (Pelqin Elmer Cetus) y su buffer correspondiente y la reacción se sometió a 28 ciclos: desnaturalización a 94° por 30 segundos, alineamiento a 57° por 30 segundos y extensión a 72° por 20 segundos, con una extensión final de 72° por 7 minutos. Las muestras se guardaron a -20° C para su análisis posterior.

3. GENOTIPIFICACIÓN

3.1 DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

En 30 µl totales de reacción se utilizaron de 15 a 30 µl de la reacción de PCR que contiene el fragmento a digerir (sin ninguna preparación previa), el buffer correspondiente y 4 unidades de la enzima KpnI (Amersham) o la enzima Hpa II (Gibco BRL), según sea el caso.

En todos los ensayos de restricción con KpnI se utilizó como control a un individuo fenotipificado como O para asegurar la digestión completa de los alelos que contengan el sitio de restricción correspondiente. Se dejó la reacción por 1 hora a 37°C, y se utilizaron los 15 ó 30 µl de la reacción para correrlos en gel de acrilamida al 6%.

Este mismo procedimiento se utilizó para todas las amplificaciones.

No es necesaria ninguna preparación previa del producto amplificado por PCR ya que en la reacción de PCR se utilizan concentraciones tan bajas de sales que no afectan las reacciones de restricción (Rolfs *et al.* 1992).

3.2 GELES DE ACRILAMIDA

Para visualizar los productos de PCR y los de digestión se prepararon 10 ml de acrilamida 6% en TBE1X (0.089M Tris-base, 0.089M de ácido bórico y 0.002M de EDTA) a los que se añadieron 40 µl de TMED (Biorad) y 120 µl de Persulfato de Amonio al 10% para polimerizarla. Se pasó rápidamente la acrilamida sobre un vidrio de 7.5cm x 5cm al cual se le colocó un peine sostenido por pinzas (la

distancia entre el peine y el vidrio será aproximadamente el grosor de una hoja de papel). La acrilamida no se derrama debido a la tensión superficial que genera el líquido. Se dejó polimerizar y se colocó el gel en TBE 1x en la cámara de electroforesis. Se cargaron las muestras de DNA en los pozos añadiendo por cada muestra de 1 a 2µl de colorante indicador de corrida (azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.02% y Glicerol 50%). Para las muestras de 30 µl se utilizaron pozos grandes. Se corrió en todos los casos un marcador de peso molecular (ladder 100pb Gibco BRL) para determinar el tamaño de las bandas. Para teñir el gel se sumergió éste por 15 minutos en una solución de bromuro de etidio 0.2 µg/ml.

El mismo procedimiento puede utilizarse con 80 ml de solución de acrilamida. (para polimerizarla se utilizan 600 µl de persulfato de amonio al 10% y 80 µl de TEMED) en un vidrio de 15cm x 20 cm.

Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. Cuando se corrieron productos radioactivos el gel se secó y se sometió a autorradiografía.

4. SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR EN EL EXÓN VI

4.1 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS.

Los 30 µl de la digestión con KpnI se corrieron por una hora en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en TBE 1x con 1µg de Bromuro de etidio por cada 10 ml y se corrió además un marcador de peso molecular (ladder 100pb Gibco BRL). Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta de onda larga para no dañar el DNA. Se cortó con un bisturí la banda de 100 pares de bases que no ha sido digerida por la enzima KpnI y se puso el fragmento en un eppendorf de 1.5ml. Se calentó este tubo a 65-68 grados para derretir la agarosa; se aforó a 450 µl con agua desionizada y estéril y se le agregó 1 µg de tRNA. Se añadió un volumen de Fenol (450 µl). Es importante que el fenol esté a temperatura ambiente para extraer la mayor cantidad posible de agarosa. Se dejó a 65 grados por 30 segundos y se agitó fuertemente. Se centrifugó durante 3 minutos a 14 000 rpm; se recuperó el sobrenadante en otro tubo eppendorf y se realizaron 2 limpiezas con 1 volumen de cloroformo:isoamílico 24:1 (450 µl); se agitó fuertemente con Vortex y se centrifugó otra vez durante 3 minutos a 14000rpm. El sobrenadante se dividió en dos tubos eppendorf de 1.5ml. Se agregó a cada tubo 1 volumen de acetato de amonio 7.5 M (225 µl) y 2 ½ volúmenes de etanol absoluto (562.5 µl) y se dejó precipitar el DNA por 15 minutos en hielo seco.

Se centrifugó durante 5 minutos a 14000rpm y la pastilla de DNA se lavó 2 veces con etanol al 70%. Hay que centrifugar después de cada lavado porque la pastilla es muy pequeña y puede desprenderse del fondo. Se dejó el tubo abierto hasta que se evaporó el etanol, y se resuspendió la pastilla en 20 μ l de agua.

Se cuantificó la cantidad de DNA obtenido con el método ya descrito.

4.2 SECUENCIACIÓN DIRECTA DE FRAGMENTOS DE PCR

En cada uno de los pasos es importante homogeneizar todo lo que se utilice. Para esta reacción se utilizó el Kit de secuenciación de productos de Perkin Elmer (AmpliCycle sequencing Kit N808-0175).

En 10 μ l se diluyeron de 50 a 100 ng del alelo dominante a secuenciar junto con 60 pmoles del oligonucleótido AO1 (diluir de preferencia con agua estéril y desionizada); la muestra se desnaturalizó durante 2 minutos a 96 grados en un tubo eppendorf cerrado. En otro tubo se mezclaron en 30 μ l totales ("mix"): los 10 μ l que se desnaturalizaron en el paso anterior, 1U de Taq Polimerasa (Perkin Elmer), 4 μ l del buffer correspondiente al Kit y 2 μ l de α 32 P dATP o α 32 P dCTP (Amersham).

En 4 tubos diferentes para PCR (perkin elmer) marcados A, G, C o T se agregaron 2 μ l de la solución con dideoxinucleótidos que correspondan, y a cada tubo se le añadieron 6 μ l del "mix". El fragmento se secuenció en un termociclador (modelo 9600, Perkin Elmer) con una desnaturalización inicial a 96 grados durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 96 grados por 30 segundos, alineamiento a 55 grados por 30 segundos y extensión a 72 grados por 30 segundos. Al terminar la reacción, se agregó a cada tubo 4 μ l de solución STOP del Kit.

4.3 GEL DE SECUENCIA

Se preparó un gel de secuencia con una solución de acrilamida-bisacrilamida al 8% con urea 7M en TBE 1x. El gel se precurrió por 20 a 45 minutos a 1800 volts, en un rango de 50 a 75 Watts.

Las muestras se desnaturalizaron por 3 minutos en el termociclador. Se corrieron 3 μ l de cada reacción por 1 hora en el orden: A, G, C, T. El gel se seca y se somete a autorradiografía.

VI RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre periférica se procesaron como se describe en materiales y métodos para la extracción y cuantificación del DNA. Se colectaron principalmente aquellas muestras que fueron fenotipificadas como AB, con el fin de analizar en ellas la posible existencia de alelos recesivos. De las 26 muestras colectadas se obtuvieron 15 individuos AB, 3 individuos A, 2 individuos B y 6 O.

2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Se probaron distintas condiciones de reacción para la amplificación de algunos sitios del gen, hasta obtener la banda del tamaño esperado.

Se muestra un ejemplo del proceso de estandarización de la técnica de PCR en el sitio 703, en el que se utilizan distintas concentraciones de cloruro de magnesio en la reacción hasta encontrar la concentración en la que se obtiene un número menor de bandas inespecíficas (2 mM). Se probaron otras concentraciones de enzima, nucleótidos y de oligonucleótidos, sin lograr desaparecer las bandas inespecíficas (datos no mostrados). En el primer carril puede verse una reacción amplificada en un número menor de ciclos (los últimos carriles se sometieron a 35 ciclos, el primero a 28) en el que se aumentó la concentración de nucleótidos, con lo que se logra que la banda inespecífica desaparezca. En estas condiciones se efectuaron las reacciones de amplificación para este sitio (descritas en materiales y métodos).

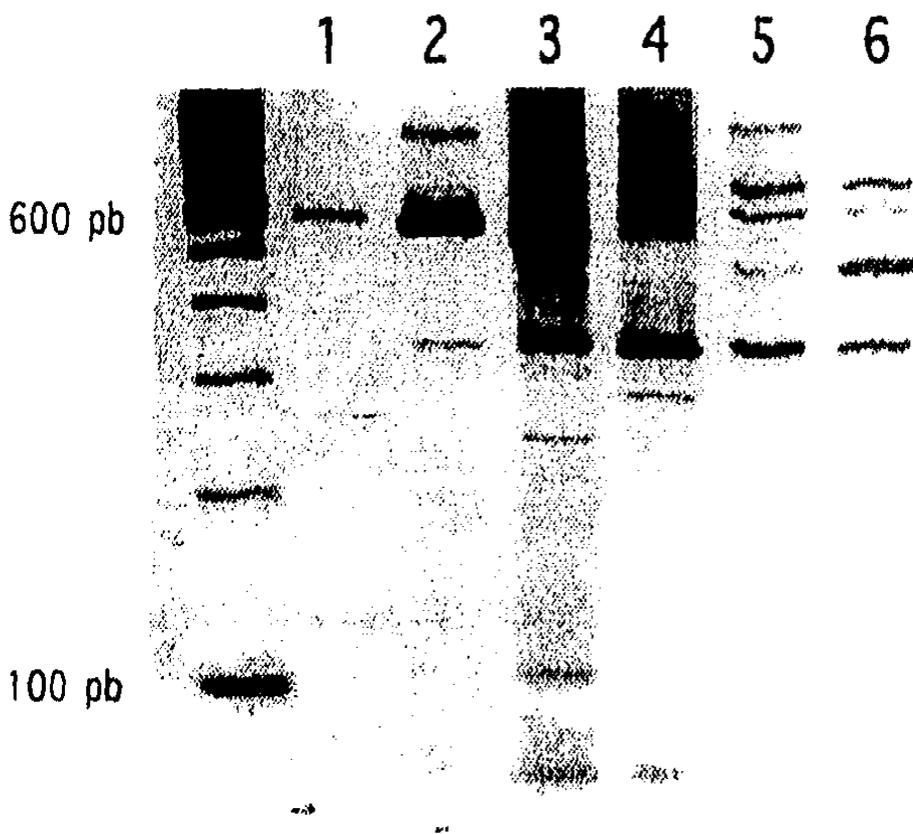


FIGURA 1. Estandarización de la técnica de PCR en el exón VII. En los carriles 3 al 6 se utilizó una concentración final de 250 μ M de dioxinucleótidos (dNTPs) y distintas concentraciones de cloruro de magnesio (MgCl) de 4mM, 3mM, 2mM y 1mM respectivamente. Los carriles 1 y 2 corresponden a la misma reacción (2mM MgCl y 500 mM dNTPs) sometida a distintos ciclos (35 para el carril 2, y 28 para el carril 1).

3. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR

3.1. TÉCNICAS PARA EL SITIO 261

Se amplificó por PCR el DNA genómico de 15 individuos fenotipificados como AB, incluidos en 2 casos a sus familias (tal como se describe en materiales y métodos) y se obtuvieron fragmentos que contienen el sitio 261 del gen del grupo histo-sanguíneo ABC. Se utilizaron dos técnicas con dos pares de oligonucleótidos diferentes (descritos en materiales y métodos); ambos flanquean el sitio 261. Esta posición en los alelos O se caracteriza por una deleción que crea un sitio de restricción para la enzima KpnI, lo cual nos permitió buscar alelos O en los individuos AB que se analizaron.

Los dos métodos utilizados para amplificar el sitio 261 por PCR arrojaron resultados similares. En ambos métodos se obtuvo la banda esperada según lo reportado: 199-200 pares de bases para los oligonucleótidos INX40 y cDNA 333 (Chang *et al* 1992) y de 99-100 pares de bases para los oligonucleótidos AO1 y AO2 (O'Keefe y Duvrovik 1993), como puede verse en las figuras 2 y 3, lo que indica una amplificación específica del exón VI que contiene el sitio 261 que nos interesa.

No se utilizaron los oligonucleótidos que para esta región propone Yamamoto (Yamamoto *et al.* 1990b) ya que se ubican en regiones de los intrones que no están reportadas, además de la inconveniencia de visualizar los fragmentos con Southern Blott.

El primer par de oligonucleótidos que se utilizó tiene la desventaja del marcaje con fósforo radioactivo, y la ventaja sobre la técnica reportada por Yamamoto, de que ahorra los pasos del Southern Blott, haciendo la amplificación, la digestión y el análisis del fragmento directamente, como se describe en materiales y métodos. Con el segundo par de oligonucleótidos se obtuvo una mejor amplificación y no fue necesario utilizar marcaje radioactivo para visualizar los alelos recesivos cortados con KpnI, por lo que la mayor parte de las genotipificaciones se hicieron con esta segunda técnica.

Al digerir con la enzima KpnI el producto de PCR obtenido por los dos métodos, fue posible la detección en gel del alelo recesivo O, como puede verse en todas las restricciones de individuos fenotipificados como O (figuras 2, 3 y 5): en las figuras se observa una banda de menor tamaño para los oligos INX40 y cDNA y de 70 pb para AO1/AO2, lo que indica la restricción completa del fragmento en el sitio 261. Cuando se obtiene esta banda significa que la enzima ha cortado en el sitio de restricción característico de algunos alelos O. Estas digestiones sirvieron como controles de restricción: si la restricción de estas muestras es completa, significa que la enzima funcionó de manera correcta.

En todos los individuos analizados que fueron fenotipificados como O se obtuvo el corte completo del fragmento amplificado por PCR, por lo que no se detectaron individuos del tipo O².

Se muestran además otros fenotipos A o B en los que se detectaron alelos recesivos (figuras 2 y 3) al obtener las bandas de menor tamaño ya descritas, y como era de esperarse se obtienen fragmentos que no son cortados; estos alelos (A o B) corresponden a las bandas de 100 ó 200 pares de bases que no tienen este sitio de restricción para KpnI. Todos los individuos A o B analizados en este sitio resultaron portadores de un alelo con delección en 261.

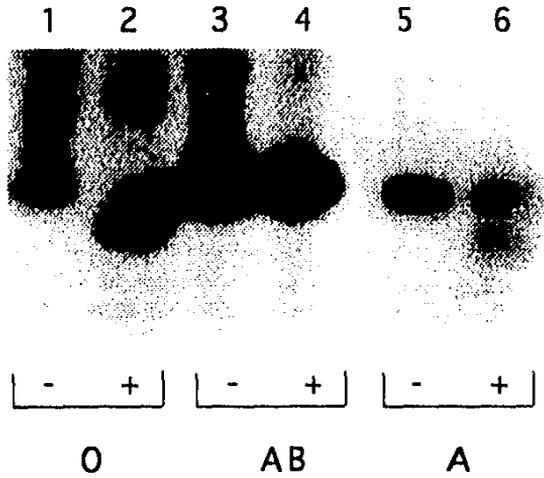


FIGURA 2. Autorradiografía de la reacción PCR con los oligonucleótidos inX40 y cDNA333 (con (+) y sin (-) KpnI)

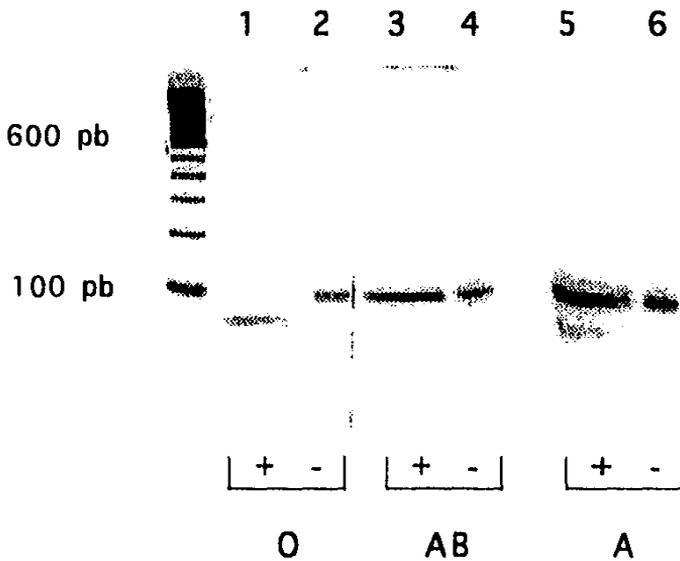


FIGURA 3. Amplificación de distintos fenotipos con (+) y sin (-) KpnI utilizando los oligonucleótidos AO1/AO2.

3.2. ANALISIS DE INDIVIDUOS AB EN EL SITIO 261.

3.2.1. Casos con análisis familiar

Se realizó un estudio familiar en dos de los 15 casos AB (figura 4 a y b)

En las dos familias, los padres fueron fenotipificados como A uno y B el otro. Todos los padres analizados resultaron portadores de un alelo recesivo (los individuos de cada familia se indican en la figura). En la primera familia (figura 4a) es muy claro cómo los hermanos del individuo AB heredan los alelos O de ambos padres. En ninguno de estos dos casos AB se encontraron alelos recesivos

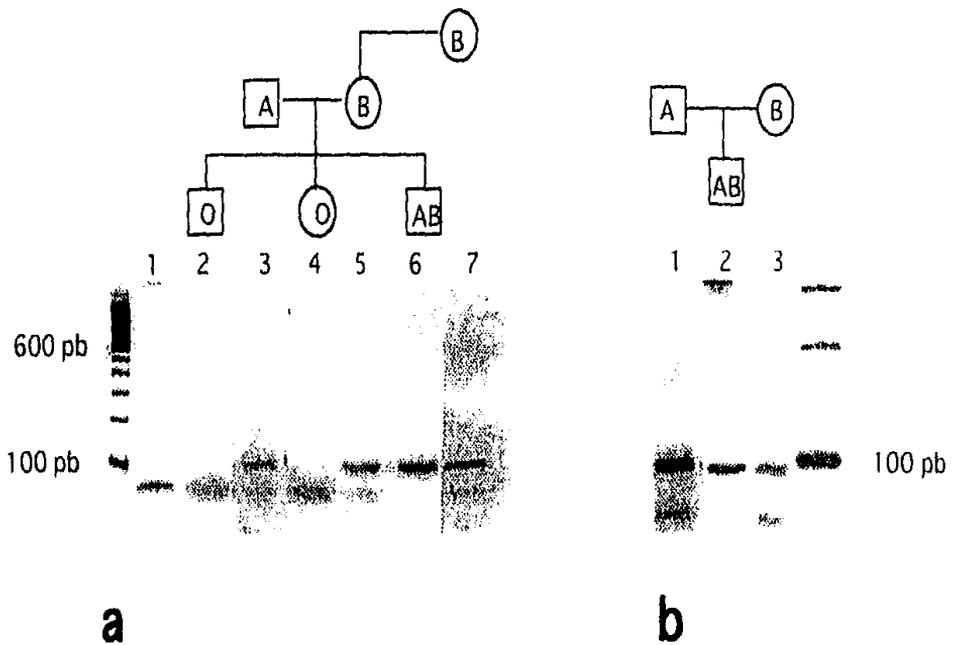


FIGURA 4. Análisis familiares en el sitio 261. En todos los carriles se muestra el producto de la digestión con la enzima KpnI.

3.2.2. Casos aislados

De las 15 muestras AB se obtuvo corte parcial sólo en un caso (figura 5, carril 2). Este caso podría ser clave si pudiera probarse que posee los dos alelos, tanto A, como B, además del alelo O que se detectó con este ensayo.

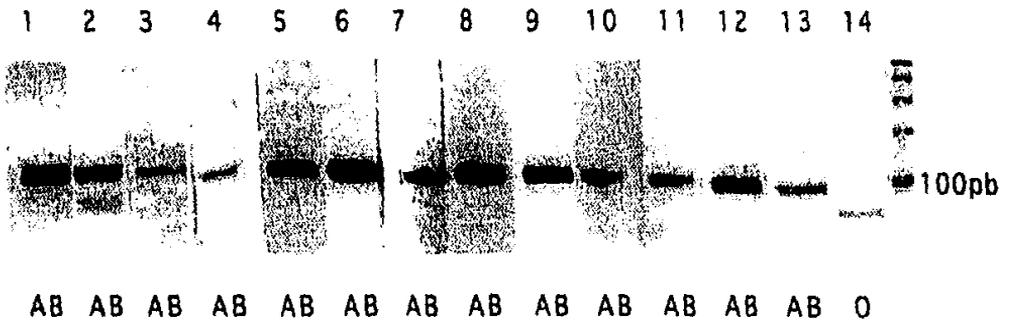


FIGURA 5. Análisis del sitio 261 en individuos AB. En todos los carriles se muestra la digestión con la enzima KpnI.

3.2.3. Secuenciación de alelos dominantes

Se diseñó la estrategia de separar en gel de agarosa los alelos dominantes que no han sido cortados de aquellos alelos recesivos que si se cortaron con la enzima KpnI. Una vez separados, la banda de mayor tamaño (alelos dominantes) se purificó y se secuenció con el Kit de secuenciación de productos de PCR (Perkin Elmer). Esta técnica se aplicó al individuo AB que posee un alelo recesivo, a un individuo AB que no presentó ningún corte, y a un individuo B heterocigoto.

Al utilizar esta técnica se demostró que con ella es posible detectar los dos alelos A, y B, como en el caso del individuo AB en el que no se obtuvo corte con la enzima KpnI (figura 6a). La secuencia de ambos alelos aparece como una banda doble que indica la presencia de adenina en el sitio 297, característica de los alelos A, y de guanina en este mismo sitio, característica de los alelos B, según lo reportado (Yamamoto *et al.* 1990b). En el caso del individuo B (figura 6b), la secuencia coincide con la reportada en el sitio 297 para los alelos B.

La secuenciación de los alelos dominantes del individuo fenotipificado como AB, en el que se encontraron alelos recesivos, demostró que no se trata de un individuo *trans*-AB como se esperaba (Figura 6c), sino que el individuo posee un alelo similar a los alelos A en la posición 297.

Esta técnica tiene la ventaja de que es un método rápido y sencillo en el que no es necesaria la clonación del fragmento, y puede utilizarse para el análisis de alelos dominantes en esta región del exón VI.

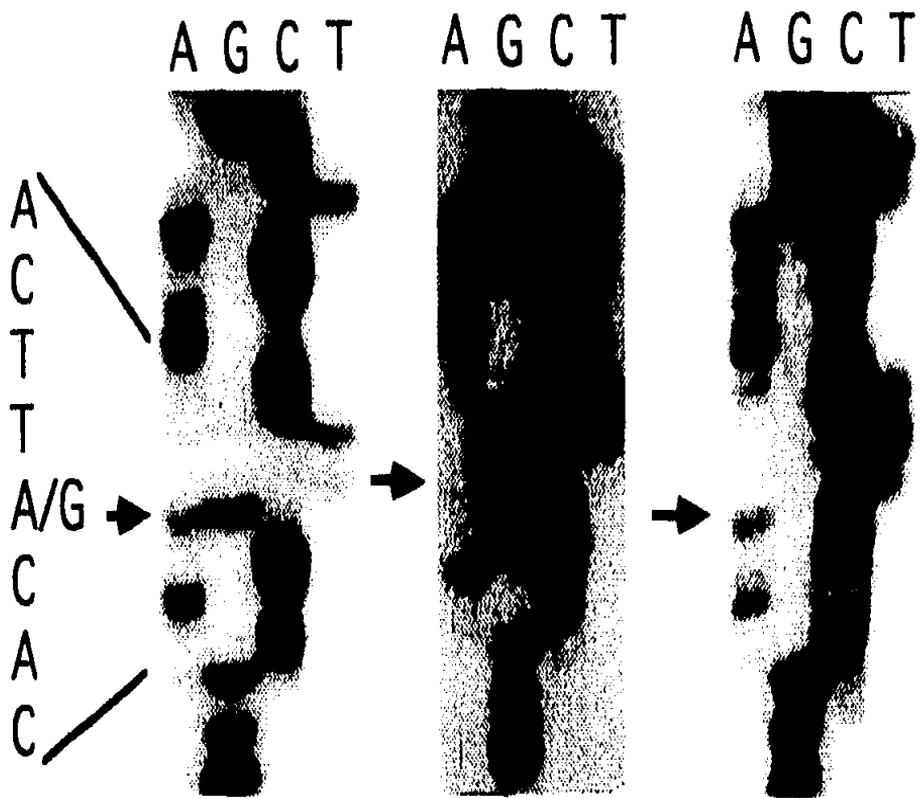


FIGURA 6. Secuenciación en el sitio 297 (flecha) del exón VI en un individuo AB (a), en uno B (b) y en el individuo AB en el que se obtuvo corte con KpnI (c).

3.3. REGIÓN 703

El individuo AB, al que se le encontraron alelos recesivos, fue tipificado como A en esta posición como puede verse en la figura 7, carril 4, que muestra la digestión con HpaII de los fragmentos amplificados en la región 703. Se observa un solo fragmento de 188 pares de bases, lo que indica la presencia del sitio de restricción para HpaII, característico de los alelos A. Este sitio se utilizó de apoyo para los datos, como un método para tipificar con mayor certeza el genotipo de este individuo en otra zona del gen, de acuerdo con los reportes de genotipificación publicados (Yamamoto *et al.* 1990b).

Es importante señalar que la reacción de PCR amplifica todos los alelos presentes; en este caso sabemos que existe un alelo O para este individuo, detectado en el análisis del sitio 261, y con esta información podemos afirmar que este alelo O en el sitio 703 posee una guanina. Para el otro alelo sabemos que en este sitio también posee una guanina, por la digestión total de la muestra, y en el sitio 297 posee una adenina. Si se hubiera obtenido una digestión parcial para la muestra, indicando la presencia de adenina (característica de los alelos B), además de la guanina característica de los alelos A, no se podría afirmar con certeza a cuál de los alelos corresponde cada sitio; las estrategias para lograr diferenciar uno u otro se comentarán en la discusión de resultados.

La restricción fue completa ya que se obtuvo, en todos los casos, la banda de 300 pares de bases esperada, como se describe en materiales y métodos. Se analizó además a un individuo fenotipificado como O, a uno como A y a otro como B, y en todos los casos se encontró correlación entre el fenotipo y la genotipificación molecular de este sitio (figura 7, carriles 1, 2, 3 y 5).

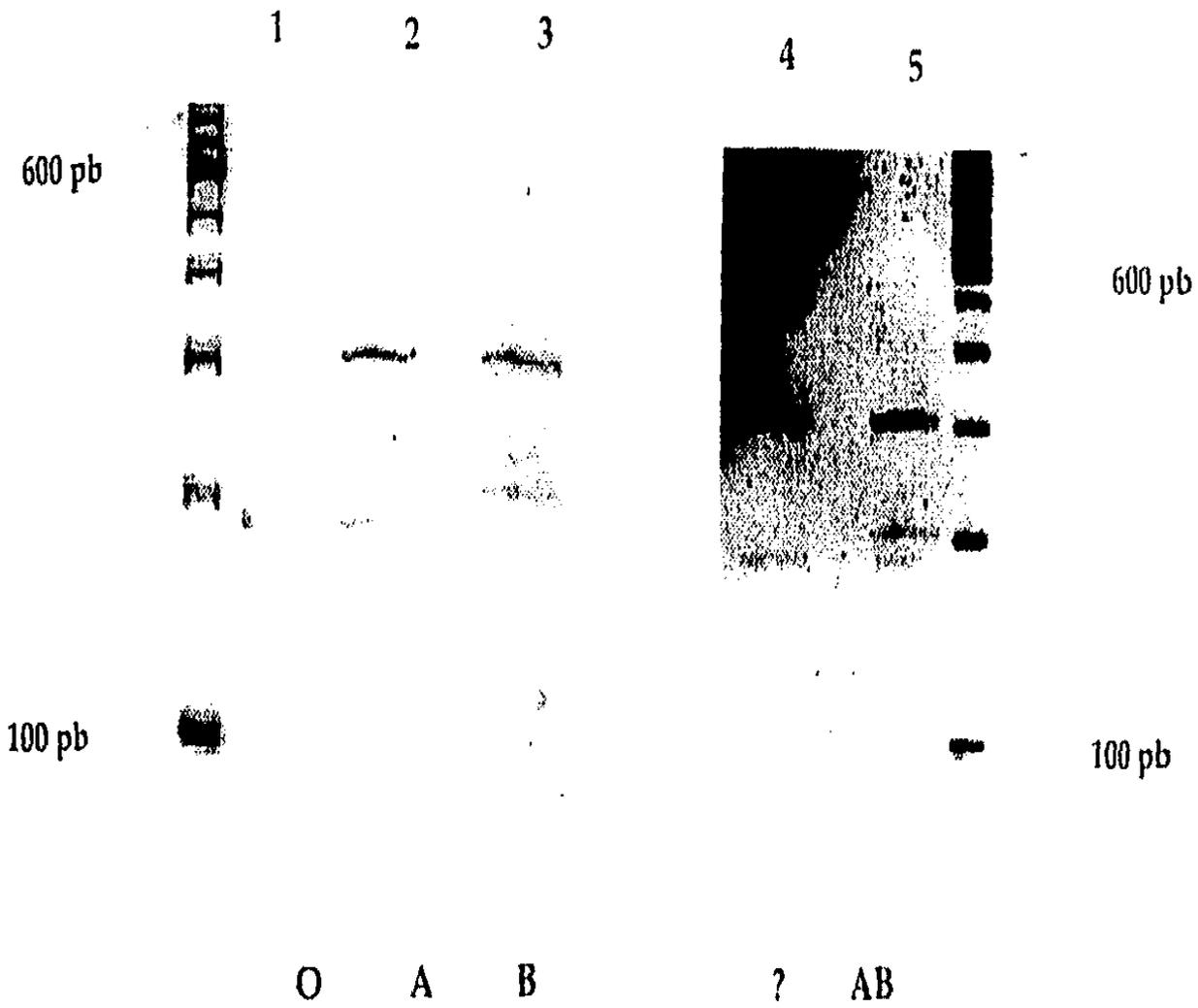


FIGURA 7. Análisis por PCR del sitio 703. En todos los carriles se muestra la digestión con la enzima *HpaII*.

VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. LA TÉCNICA DE PCR Y SUS APLICACIONES

1.1 APLICACIONES DEL MÉTODO DE SECUENCIACIÓN

Una desventaja del método de PCR cuando se trabaja con genes polimórficos es la dificultad para distinguir un alelo del otro al analizar los fragmentos obtenidos de la amplificación.

En esta tesis se propone un método de separación de alelos para su caracterización por secuenciación en el exón VI. Esto permite detectar polimorfismos en esta región, y caracterizarlos a nivel poblacional. La desventaja principal del método propuesto es que no funciona para la caracterización del alelo completo, y ése ha sido uno de los problemas principales a los que se han enfrentado los investigadores del área molecular del sistema ABO.

Para los sitios característicos de cada alelo en otros exones, diferentes al exón VI, no es posible utilizar la estrategia de secuenciación planteada en esta tesis, ya que es imposible distinguir a qué alelo pertenecen los fragmentos amplificados por PCR. Recordemos que la manera de distinguir entre un alelo dominante y uno recesivo es por medio del análisis del sitio 261 (en el exón VI) que tiene la delección (y esto únicamente para los casos de los alelos tipo O que tengan este sitio), y lo que se ha reportado es que el alelo tipo O más común en la población es el que tiene una secuencia (a excepción de esta delección) idéntica al alelo A, por lo que no existe otro sitio característico de estos alelos recesivos que se localice en el exón VII (que contiene codificada la mayor parte de la proteína). La única manera de asegurar que estos sitios del exón VII corresponden a uno o al otro alelo, es obteniendo el cDNA correspondiente a cada alelo (por lo tanto, es necesario un cultivo celular o un tejido para obtener los RNA mensajeros) y amplificar estas clonas como ha hecho Yamamoto con los alelos principales A¹, B y O¹ (Yamamoto *et al.* 1990a, Yamamoto *et al.* 1990b).

1.2 APLICACIONES COMO MÉTODO DE TIPIFICACIÓN EN HOSPITALES

En un principio se pensó en una aplicación inmediata de esta técnica como una herramienta para la tipificación de los grupos sanguíneos en hospitales en los casos poco claros, pero se le hacen algunas objeciones:

1. El costo de la técnica es muy alto para la gran cantidad de muestras que se manejan en los hospitales. La estandarización de la técnica no es tarea fácil y

requiere también un alto costo para la institución. Es necesario esperar al desarrollo de nuevas estrategias que permitan que esta técnica sea un método más sencillo y más accesible, de forma que la estandarización no sea tan laboriosa para los genomas humanos.

2. Por otro lado es necesario mayor conocimiento de los subtipos sanguíneos para poder analizar otros sitios que podrían ser claves para una genotipificación más exacta. La mayor parte de los estudios se ha realizado sobre los dos últimos exones del gen, y la estructura molecular de los primeros exones es poco conocida para muchos de los subtipos. También se conoce poco sobre los subtipos que existen en cada país, que seguramente poseen variaciones características de la zona, dependiendo del origen de la población estudiada.

Estas variaciones no se detectan con los métodos de genotipificación hasta ahora reportados. Para el análisis de la secuencia del exón VI puede utilizarse la técnica reportada en esta tesis, que es más sencilla y rápida que la clonación y posterior secuenciación de los fragmentos. La aplicación de esta técnica en poblaciones mayores podría aportar datos interesantes –hay que recordar que ya se ha reportado la existencia de al menos cuatro productos distintos de individuos O por medio de electroforesis desnaturizante de los productos de PCR de este exón (Johnson y Hopkinson 1992)--, y más recientemente la secuenciación de más alelos polimórficos en la población japonesa (Ogasawara *et al.* 1996).

2. EL PROYECTO ABO

Esta segunda parte de la discusión la dividí de acuerdo al desarrollo del proyecto: desde las primeras ideas que se tuvieron cuando el proyecto comenzaba, los resultados experimentales, y finalmente las ideas que se han discutido más recientemente.

Cuando se inició el proyecto de esta tesis en 1992, los únicos reportes disponibles sobre la estructura molecular del gen ABO eran aquellos en los que se había clonado y caracterizado este gen (Yamamoto y Hakomori 1990; Yamamoto *et al.* 1990a; Yamamoto *et al.* 1990b; Yamamoto *et al.* 1991; Yamamoto *et al.* 1992). Conforme se desarrolló el proyecto fueron apareciendo reportes más específicos sobre los subtipos sanguíneos (Yamamoto *et al.* 1993a; Yamamoto *et al.* 1993b; Yamamoto *et al.* 1993c; Yamamoto *et al.* 93d), y finalmente los primeros reportes sobre la estructura de intrones y exones del gen (Bennet *et al.* 1995; Yamamoto 1995). Con toda esta literatura, aún era posible cuestionar la existencia de un solo gen para el sistema ABO. Se hicieron dos observaciones que es necesario resaltar:

1. Los subtipos del sistema ABO ($A^{(A)}$, $B^{(A)}$, *cis*-AB, etc) se han caracterizado en todos los reportes secuenciando fragmentos amplificados por PCR en distintas zonas del gen, sin haber obtenido el cDNA correspondiente a cada subtipo. Particularmente en los reportes del subtipo *cis*-AB (Yamamoto *et al.* 1993b) se analizan únicamente dos individuos, y el análisis se realizó con fragmentos del gen, amplificados por PCR que fueron clonados y secuenciados. ¿Cómo asegurar que no se trataba de individuos como los que buscábamos? La secuenciación de los exones VI y VII fue hecha en pedazos (los fragmentos de PCR) que luego se reconstruyeron y se reportaron como parte de un solo gen. Si en verdad existen dos genes ligados, cabe la posibilidad de que la secuencias pudieran ser parte de uno de los genes y parte del otro, y de esta manera los dos genes no se detectaron. Este reporte fue importante para el proyecto, ya que de encontrarse individuos AB con alelos recesivos, ahora era necesario comprobar que estos casos fueran individuos *trans* AB, por lo tanto, que no se trataran de alelos *cis*-AB como los reportados.

2. El alelo O^1 fue el primer tipo de alelo recesivo reportado, y es homólogo al alelo A excepto por la delección en 261 (Yamamoto *et al.* 1990b). Cuando se hizo énfasis en la existencia de más de un tipo de alelo recesivo (Jhonson y Jopkinson 1992; Yamamoto *et al.* 1993c) se pensó que el alelo O^2 (posición 291 similar al alelo B) reportado por Yamamoto podría ser el correspondiente al alelo "b" que se propone en la teoría de dos genes ligados; posteriormente se reportó otro tipo de alelo O que también tiene posiciones similares al alelo B (Grunnet *et al.* 1994); el alelo O^1 podría ser entonces el llamado alelo "a", y los otros dos alelos recesivos serían formas alternas del alelo "b", datos que nos indicaban la posibilidad de dos genes.

2.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS CASOS

2.1.1. Casos individuales

En un individuo AB de 15 que fueron analizados, se demostró la presencia de un alelo recesivo.

El individuo AB en el que se obtuvo corte con la enzima KpnI quedó tipificado en tres sitios: en el sitio 261 se detectó la presencia de esta delección característica de los alelos recesivos; y fue tipificado como A en las posiciones 297 y 703.

Existen dos posibilidades fenotípicas para este caso: puede tratarse de un individuo A que haya sido fenotipificado como AB por error, o tratarse de un

individuo *cis*-AB como los reportados (Yamamoto *et al.* 1993b). Para demostrar esta última posibilidad es necesario analizar el sitio 803, tipificado como B en los individuos *cis*-AB, para lo cual sería necesario clonar y secuenciar esta región (y realmente la posibilidad más real es caracterizarlo por partes, como lo hizo Yamamoto, con la desventaja de que no se tiene la certeza del origen de los fragmentos). Quedó demostrado que no se trata de un individuo *trans* AB.

La incertidumbre en cuanto al fenotipo de este caso demuestra que es necesario ser muy cuidadoso con la tipificación de sangres en los hospitales, considerando la importancia que implica una transfusión sanguínea para la salud humana. En aquellos individuos cuya tipificación no puede ser muy clara con ninguno de los dos métodos (como es el caso de esta tesis) la transfusión sanguínea o la donación representa un peligro.

2.1.2. Casos familiares

Se comprobó la presencia de alelos recesivos en los padres y/o hermanos de los tres individuos AB y no se encontraron alelos recesivos en ellos. Si suponemos que existe un mayor polimorfismo del que se conoce hasta ahora en los alelos recesivos, y que algunos de ellos no poseen la delección 261 (como ya se ha reportado para el alelo O³), en estos tres casos se comprobó que ambos padres poseen alelos recesivos que sí poseen esta delección, y estos alelos no se transmitieron a los hijos AB.

De los resultados anteriores es evidente que aún se requiere un análisis de una población mucho mayor que la muestra analizada en este estudio para afirmar con certeza que no existen individuos *trans* AB que posean alelos recesivos. Lo que puede afirmarse es que no se encontraron individuos *trans* AB que poseen estos alelos y por lo tanto no se encontró evidencia que permita demostrar la existencia de dos genes ligados para el sistema ABO. Por ahora la metodología está diseñada para hacer este análisis molecular en un número más amplio de individuos y genotipificarlos en los sitios 261, 297 y 703.

2.2. ¿UNO O DOS GENES?

2.2.1. Explicaciones para el ajuste de las fórmulas.

En los antecedentes de esta tesis se describen paso a paso cada uno de los niveles en los que es posible estudiar al sistema ABO. Los primeros conocimientos bioquímicos llevaron a los genetistas a plantear teorías que implican una relación directa entre la estructura bioquímica con la presencia de un gen para ella, aunque

hoy sabemos que no es tan simple como eso. Entre la estructura bioquímica y el gen del sistema ABO se encuentran diversos niveles que poco a poco han ido conociéndose: la construcción secuencial de las cadenas de carbohidratos, las enzimas ABO y otras implicadas, la expresión de los genes para estas enzimas, la caracterización molecular de los genes... Por lo tanto, la regulación de la síntesis de las cadenas de carbohidratos es muy compleja e implica diversos niveles, y cualquiera de ellos puede afectar el producto final.

Es posible especular sobre la explicación del ajuste de las fórmulas no únicamente contemplando la existencia de dos genes, sino tomando en cuenta la existencia de estos niveles, y retomando la información que hasta ahora se conoce.

a) En un primer nivel más general, podemos mencionar que la expresión de los antígenos A o B no depende únicamente del gen ABO, depende además de la existencia de otros genes que codifican para glicosiltransferasas que sintetizan las cadenas precursoras a estos antígenos, por ejemplo los genes *Se* y *H* (Lemicux 1978), dos genes que codifican para enzimas capaces de sintetizar de manera independiente el epítopo H, precursor directo de los antígenos A o B. Es decir, existe la posibilidad de que otros genes estén influyendo en una cascada de expresión génica para estos antígenos, y al ser genes poco conocidos (recordemos que el tema de la glicobiología es muy nuevo y existen muy pocas glicosiltransferasas clonadas) no se han tomado en cuenta como factores que afectan la expresión final de los antígenos ABO.

b) En otro nivel, se puede mencionar que no se sabe si los genes para estas enzimas comparten sistemas de **regulación génica** que dependen de otros genes. La expresión de estos antígenos es un sistema regulado, como se ha demostrado durante el desarrollo embrionario (Szulman 1964 y 1965), y la expresión diferencial de estos antígenos dependiente del grado de diferenciación o maduración celular (Dablesteen *et al.* 1982, Vedtofte *et al.* 1984) y del tipo celular (Oriol 1990). Las fórmulas que hasta hoy existen consideran únicamente los genes para los grupos sanguíneos ¿Y si estos genes dependen directamente de otros cuyos mecanismos de regulación no se conocen? ¿Podría ser esta la explicación para el ajuste de estas nuevas fórmulas? ¿Podría ser que estas fórmulas describen la regulación génica del sistema ABO y de otros genes?

c) Un tercer nivel que habría que tomar en cuenta son los transcritos del gen. Se ha demostrado la existencia de variaciones en los transcritos, dependiendo del tipo de tejido. Ésta puede ser la explicación para la expresión diferencial en los tejidos, aunque también podría especularse la existencia de una cantidad mínima de

población cuya expresión antigénica no concuerda con el gen que posee, debido a variaciones en la secuencia de los mensajeros para este gen, por lo cual la enzima expresada tiene actividad distinta al de la enzima codificada en el DNA.

d) Por otro lado, a pesar de no haber encontrado evidencias para la existencia de dos genes, esta posibilidad puede también considerarse, ya que podría suceder que estos dos genes están tan cerca uno de otro que el nivel de recombinación sea muy bajo y no se detecten en la población más que raramente debido a que están asociados a los alelos dominantes A o B, y no han podido ser detectados por el análisis molecular ya que no tienen la delección en el sitio 261.

No es posible afirmar ninguna de estas posibilidades, aunque tampoco es posible descartarlas. Cualquiera de ellas pudiera ser la explicación real, o podrían serlo las tres primeras posibilidades juntas, ya que todos estos fenómenos implican pequeños desajustes y desbalances en la expresión de los grupos sanguíneos ABC en la población, y la variable "s" propuesta en la teoría lógica del equipo de filosofía puede significar y representar estos desajustes.

2.2.2 Otra explicación: los alelos bifuncionales

Para nuestro equipo de trabajo, la explicación que parece ser más lógica es la existencia de una cantidad significativa de individuos en la población que poseen alelos del tipo *cis*-AB o similares (como el B^(A)), u otros que hasta hoy no se conocen, lo cual está representado por la variable "s" (gameto AB) en la que se engloban aquellos subtipos que codifiquen para una transferasa bifuncional. Existen reportes sobre la posible doble actividad de estas transferasas (Watkins 88). Si esto ocurre *in vivo*, este fenómeno también queda incluido dentro de la nueva variable "s".

Es importante recalcar la poca información que se tiene sobre los polimorfismos que existen para este gen. Conforme se vaya teniendo más información sobre las bases moleculares, se podrán hacer predicciones que se ajusten más al funcionamiento de las enzimas, con lo que podrán caracterizarse mejor los sitios que implican cambios importantes en la actividad enzimática. Posiblemente de aquí se obtenga un número importante de alelos polimórficos que posean la doble función enzimática en un solo alelo.

Así pues, consideramos que las tres primeras variables *p*, *q* y *r* representan los gametos que Bernstein había propuesto: A, B y O; y se plantea la existencia de un nuevo gameto AB que probablemente representa a una transferasa bifuncional

Se han planteado pues, varias posibilidades abiertas aun a la discusión: la variable "s" como la representación de desajustes en la regulación génica en la población los cuales implican la expresión de antígenos que no corresponden a sus genes respectivos (con cualquiera de los mecanismos ya discutidos, incluyendo el de los alelos tipo *cis-AB*); o simplemente, la existencia de dos genes ligados, con una cercanía tal que no ha sido posible su detección molecular.

3. PERSPECTIVAS

La perspectiva más inmediata es la de un análisis poblacional mucho mayor, con un gran número de individuos AB, para descartar la posibilidad de la existencia de individuos *trans* AB con alelos recesivos.

Por otra parte se puede mencionar la detección de un mayor número de polimorfismos con técnicas más sencillas y accesibles para caracterizar los polimorfismos propios de cada región, y desarrollar técnicas aplicables a la fenotipificación de una gran cantidad de muestras en hospitales, tomando en cuenta los polimorfismos propios de cada región (sobre todo aquellos polimorfismos que impliquen cambios importantes en la actividad enzimática).

En el campo de la regulación, la región 5' del gen implicada en la regulación génica no está caracterizada, y en esta área podrían encontrarse datos interesantes sobre la regulación génica del sistema.

Otra de las áreas interesantes y poco conocidas es la función de estas moléculas y las consecuencias que implican las alteraciones de este sistema en los organismos (como en el caso del cáncer, para el cual se han reportado cambios en los antígenos de superficie celular de acuerdo con el grado de desarrollo de la enfermedad, y aún no se conocen las implicaciones de este fenómeno) por lo que el estudio de estos antígenos en un modelo celular puede llevar a una explicación interesante que conjunte el nivel molecular y el de la regulación biosintética.

VIII CONCLUSIONES

- De 15 individuos AB analizados se encontró que uno de ellos tiene alelos recesivos del tipo O¹.
- Se comprobó que este individuo AB no es del genotipo *trans*-AB.
- No se encontraron evidencias que demuestren la existencia de dos genes para el sistema ABO.
- La metodología de esta tesis puede usarse para un análisis de población con una cantidad de muestra que sea significativa, y que permita la captura de polimorfismos poco usuales en individuos AB.

IX REFERENCIAS

- Bennet E.C., Steffensen R., Clausen H., Olde Weghuis D. y van Kessel A.G. (1995) Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**: 318-325
- Bernstein F. (1924). *Kin. Wschr.* **3**: 1495-1497.
- Beteridge A. y Watkins W.M. (1985) Variant forms of α -2-1-fucosyltransferase in human submaxillary glands from blood group ABH secretor and non-secretor individuals. *Glycoconjugate J.* **2**: 61.
- Cartron J.P., Badet J., Mulet C. y Salmon C.H. (1978) Study of the alfa-N-acetylgalactosaminyltransferase in sera and red cell membranes of human A subgroups. *J. Immunogenet.* **5**: 107-116.
- Clausen H. y Hakomori, S. (1989) ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox. Sang.* **56**: 1-20.
- Clausen H., White T., Takio K., Stroud M., Holmes E., Karkov J., Thim L., y Hakomori S. (1990) Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined Fuc α 1 \rightarrow 2Gal α 1 \rightarrow 3-N-acetyl-galactosminyl-transferase from human lung tissue. *J. Biol. Chem.* **265**: 1139-1145.
- Clausen H., Bennet E. P. y Dabelsteen E. (1992) Carbohydrates of the cell surface: Molecular aspects of glycosyltransferases and their genes. *APMIS Suppl.* **27**, vol. **100**: 9-17.
- Clausen H., Bennet E.P. y Grunnet N. (1994) Molecular genetics of ABO histo-blood groups. *TCB* **2**: 79-89.
- Chang J.G., Lee L.S., Chen P.H., Liu T.C., Lin S.F. y Lee J.C. (1992) Rapid genotyping of ABO blood group. *Blood* **79**(8): 2176-2177.
- Dabelstee E., Vedofle P., Hakomori S. y Young W.W. (1982) Carbohydrate chains specific for blood group antigen in differentiation of human oral epithelium. *J invest. Derm.* **79**: 3-7.
- De Castello A.V. y Sturli A. (1902) *Munchen. med. wchmschr*: 1090-1095.
- Dekker J. y Strous G.J. (1990) Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O glycosylation. *J. Biol Chem.* **265**: 18116-18122.

- Dungern E.V. y Hirszfeld L. (1910) *Z. Immun Forsch* 6: 284-292.
- Economidou J., Huges-Jones N.C. y Gardner B. (1967) Quantitative measurments concerning A and B antigen sites. *Vox Sang.* 12: 321-325.
- Ferguson-Smith M.A., Aitken D.A., Turleau C. y de Grouchy J. (1976) Localisation of the Human ABO: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK to 9q34. *Hum. Genet.* 34: 35-43.
- Ginsburg V. (1972) Enzymatic basis for blood groups in man. *Adv. Enzymol.* 36: 131-141.
- Greenwell P., Edwards Y.H., Williams J. y Watkins W.M. (1987) Approaches to cloning the genes at the human blood group ABO locus. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 601-603.
- Grunnet N., Steffensen R., Bennet E.P. y Clausen H. (1994) Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a danish population: frequency of a novel O allele defined as O². *Vox Sang.* 67: 210-215.
- Hakomori S. (1981) *Semin. Hematol.* 18: 39.
- Hakomori S. y Kannagi R. (1986) Carbohydrate antigens in higher animals, in: Weir, Herzenberg, and Blackwell (eds.) *Handbook of experimental immunology*. Blackwell Scientific, Oxford, vol. I: 9.1-9.39
- Hakomori S. (1990) Immunochemical and molecular genetic basis of the histo-blood group ABO (H) and related antigen system. *Baillière's Clin. Haematol.* 4: 957-974.
- Hakomori S. (1993) Les fonctions occultes des groupes sanguins. *La Recherche* 24 (254): 548-554.
- Henion T.R., Mecher B.A., Anaraki F. y Galili U. (1994) Defining the minimal size of catalytically active primate α 1,3 galactosyltransferase: structure-function studies on the recombinant truncated enzyme. *Glycobiology* 4 (2): 193-201.
- Henske E.P., Ozelius L., Gusella J.F., Haines J.L. y Kwiatkowski D.J. (1993) A high-resolution linkage map of human 9q34.1. *Genomics* 17: 587-591.
- Hummel K., Badet J., Bender K., Duffner G., Lopez M., Mauff G., Pulverer G., Salmon C. y Schmidts W. (1977) Inheritance of cis-AB in three generations (family Lam). *Vox Sang.* 33: 290-298

- Jhonson P.H. y Hopkinson D.A. (1992) Detection of ABO blood group polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Mol. Gen.* **1**(5): 341-344.
- Joziase D.H., Shaper J.H., Van del Eijnden D.H., Van Tunen A.J. y Shaper N.L. (1989) Bovine $\alpha 1 \rightarrow 3$ galactosyltransferase: Isolation and characterization of a cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **264** (24): 14290-14297.
- Joziase D.H., Shaper J.H., Jabs E.W. y Shaper N.L. (1991) Characterization of an $\alpha 1 \rightarrow 3$ -galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J. Biol. Chem* **266** (11): 6991-6998.
- Joziase D.H., Shaper N.L., Kim D., Van den Eijnden D.H. y Shaper J.H. (1992) Murine $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase. *J. Biol. Chem* **267**(8): 5534-5541.
- Joziase D.H. (1992) Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure. *Glycobiology* **2**: 271-277.
- Kabat E.A. (1973) Immunochemical studies on the carbohydrate moiety of water soluble blood group A, B, H, Le^a and Le^b substances and their precursors I antigens. In Isbell H (ed.). *Carbohydrates in solution (Adv. Chemistry Series 117)*. Washington DC. American Chemical Society: 334-361.
- Kelly R.J., Ernst L.K., Larsen R.D., Bryant J.G., Robinson J.S y Lowe J.B. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (O_h) and para-Bombay individuals (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 5843-5847.
- Kempter B. (1992) *TIG* **8**: 7-8.
- King M.J. (1994) Blood group antigens on human erythrocytes-distribution, structure and possible functions. *B.B. Acta* **1197**: 15-44.
- Kisailus E.C. y Kabat E. A. (1973) Immunochemical studies on blood groups, LXVI. Competitive binding assays of A1 and A2 blood group substances with insolubilized anti-A serum and insolubilized A agglutinin from *Dolichos biflorus*. *J. Exp. Med.* **147**: 830-843.
- Kleene R. y Berger E.G. (1993) The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *B.B. Acta.* **1154**: 283-325.
- Kornfeld R. y Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.

- Kumazaky T. y Yoshida A. (1984) Biochemical evidence the secretor gene, *Se*, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *P.N.A.S., U.S.A.*, **81**: 4193.
- Landsteiner K. (1900) *Zbl. Bakteriol* **27**: 357-362.
- Larsen R.D., Rivera-Marrero C.A., Ernst L.K., Cummings R.D y Lowe J.B. (1990a) Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:β-D-Gal(1,4)-D-GlcNAcα(1,3)-Galactosyltransferase cDNA. *J. Biol. Chem.* **265** (12): 7055-7061.
- Larsen R.D., Ernst L.K., Nair R.P. y Lowe J.B. (1990b) Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:β-D-galactoside 2-α-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6674-6678.
- Lemieux R.U. (1978) Human blood groups and carbohydrate chemistry. Haworth Memorial Lecture. *Chem Soc. Rev.* **7**: 423.
- Le Pendu J., Cartron J.P., Lemieux R.U. y Oriol R. (1985) The presence of at least two different H blood-group-related β-D-Gal α-2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. *Am.J.Human Genet.* **37**: 749.
- Maniatis T., Fritsch E. F. y Sambrook J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marcus D.M., y Cass L. (1969) Glycosphingolipids with Lewis blood group activity: uptake by human erythrocytes. *Science* **164**: 553-555.
- Matsuki L., Nakasima T y Furukawa K. (1994) O-gene detection by allele specific amplification in the ABO blood group system. *Jpn J. Human Genet.* **39**: 293-297.
- Mohn J.F., Cunningham R.K. y Bates J.F. (1977) Qualitative distinctions between subgroup A1 and A2. In Mohn J.F, Plunkett, Cunnigha, and Lambert (eds). *Human blood groups*. New York. Karger: 316-325.
- Morgan W.T.J y Watkins W.M. (1969) Genetic and biochemical aspects of human blood group A, B, H, Le^a and Le^b specificity. *Britt. Med. Bull.* **25**: 30-34.
- Mourant 1977

- Navaratnam N., Findlay J.B.B., Keen J.N y Watkins W.M. (1990) Purification, properties and partial aminoacid sequence of the blood-group-A-gene- associated α -3-N-acetylgalactosaminyltransferase from human gut mucosal tissue. *Biochem. J.* **271**: 93-98.
- Ogasawara K., Banai M., Saitou N., Yabe R., Kenichi N., Takenaka M., Fujisawa K., Uchikawa M., Ishikawa Y., Juji T. y Tokunaga K. (1996) Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum. Genet.* **97**: 777-783.
- O'Keefe D.S. y Dobrovic A. (1993) A rapid and reliable PCR method for genotyping the ABO blood group. *Hum. Mutat.* **2**: 67-70.
- Olsson M.L. y Chester M.A.(1995) A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox. Sang.* **69**: 242-247.
- Oriol R., Le Pendu J. y Mollicone R. (1986) Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox. Sang.* **51**: 161-171.
- Oriol R. (1990) Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains, evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J. Immunogenet.* **17**: 235-245.
- Oriol R., Mollicone R., Coullin P., Dalix A.M. y Candelier J.J. (1992) Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl.* **27**: 28-38.
- Padilla H., Garduño G. y García Carrancá A. (1996) Resultados no publicados.
- Paulson J.C., Weinstein J. y Schauer A. (1989a) Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J. Biol. Chem* **264** (19): 10931-10934.
- Paulson J.C. y Colley K.J. (1989b) Glycosyltransferases. *J.Biol.Chem.* **264**: 17615-17618.
- Rolfs A., Schuller I., Finckh U., Weber -Rolfs I. (1992) PCR: Clinical diagnostics and research. edited by Springer Laboratory. Germany. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*: 1-30.
- Roth J. (1987) Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *B.B. Acta.* **906**: 405-436.

- Navaratnam N., Findlay J.B.B., Keen J.N y Watkins W.M. (1990) Purification, properties and partial aminoacid sequence of the blood-group-A-gene- associated α -3-N-acetyl galactosaminyltransferase from human gut mucosal tissue. *Biochem. J.* **271**: 93-98.
- Ogasawara K., Banai M., Saitou N., Yabe R., Kenichi N., Takenaka M., Fujisawa K., Uchikawa M., Ishikawa Y., Juji T. y Tokunaga K. (1996) Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum. Genet.* **97**: 777-783.
- O'Keefe D.S. y Dobrovic A. (1993) A rapid and reliable PCR method for genotyping the ABO blood group. *Hum. Mutat.* **2**: 67-70.
- Olsson M.L. y Chester M.A. (1995) A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox. Sang.* **69**: 242-247.
- Oriol R., Le Pendu J. y Mollicone R. (1986) Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox. Sang.* **51**: 161-171.
- Oriol R. (1990) Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains, evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J. Immunogenet.* **17**: 235-245.
- Oriol R., Mollicone R., Coullin P., Dalix A.M. y Candelier J.J. (1992) Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl.* **27**: 28-38.
- Padilla H., Garduño G. y García Carrancá A. (1996) Resultados no publicados.
- Paulson J.C., Weinstein J. y Schauer A. (1989a) Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J. Biol. Chem* **264** (19): 10931-10934.
- Paulson J.C. y Colley K.J. (1989b) Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **264**: 17615-17618.
- Röls A., Schuller I., Finckh U., Weber -Röls I. (1992) PCR: Clinical diagnostics and research. edited by Springer Laboratory. Germany. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*: 1-30.
- Roth J. (1987) Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *B. B. Acta.* **906**: 405-436.

- Roth J., Greenwell P. y Watkins W.M. (1988) Immunolocalization of blood group A gene specified $\alpha 1,3$ N-acetylgalactosaminyl-transferase and blood group A substance in the trans-tubular network of the Golgi apparatus and mucus of intestinal goblet cells. *Lux. J. Cell. Biol.* **46**: 105-112.
- Sadler J.E. (1984) Biosynthesis of glycoproteins: formation of O-Linked oligosaccharides. In Ginsburg V. y Robbins P.W. (eds.). *Biology of carbohydrates*. N.Y. John Wiley and Sons: 199-331.
- Sarnesto A., Köhlin T., Hindsgaul O., Thurin J. y Blaszczyk-Thurin M. (1992) Purification of the secretor-type β -Galactoside $\alpha 1 \rightarrow 2$ Fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* **267** (4): 2737-2744.
- Schachter H., Michaels M.A., Tilley C.A., Crookston M.C. y Crookston J.H. (1973) Qualitative differences in the N-acetyl-D-galactosaminyltransferases produced by human A1 and A2 genes. *P.N.A.S. U.S.A.* **70**: 220-224.
- Scachter H. (1994) Molecular cloning of glycosyltransferase genes. In Fukude M. y Hindsgaul O. (eds.). *Molecular Glycobiology*. N.Y. O.U.P. Press: 88-160.
- Shaper N.L., Lin S.P., Joziase D.H., Kim D.Y. y Yang-Feng T.L. (1992) Assignment of two human $\alpha 1 \rightarrow 3$ -Galactosyltransferase gene sequences (GGTA1 and GGTA1P) to chromosomes 9q33-q34 and 12q14-q15. *Genomics* **12**: 613-615.
- Stroncek D.F., Konz R., Clay M.E., Houchins J.P y McCullough J. (1995) Determination of ABO glycosyltransferase genotypes by use of polymerase chain reaction and restriction enzymes *Transfusion* **35** (3): 231-240.
- Stults C.L.M., Sweeley CC y Macher B.A. (1989) Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods Enzymol.* **50**: 167.
- Szulman A.E. (1964) The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence, III. The A, B, and H antigens in embryos and fetuses from 18 mm in length. *J. Exp. Med.* **119**: 503-516.
- Szulman A.E. (1965) The ABH antigens in human tissues and secretions during embryonal development. *J.Histochem.Cytochem* **13**: 752-754.

- Tooze S.A., Tooze J. y Warren G. (1988) Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell Biol.* **106**: 1475-1478.
- Trincherà M., Fabbri M. y Ghidoni R. (1991) Topography of glycosyltransferases involved in the initial glycosylations of gangliosides. *J. Biol. Chem.* **266**: 20907-20912.
- Ugozzoli L. y Wallace R.B. (1992) Application of an allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes. *Genomics* **12**: 670-674.
- Vedofle P., Dabelsteen E., Hakomori S. y Young W.W. (1984) Regional variations of cellular face carbohydrates in human oral stratified epithelium. *Differentiation* **27**: 221-228.
- Walter V.P. Sweeney K y Morr J. (1983) Neutral lipid precursors for gangliosides are not formed by rat liver homogenates or by purified cell fractions. *B.B. Acta* **750**: 346-352.
- Watkins W.M. (1962) *Immunology* **5**: 245-266.
- Watkins W. M. (1972) In Gottschalk A (ed.). *Glycoproteins*. Elsevier, Amsterdam: 830-891.
- Watkins W.M. (1980) Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. *Adv. Hum. Genet.* **10**: 1-136.
- Watkins W.M. (1986) Glycosyltransferases. Early history, development and future prospects. *Carbohydrate Research* **149**: 1-12.
- Watkins W.M. (1987) Biochemical genetics of blood group antigens: retrospect and prospect. *Biochem. Soc. Trans.* **15**: 620-624.
- Watkins W.M., Greenwell P., Yates A.D. y Johnson P.H. (1988) Regulation of expression of carbohydrate blood group antigens. *Biochimie* **70**: 1597-1611.
- Westerveld A., Jongsmá P.M., Khan P.M., Van Someren H. and Bootsma D. Assignment of the AK₁:Np:ABO linkage group to human chromosome 9. *Procl. Nat. Acad. Sci. USA.* **73(3)**: 895-899.
- Yamamoto F., Marken J., Tsuji T., White T., Clausen H. y Hakomori S. (1990n) Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc:Fuca α 1 \rightarrow 2Gal α 1 \rightarrow 3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem* **265 (2)**: 1146-1151.

- Yamamoto F., Clausen H., White T., Marken J y Hakomori S. (1990b) Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* **345**, 229-233.
- Yamamoto F. y Hakomori S. (1990) Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J. Biol. Chem.* **265** (31): 19257-19262.
- Yamamoto F. McNeill P.D. y Hakomori S. (1991) Identification in human genomic DNA of the sequence homologous but not identical to either the histo-blood group ABH genes or $\alpha 1\rightarrow 3$ galactosyltransferase pseudogene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **175** (3): 986-994.
- Yamamoto F., McNeill P.D. y Hakomori S.(1992) Human histo-blood group A² transferase coded by A² allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxil terminal. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **187** (1): 366-374.
- Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M., Hakomori S., Harris T., Judd W.J. y Davenport R.D. (1993a) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups: A³ and B³ alleles. *Vox. Sang.* **64**: 116-119.
- Yamamoto F., McNeill P.D., Kominato Y., Yamamoto Y., Hakomori S., Ishimoto S., Nishida S., Shima M. y Fujimura Y. (1993b) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. *cis*-AB alleles. *Vox. Sang.* **64**: 120-123.
- Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M., Hakomori S. y Harris T (1993c) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A^x and B^(A) alleles. *Vox. Sang.* **64**: 171-174.
- Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M., Hakomori S., Bromilow I.W. y Duguid J.K.M. (1993d) Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox. Sang.* **64**: 175-178
- Yamamoto F. McNeill P.D. y Hakomori S.(1995) Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology* **5** (1): 51-58.
- Yamamoto F. (1995) Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox. Sang.* **69**: 1-7.
- Yoshida A. (1979) Biochemical genetics of human blood group ABO system. *Am.J. Hum. Genet.* **34**: 1-14.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA