



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Detección de mutaciones en el gen de beta globina en pacientes con Anemia de células falciformes”

TESIS

Que para obtener el título de

Química Farmacéutica Bióloga

Presenta:

Eva Cristina Morales Almazán

Asesora: Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2010



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Detección de mutaciones en el gen de beta globina en pacientes con Anemia de células falciformes.

que presenta la pasante: Eva Cristina Morales Amazán
 con número de cuenta: 40406669-5 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2009

PRESIDENTE	<u>MC. Idalia Carmen Avila Mivazawa</u>	
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Mariterez Domínguez Rojas</u>	

DEDICATORIAS

A mi madre Eva Almazán Aguilar la mujer más excepcional que he conocido, que ha luchado contra todo por mí brindándome su amor y amistad y dándome su hombro en las circunstancias más difíciles, su sonrisa en los momentos más maravillosos y ha creído en mí en todo momento. Porque este logro es tan solo la cosecha de lo que juntas hemos sembrado.

A mi padre Martín Morales Paniagua un hombre inigualable que me ha dado su amor, cariño y su confianza creyendo en mi en todo momento y que a pesar de la distancia siempre he tenido su apoyo incondicional y su motivación para seguir siempre adelante. Aunque no estés a mi lado siempre te llevo conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por darme el amor, la comprensión y el aliento necesario día a día que necesité durante este trayecto y por enseñarme a nunca darme por vencida. y a mi padre por todos los consejos que me ha dado para no desistir nunca de mis sueños y el esfuerzo que ha hecho por darme todo el apoyo que he recibido para culminar este ciclo.

Los Amo

A mi hermana Sandra por ser mi amiga y compartir conmigo todos los sucesos transcurridos durante la preparatoria, por tus sabios consejos y tu confianza. A mi hermana Minerva por permitirme ser su amiga y confidente y por toda la motivación que he recibido de tu parte. A las dos muchísimas gracias por siempre creer en mí y estar ahí a cada momento mostrando su apoyo incondicional. **Las Amo**

A mi sobrina Cinthya Odette por ser una luz en mi camino e inspirarme a seguir más adelante.

A mis amigos Liliana, Monse, Areli, Sergio, Gaby, Daniel, Liz y Susy por compartir mis alegrías y tristezas durante esta etapa y enseñarme que la amistad llega en cualquier momento y sigue presente y a todos aquellos que han sido parte importante en mi vida y no menciono por no olvidar a nadie.

A Evet por demostrarme ser un amigo incondicional, esa persona con quien siempre puedes contar y que te escucha cuando más lo necesitas, gracias por todo lo que has hecho por mí y por el amor que me das día a día que me ayuda a ver mejor la vida. Pero sobre todo gracias por ser parte de mi familia. **Te Amo**

A todos mis coach QFB 31 por todo lo que dejaron en mí durante el tiempo compartido, también a mi partner, quare back y todas las que formaron parte de esta alegría

A mis maestras de la preparatoria 67: Rosalinda y Silvia por ser unas excelentes profesoras, enseñarme el maravilloso mundo de la química y la biología, pero sobre todo por la gran guía que recibí para la elección de esta magnífica carrera.

A mis profesores de la universidad: Ana Laura Vázquez, Rosalba Bonilla, Sandra Díaz, Idalia Ávila, Marco Antonio Vega y Maritere Domínguez por todo el tiempo que dedican para que uno llegue al final de esta etapa con una buena preparación, muchas gracias por ser tan buenos profesores y alentarnos a seguir adelante.

Al químico Mario por todo el tiempo que me dedicó para fortalecer mis conocimientos y aprender de los suyos.

A mi asesora la Dra. Rosenda Peñaloza por el infinito apoyo que me ha brindado y la confianza que ha depositado en mí, pero sobre todo por todas las enseñanzas que me ha dado y lo consejos para crecer profesionalmente.

Gracias a la FESC por permitirme ser parte de la grandísima UNAM.



Trabajo realizado en Unidad de Investigación Médica en Genética Humana de Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS en colaboración con el servicio de Hematología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG).



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

Índice General

I. Índice de figuras.

II. Índice de Tablas.

III. Abreviaturas.

IV. Resumen.

1

V. Generalidades.

2

V.1 Hemoglobina (Hb).

2

5.1.1 Estructura.

2

5.1.2 Genética.

4

5.1.3 Funciones.

6

5.1.4 Tipos.

7

5.1.5 Funciones de los dominios de la cadena β .

9

V.2 Hemoglobinopatías (Hbps).

9

5.2.1 Nomenclatura de las hemoglobinopatías.

12

5.3 Anemia de Células Falciformes (ACF).

13

5.3.1 Fisiopatología.

15

5.3.2 Rasgo drepanocítico.

15

5.4 β -Thalasemia.

16

5.4.1 Talasemia menor.

17

5.4.2 Talasemia Intermedia.

17

5.4.3 Talasemia Mayor.

18

5.5 Hb S/Talasemia β (Hb S β^{al}).

18

5.6 México y las hemoglobinopatías.

19

VI. Objetivos.

22



VII. Hipótesis.	23
VIII. Materiales y Métodos.	24
8. 1 Material.	24
8. 1.1 Material biológico.	24
8. 1.2 Material instrumental.	24
8. 1.3 Equipos.	25
8. 2 Reactivos.	25
8.3 Métodos.	27
8.3.1 Extracción de DNA (Concentración de sales).	27
8. 3.1.1 Fundamento.	27
8. 3.1.2 Diagrama de flujo de extracción de DNA.	28
8. 3.1.3 Cuantificación de DNA.	29
8.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	29
8.3.2.1 Fundamento.	29
8.3.2.2 Diagrama de flujo de la reacción en cadena de la polimerasa.	33
8.3.4 Purificación del producto de PCR.	34
8.3.4.1 Fundamento.	34
8.3.4.2 Diagrama de flujo de la purificación del producto de PCR.	35
8.3.4.3 Cuantificación del producto purificado.	36
8.3.5 Electroforesis horizontal.	36
8.3.5.1 Fundamento.	36
8.3.5.2 Diagrama de flujo de electroforesis horizontal.	37
8.3.6 Secuenciación de los fragmentos amplificados del gen beta globina.	39
8.3.6.1 Fundamento.	39

8.3.6.2 Diagrama de flujo del marcaje con Big Dye 3.1 de los fragmentos amplificados del gen beta globina.	42
8.3.6.2.1 Diagrama de flujo de la purificación de producto marcado.	43
8.3.7 Secuenciación automatizada y procesamiento de datos.	44
IX. Resultados.	46
X. Discusión .	50
XI. Conclusiones.	55
XII. Glosario.	56
XIV. Anexos.	59
14.1 Preparación de reactivos.	59
14.2. 2 Electroferogramas de las mutaciones.	60
XIII. Bibliografía.	63

I. Índice de Figuras

Estructura tridimensional de la Hemoglobina.	3
Estructura del grupo Hem.	4
Localización cromosómica de los genes de las cadenas alfa y beta globina.	5
Localización de los componentes del gen de beta globina.	6
Transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina.	7
Cadenas que constituyen a las diferentes hemoglobinas.	8
Constitución de los dominios de la cadena de beta globina.	9
Cambio de una base en la secuencia provocando un DNA mutante.	11
Modo de herencia de la Anemia de células falciformes.	13
Mutación que conduce a HbS.	14
Formación de agregados o fibras que causan la forma de media luna en el eritrocito.	14
Estructura de las células falciformes en un frotis sanguíneo.	15
Características comparativas de los glóbulos rojos en un frotis sanguíneo.	18
Procedencia de enfermedad depreanocítica en Hospital Infantil de México Federico Gómez.	21
Mecanismo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	32
Kits de purificación para los productos de PCR.	34
Corte sagital de un sistema de electroforesis horizontal en gel de agarosa.	37
Proceso de secuenciación automatizada por método de Sanger.	41
Ejemplo de un electroferograma den el programa Chromas y cada una de las partes que lo conforman.	44
Electroferogramas de una secuencia con una mutación y una secuencia normal.	44
Electroforesis horizontal del gradiente de temperatura para la amplificación de BG1,2 y BG3 del gen de beta globina en gel de agarosa al 1.2 %.	46
Electroforesis horizontal del gradiente de temperatura para la amplificación de BG3 del gen de beta globina en gel de agarosa al 1.2 %.	46
Gel de agarosa 1.2%, amplificados BG1,2 y 3, se cargaron 2 µl de cada amplificado y 1 µl del marcador de pares de bases.	47
Amplificación de la región 1,2.de las muestras 50,53 y 68, se colocaron	

2 µl de amplificado y 1 µl de marcador, en gel de agarosa 1.2%.	47
Electroforesis horizontal de amplificados purificados del gen beta globina en gel de agarosa 1.2%.	48

II. Índice de Tablas

Hemoglobinas normales presentes en la vida embrionaria, fetal y adulta.	8
Número de hemoglobinas anormales informadas en la literatura hasta 1998.	11
Presencia de Hemoglobinopatías en México.	20
Información de pacientes en estudio, proporcionada por el HIMFG.	24
Datos de Oligonucleótidos (primers cebadores) utilizados para la amplificación del gen de beta globina.	26
Mezcla realizada para la PCR del gen beta globina.	30
Condiciones de reacción para la PCR del gen beta globina.	31
Concentraciones de agarosa recomendadas en base al tamaño del DNA.	36
Alteraciones encontradas en el gen de beta globina de los pacientes estudiados.	49
Mezcla trihíbrida de estudios previos mexicanos, ordenados por cantidad de ancestros indígenas.	54

III. Abreviaturas

a.a	Aminoácido
ACF	Anemia de células falciformes
BrEt	Bromuro de etidio
CO₂	Dióxido de Carbono
ddNTPs	Dideoxínucleótidos trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxínucleotidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiamina tetraacético
EtOH	Etanol
H	Hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina adulta
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina con gen falciforme
Hbps	Hemoglobinopatías
HIMFG	Hospital infantil de “México Federico Gómez”.
Kb	Kilo bases
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
nhRNA	Ácido ribonucleico heterogéneo nuclear
O₂	Oxígeno molecular
OH⁻	Ión hidroxilo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodécil Sulafato de Sodio
α	Alfa
β	Beta
ε	Epsilon
γ	Gamma
ζ	Zeta

IV. Resumen

La Molécula de la hemoglobina es un tetrámero constituido por cuatro cadenas polipeptídicas, dos denominadas α y otras dos β , las cadenas β están codificadas por un gen localizado en el cromosoma 11 y las cadenas α por dos genes que se encuentran en el cromosoma 16. De este modo un individuo normal tiene dos copias normales del gen β y cuatro del gen α . Cada una de estas cadenas de globina se asocia con un grupo hemo que contiene un átomo de hierro que se une al oxígeno. Estas propiedades permiten la hemoglobina desarrollar la vital función de transportar oxígeno en los eritrocitos.

Se llaman hemoglobinopatías (Hbps) a aquellos trastornos ocasionados por alguna alteración, ya sea en la síntesis o en la estructura de la molécula de hemoglobina, el grupo más amplio resulta de cambios estructurales hereditarios en la a cadenas de globina, la más común de éstas es la Anemia de células Falciformes (ACF) registrada en 1910 en Chicago por James Herrick. Dentro de las hemoglobinopatías causadas por cambios en la síntesis de las cadenas de la globina existe un grupo muy relevante llamado Talasemias, su primera descripción clínica fue en 1925 en Detroit por Thomas Cooley.

El cuadro clínico más grave de estas dos enfermedades se puede traducir en una anemia grave asociada con diversos padecimientos dependiendo de la enfermedad que presente el individuo.

El presente trabajo abordará el análisis molecular del gen de beta globina de pacientes diagnosticados con rasgo o anemia de células falciformes, los cuales presentan una anemia severa y lo que se busca es encontrar alguna otra alteración genética que esté presente e influya en las manifestaciones clínicas y una vez identificadas informarlas

El estudio fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana de Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMMS y los pacientes en estudio fueron canalizados del Departamento de Hematología Pediátrica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

V. Generalidades

En todo estudio es necesario ir de lo particular a lo general, en este caso se partirá por describir todo acerca de lo que es la hemoglobina, así se conocerá su estructura, genética, funciones. Después se hablará del tema de las hemoglobinopatías para posteriormente abordar lo que es la anemia de células falciformes y la talasemia. Se mencionaran los datos que se conocen en México de éste trastorno y para finalizar se explicará el estudio que se llevo a cabo.

5.1 Hemoglobina (Hb)

La función de los eritrocitos es el transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos y del bióxido de carbono desde los tejidos hacia los pulmones. La hemoglobina (Hb) es una proteína eritrocitaria intracelular altamente especializada responsable de realizar este transporte gaseoso ^{Mackenzie, 2000}. Se encuentra en cantidades que van de 27 y 32 pg, ocupa alrededor del 33% del volumen del eritrocito y participa en el 90% del peso seco total de la célula, aproximadamente el 65% de la hemoglobina celular se fabrica antes de la exclusión del núcleo. Su concentración en el cuerpo es el resultado de un equilibrio entre la producción y destrucción de eritrocitos, su concentración en un adulto es de aproximadamente 12-15g/dl, con un volumen sanguíneo total cercano a 5000 ml, por tanto la masa corporal total de hemoglobina es de más o menos 750 gramos y en base al promedio de vida de los eritrocitos se tiene un aproximado de 6.25g de nueva hemoglobina diaria lo que corresponde al 0.83%, ^{Paniagua 2003}.

5.1.1 Estructura

La hemoglobina es una hemoproteína con estructura cuaternaria, observar figura 1. La primaria es la composición de aminoácidos y la secuencia de las cadenas de polipéptidos (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), la estructura secundaria son las áreas helicoidales alfas en un espacio tridimensional, la terciaria es la relación espacial de las áreas helicoidales alfa en la molécula plegada y por último la cuaternaria es la funcional en la que quedan establecidos los puntos de contacto y las posiciones relativas de las cuatro cadenas de polipéptidos que constituyen la

molécula de hemoglobina *Esparza, 1997*. Las características principales de su estructura han sido conservadas muy bien y son esenciales para entender las hemoglobinopatías, todas las globinas examinadas tienen siete u ocho regiones helicoidales (dependiendo de la cadena) que han sido designadas alfabéticamente de la A a la H. Con el tiempo se han conservado dos aminoácidos en todas las globinas existentes en la naturaleza y por ende las mutaciones que afecten a cualquiera de los dos se asocian con enfermedad *Nussbaum, 2004*.

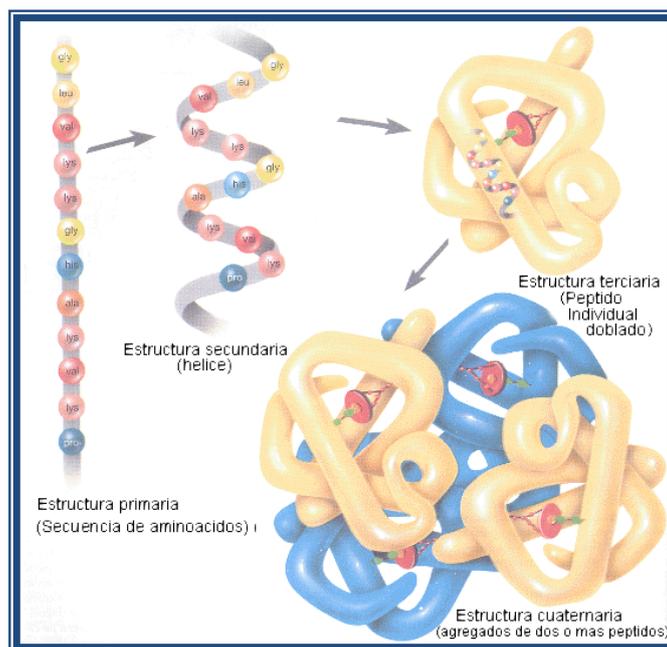


Figura 1. Estructura tridimensional de la hemoglobina *Raisman*.

Las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hb contienen cada una un grupo prostético, el Hem, un tetrapirrol cíclico que les proporciona el color rojo a los hematíes (Fig. 2). Un grupo prostético es una porción no polipeptídica que forma parte de una proteína en su estado funcional. El átomo de hierro se encuentra como Fe^{+2} y puede formar 5 o 6 enlaces de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno a la Hb (oxiHb, desoxiHb). Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal, el quinto enlace de coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina denominada histidina proximal. Finalmente, el sexto enlace del átomo ferroso es con el O_2 , que además está unido a un segundo imidazol de una histidina denominada histidina distal.

Tanto el quinto como el sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo de porfirina. La parte porfirínica del Hem se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas.

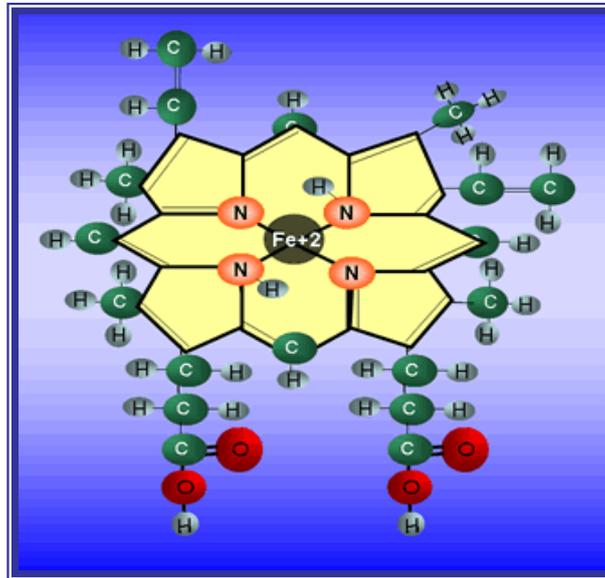


Figura 2. Estructura del grupo Hem Cogua Jorge et al

5.1.2 Genética

La hemoglobina A normal de adulto se hereda en forma mendeliana simple. El genotipo para este fenotipo es A/A Turgeon, 2006. La síntesis de las cadenas de péptidos de la globina sucede en los polirribosomas en el citoplasma, el tipo de cadena sintetizada está bajo control genético, la mayor parte de las células producen cadenas a y b. El grupo Hem es insertado en la bolsa hidrofóbica cerca de la superficie de cada cadena de globina, las cadenas de globina alfa y beta se combinan para formar el dímero $\alpha\beta$, dos dímeros $\alpha\beta$ se combinan para formar el tetramero estable de globina antes mencionado.

La síntesis de globina está dirigida por varios loci genéticos. Los genes codificantes para las cadenas β , δ , γ y ϵ se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11 en la región 1, banda 5 sub banda 5 (11p15.5), por su parte los genes que controlan la síntesis de la cadena ζ y los dos genes de la síntesis de la cadena α están localizados en el brazo corto del

cromosoma 16 región uno banda 3 (16p13.11 a 16p13.33) en un segmento de DNA de alrededor de 30 kb, esto se puede ver en la figura 3 ^{Mckenzie, 2000 y Passarge, 2007}.

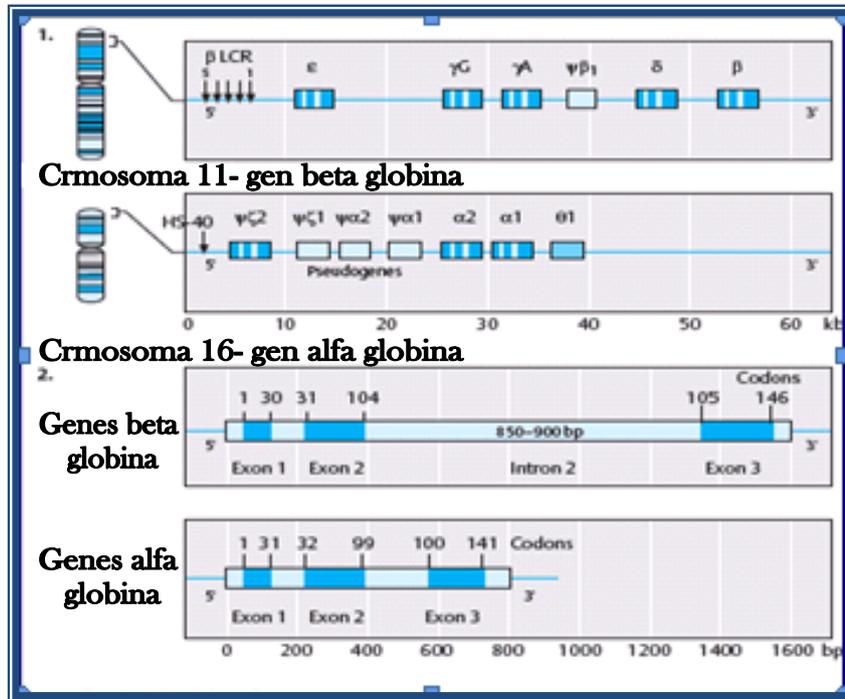


Figura 3. Localización cromosómica de los genes de las cadenas alfa y beta globina ^{Passarge, 2007}.

Todos los genes de la globina comparten una estructura general que consiste en tres exones (secuencias codificadoras) y dos intrones o secuencias intercaladas (secuencias que no se traducen). El primer exón se reconoce a partir del codón de inicio de la traducción ATG y contiene los primeros 30 codones de la cadena beta, el segundo exón lo conforman del codón 31 al 104, por último del codón 205 hasta el de terminación TAA.

A su vez las secuencias intercaladas (IVS) se comprenden por un sitio donador (5'GT), un sitio aceptor (5'AG) y un sitio de ramificación (5'-ACTTT o ATCTT 3'), además separan a los exones en el DNA y RNA heterogéneo nuclear (nhRNA) que comprende las regiones flanqueadoras o secuencias adicionales no traducibles 8RF5' y RF3' tal como se muestra en la figura 4 ^{González, Ibarra y Perea, 2001}.

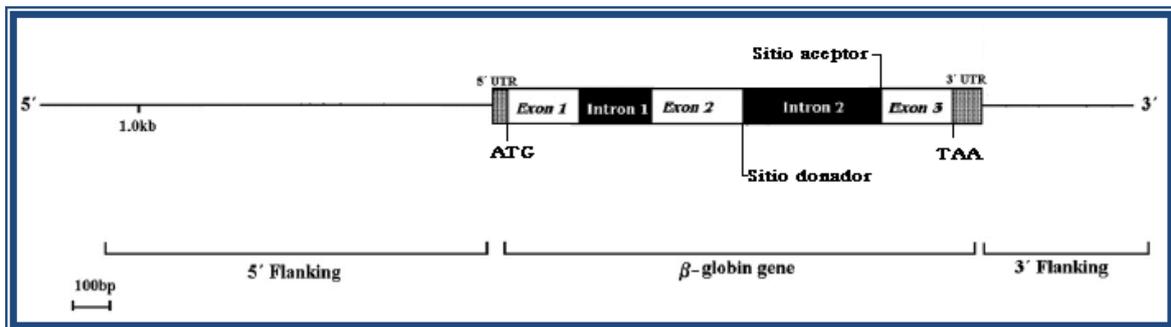


Figura 4. Localización de los componentes del gen de beta globina. UTR o región no traducible, regiones flanqueadoras 5' y 3', codones de inicio y termino y regionesceptoras y receptoras correspondientes a los intrones
Magaña et al, 2007

En todos los genes globínicos existen dos secuencias claves en el inicio de la transcripción denominadas “caja TATA” y “caja CAT”, las mutaciones que las afectan limitan la transcripción del RNA mensajero (ARNm). La porción distal del tercer exón (secuencia AATAAA) es la señal de terminación de la transcripción. La transcripción primaria del ARNm incluye copias de toda la secuencia del DNA genómico (intrones y exones) *Brandan, 2008*.

5.1.3 Funciones

Las funciones de la hemoglobina son las siguientes:

1. Transporte del oxígeno de los pulmones a los tejidos y del bioxido de carbono de los tejidos a los pulmones, por medio del grupo Hem tal como se muestra en la figura 5. Cada gramo de hemoglobina puede llevar 1.34 ml de oxígeno.
2. Participación en la regulación ácido-básica eliminando CO₂ en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por acción de los grupos histidinimidazol de la hemoglobina *Esparza, 1997*.

La Hb es una proteína de gran importancia e interés. El estudio de su estructura molecular y fisiología ha llamado la atención de innumerables investigadores, ya que se han generado descubrimientos de gran utilidad.

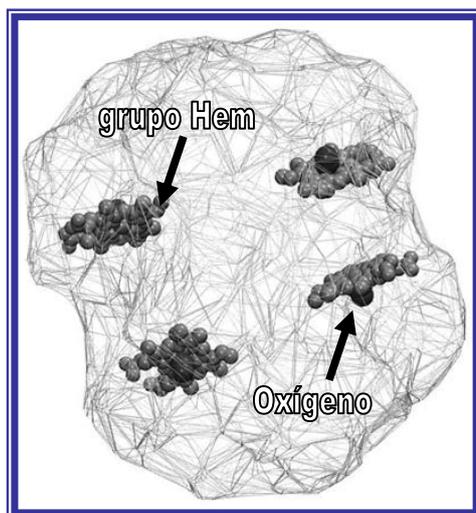


Figura 5. Transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina Investigadores del BSC y IRB, 2007

5.1. 4 Tipos

Existen distintos tipos de hemoglobina: HbA₁, HbA₂, Hb fetal y hemoglobinas embrionarias dependiendo de la composición de la cadenas tétradas de globina relacionadas (ver figura 6), se forman en diferentes etapas de desarrollo así como en diferentes sitios anatómicos. Las hemoglobinas embrionarias son Hb primitivas formadas a partir del día 28 de la gestación por eritrocitos inmaduros en saco vitelino, pero entre la quinta y octava semana el sitio principal de eritropoyesis empieza a desplazarse al hígado fetal, estas hemoglobinas incluyen a los tipos Gower I, Gower II y Portland 1 y 2. A la doceava semana de gestación aparece la Hemoglobina fetal (HbF) constituyendo el 70% de toda la hemoglobina presente en el momento del nacimiento, al llegar los tres meses de edad constituye el 90 a 95 % de la producción total de Hb la hemoglobina adulta (HbA₁) que se forma durante la eritropoyesis del hígado y médula ósea en el feto, y en la vida adulta en los precursores de glóbulos rojos que están en la médula ósea, el tipo HbA₂ está presente en aproximadamente un 2%, la HbF en los adultos está restringida a unos cuantos eritrocitos, denominados células F (menos de 8% de los eritrocitos) donde sólo el 13 a 25% de la hemoglobina en estas células F es HbF (Turgeon, 2006 y Nussbaum, 2004).

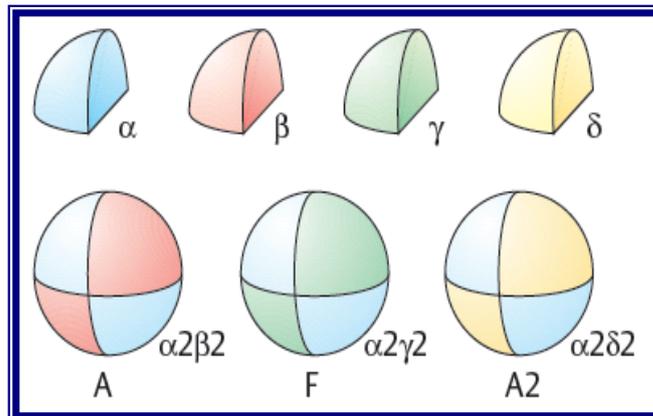


Figura 6. Cadenas que constituyen a las diferentes hemoglobinas ^{Passarge, 2007}.

En lo que refiere a las cadenas que constituyen a las diversas hemoglobinas se tiene que las cadenas α tienen 141 aminoácidos, mientras que las cadenas β , δ y γ tienen 146 aminoácidos respectivamente. La constitución de las diversas cadenas son las siguientes: Hemoglobina Gower I $\zeta_2\epsilon_2$, Hb Gower II $\alpha_2\epsilon_2$, Hb Portland 1 $\zeta_2\gamma_2$, Hb Portland 2 $\zeta_2\beta_2$, Hb F $\alpha_2\gamma_2$, HbA₂ $\alpha_2\delta_2$ y HbA₁ ^{Esparza, 1997; Mackenzie, 2000 y Passarge, 2007}. En la tabla 1 se muestra un resumen de las distintas hemoglobina, su constitución y el periodo en donde se encuentran presente.

Tabla.1 Hemoglobinas normales presentes en la vida embrionaria, fetal y adulta (Mackenzie 2000, Ruiz, 20003)

Hemoglobina	Cadenas	Periodo en el que normalmente se encuentran
A	α_2/β_2	La mayor hemoglobina en la vida adulta
A2	α_2/δ_2	Hemoglobina menor en la vida adulta, menor aún en la vida fetal y neonatal.
F	α_2/γ_2	Hemoglobina menor en la vida adulta; o mayor en la vida fetal; declina en el α_2/γ_2 periodo neonatal.
Gower 1	ζ_2/ϵ_2	Embrionaria
Gower 2	α_2/ϵ_2	Embrionaria
Pórtland 1	ζ_2/γ_2	Embrionaria
Pórtland 2	ζ_2/β_2	Embrionaria

5.1.5 Funciones de los dominios de la cadena beta.

El presente trabajo se basará en alteraciones en el gen de la β -globina, es por ello que solo se mencionarán las funciones de los dominios de la cadena beta. Existen tres dominios funcionales y estructurales que se pueden distinguir en todas las cadenas de globina que corresponden a los tres exones del gen, dos dominios que están constituidos por los aminoácidos del 1 al 30 y del 105 al 146 que son codificados por los exones 1 y 3 respectivamente y que se encuentran en el exterior formados principalmente de aminoácidos hidrofílicos. Un tercer dominio que comprende los aminoácidos del 31 al 104 se extiende dentro de la molécula, codificado por el exón 2 el cual contiene el sitio de unión de oxígeno y consiste principalmente de aminoácidos hidrofóbicos, (Figura 7) *Passarge, 2007*.

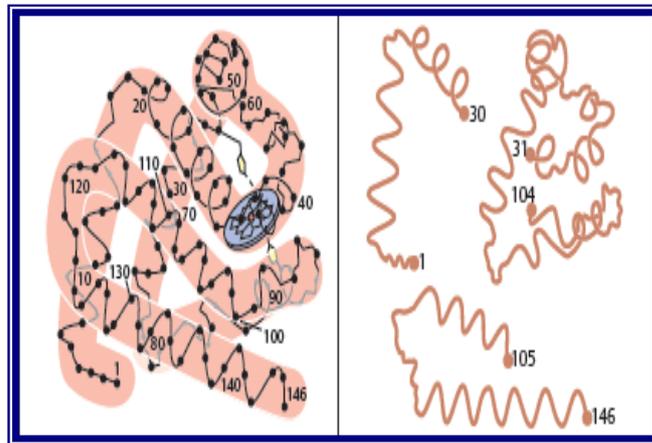


Figura 7. Constitución de los dominios de la cadena de beta globina. En la Izquierda se observa la estructura de la cadena de la beta globina y a la derecha sus tres dominios *Passarge, 2007*.

5.2 Hemoglobinopatías (Hbps)

Se llaman hemoglobinopatías a las enfermedades clínicas resultantes de una anomalía genéticamente determinada de la estructura o síntesis de la molécula de hemoglobina. La porción Hem de la molécula es normal, la anomalía se vincula con la cadena de globina que puede ser un defecto cuantitativo en su síntesis, o cualitativo siendo un defecto de tipo estructural.

Las moléculas de hemoglobina cualitativamente anormales, son el resultado de mutaciones genéticas que implican pérdida o sustituciones de aminoácidos en la cadena de la globina. Estas mutaciones son causa de variación estructural en alguno de los tipos de cadena, el trastorno clínico más común en este tipo de mutación es la anemia de células falciformes (ACF) en tanto que los trastornos cuantitativos de la globina son consecuencia de varios defectos genéticos que producen disminución o ausencia de la síntesis de cadenas de globina estructuralmente normales, el trastorno más común en este caso son las talasemias ^{Mackenzie, 2000}.

En la actualidad, aproximadamente un 5% de la población mundial es portadora de un gen de la hemoglobina potencialmente patológico, es decir, personas sanas que han heredado sólo un gen mutante de uno de sus progenitores. Cada año nacen en todo el mundo aproximadamente 300 000 niños con talasemia (30%) o ACF (70%). Debido a la mayor frecuencia de la anemia de células falciformes en algunas regiones, el número de recién nacidos afectados por esta enfermedad es mayor que el de los afectados por la talasemia ^{Lynn, 2004 y OMS 2006}.

La expresión clínica de las hemoglobinopatías varía según el tipo de cadena de globina implicada, ya sea α , β , γ o δ ; algunas no producen signos ni síntomas clínicos de enfermedad y sólo se identifican a través de estudios en población diseñados especialmente para descubrir portadores silenciosos.

La mayoría de las variantes de la hemoglobina se producen como resultado de mutaciones puntuales en uno de los genes estructurales como se muestra en la figura 7. Existen ciertas sustituciones en sitios críticos de interacción, que llegan a alterar la estructura de la molécula de hemoglobina de manera tal que se afecta sustancialmente su función, solubilidad o estabilidad.

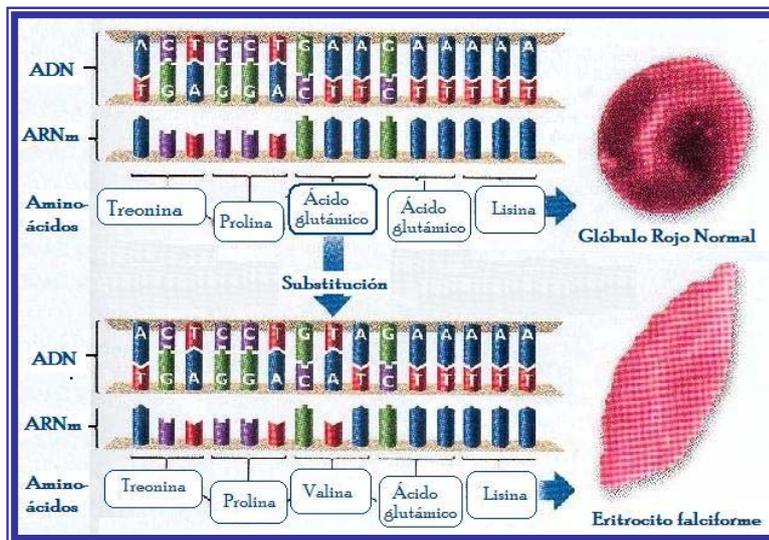


Figura 7. Cambio de una base en la secuencia provocando un DNA mutante ^{Yesyd Rodríguez, 1996}.

La mayoría de las hemoglobinopatías resultan de la sustitución de un aminoácido, sin embargo, en menor proporción, también pueden encontrarse otras variaciones estructurales más complejas de la molécula, como la sustitución de dos aminoácidos, la delección de uno o más aminoácidos, el alargamiento de una cadena polipeptídica y las fusiones de cadenas. Hasta 1998 se informaron 715 variantes de la molécula de la hemoglobina y éstas se resumen en la tabla 2 ^{Ruiz, 2003}.

Tabla. 2 Número de hemoglobinas anormales informadas en la literatura hasta 1998. (Ruiz, 2003)

Variantes	No. Informados
Variantes cadena α	208
Variantes cadena β	343
Variantes cadena γ	70
Variantes cadena δ	29
Hemoglobinas fusionadas	10
Hemoglobinas con eliminaciones y/o inserciones	22
Hemoglobinas con cadenas de polipéptidos extendidas	13
Hemoglobinas con más de una mutación en punto	20
	Total 715

Las principales hemoglobinopatías se originaron como mutaciones puntuales en África en primer lugar, seguida de Asia y Europa. Dos de las más frecuentes son anemia de células falciformes o drepanocitosis y la talasemia α y β . El mutante falciforme alcanza su mayor frecuencia en el centro de África. La talasemia mayor es frecuente en China y el mediterráneo *Turgeon, 2006*.

V.2.1 Nomenclatura de las hemoglobinopatías

La primera hemoglobina anormal descubierta se llamó HbS (S del inglés sickle) porque se vinculó con los eritrocitos en forma de media luna. De manera subsecuente se descubrieron otras variantes y recibieron letras sucesivas del alfabeto a partir de la letra C de acuerdo con la movilidad electroforética, la letra B no se usó para evitar confusión con el sistema ABO. Al descubrirse cada vez más variantes, se reconoció que el sistema alfabético no era suficiente y era necesario otro sistema de nomenclatura, a las Hbps subsecuentes se les dieron nombres comunes de acuerdo con el área geográfica en el cual se descubrieron, ejemplo Hb México.

En una reunión internacional se acordó que todas las variedades reciban una designación científica que incluye lo siguiente:

1. La cadena mutada
2. La posición afectada del aminoácido
3. La posición en la hélice de la mutación
4. La sustitución del aminoácido

Ejemplo: HbS se puede designar como $\beta^6 (A3) \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$

A continuación se presentan las hemoglobinopatías más comunes:

- ◆ Hb SS (Anemia de células falciformes)
- ◆ Hb SA (Rasgo de células falciformes)
- ◆ Enfermedad o rasgo de Hb C
- ◆ α talasemia
- ◆ β talasemia
- ◆ Combinación de dos alteraciones moleculares o una anomalía molecular y un defecto en la síntesis, como es el caso de Hb SC y Hb S- \square talasemia. *Ruiz, 2003*.

5.3 Anemia de células falciformes (ACF)

La Anemia de células falciformes o conocida también como drepanocitosis, es una grave anemia hemolítica asociada a muchas complicaciones; tiene una frecuencia del 40% en africanos, 8% negros inmigrantes en América, en América Central y del Sur con una alta frecuencias de mezclas raciales se puede tener una prevalencia del 6% y es una importante causa de morbilidad y mortalidad en las regiones donde se presenta *Jaramillo, Pereira, 1997*. Se transmite por herencia autosómica recesiva y puede ser de tipo homocigoto (HbSS) o doble heterocigoto (HbS β tal) y sufren de anemia drepanocítica *Ruiz, 2003*.

Los sujetos heterocigotos (A/S) se designan como portadores o con rasgo drepanocítico que pasan desapercibidos y pueden ser fácilmente identificados por electroforesis de hemoglobinas (Figura 8) *Passarge, 2007*. La anemia de células falciformes en homocigotos HbSS, es la forma más frecuente de hemoglobinopatía, alteración heredada de un gen falciforme de ambos padres. La esperanza media de vida en varones es de 42 años y en mujeres de 48 años *Turgeon, 2006*.

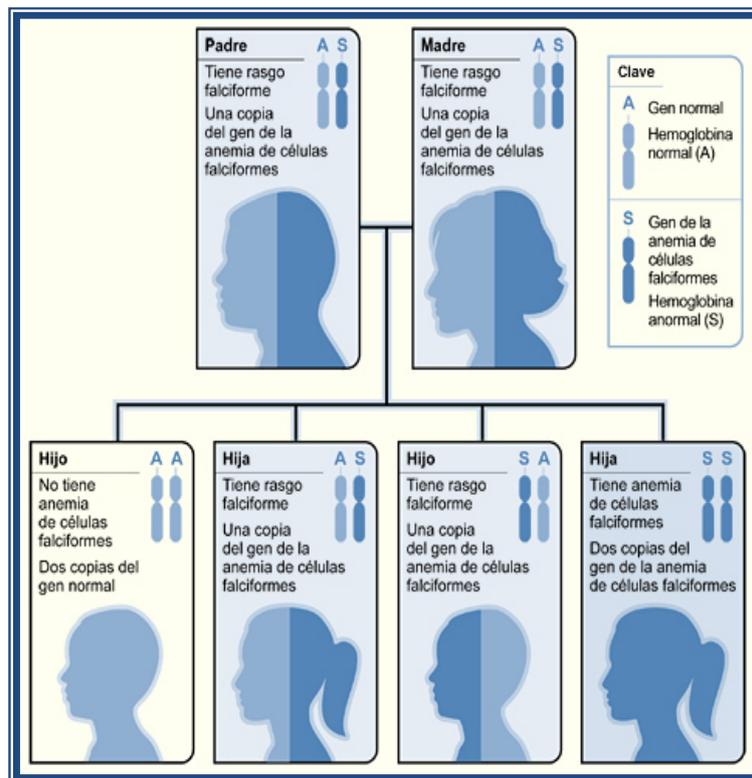


Figura 8. Modo de herencia de la Anemia de células falciformes ^{DCI}.

La hemoglobina S se debe a la mutación de Adenina por Timina en el sexto codón del gen beta globina que cambia el aminoácido ácido glutámico polar por el aminoácido Valina no polar, en la hélice A3 de la cadena β ($\beta 6(A3)$ Glu > Val) provocando graves consecuencias (Figura 9).

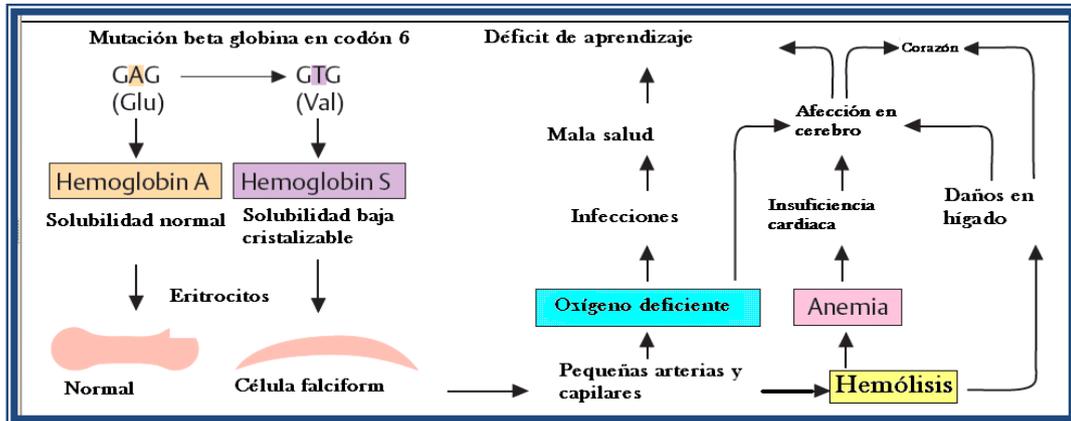


Figura 9. Mutación que conduce a HbS ^{Passarge, 2007}.

Esta sustitución se realiza en la superficie de la molécula y produce un cambio en la carga neta, en consecuencia, cambia la movilidad electroforética de la molécula disminuye de manera notable la solubilidad de la hemoglobina S en el estado desoxigenado y produce una tendencia de las moléculas de desoxihemoglobina S a polimerizar en agregados rígidos, después de la polimerización, las moléculas asumen la forma de media luna, ver Fig. 10

Mackenzie, 2000

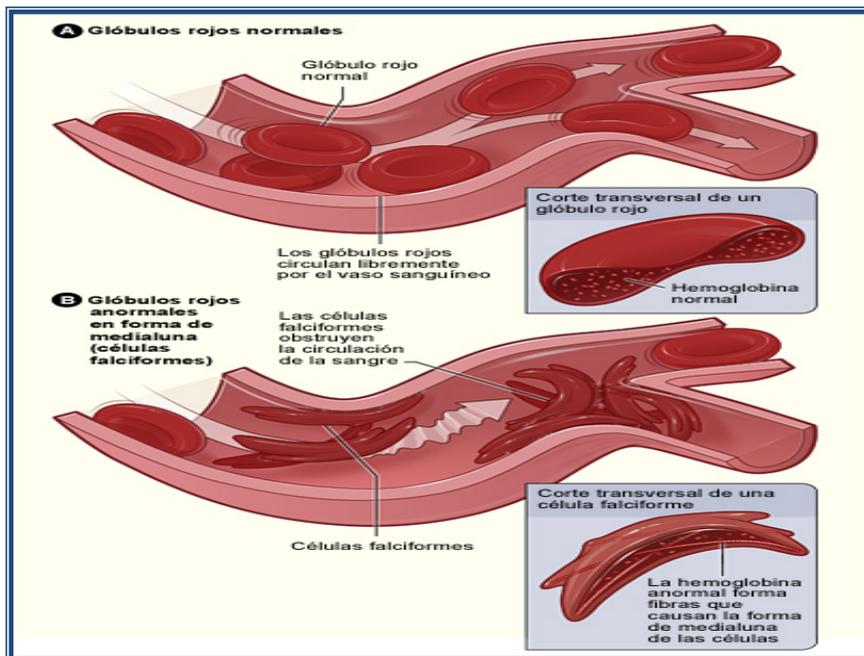


Figura 10. Formación de agregados o fibras que causan la forma de media luna en el eritrocito ^{DCI}.

5.3.1 Fisiopatología

En la anemia de células falciformes la membrana eritrocitaria tiene alteraciones significativas, el aumento excesivo en el calcio ionizado en la célula participa en esta anomalía, en la célula con hemoglobina SS el calcio ionizado alcanza un nivel dos veces mayor del normal. La deformación falciforme se fomenta con la tensión baja de oxígeno, pH bajo y pérdida de agua celular, de manera que al desoxigenarse se polimeriza y vuelve rígidos a los eritrocitos lo que impide que la sangre circule normalmente por los tejidos y se produce estancamiento como se puede ver en la figura 11 ^{Ruiz, 2003 y Turgeon, 2006}.

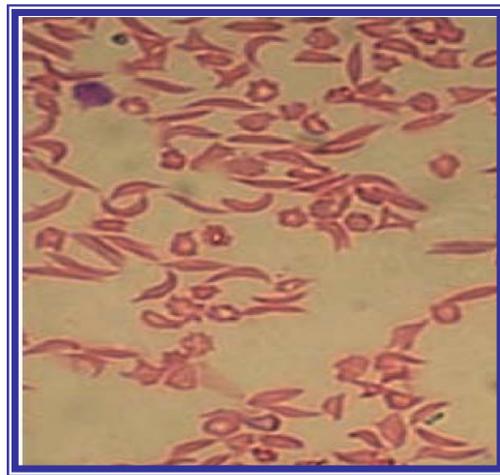


Figura 11. Estructura de las células falciformes en un frotis sanguíneo ^{Passarge, 2007}.

5.3.2 Rasgo drepanocítico

El rasgo falciforme o drepanocítico no es un trastorno tan grave como la enfermedad drepanocítica, puesto que la presencia de la HbA u otra variante estructura de la cadena beta de la hemoglobina interfiere con el proceso de polimerización. Esto sujetos son habitualmente asintomáticos, no obstante es conveniente descubrirlos porque alguno puede llegar a sufrir sintomatología que pueden ocurrir cuando los portadores se exponen a situaciones de hipoxia prolongada (procesos neumónicos, viajes en avión). De manera excepcional se llegan a encontrar drepanocitos en frotis sanguíneos.

5.4 β -Talasemia

La talasemia es un desorden autosómico recesivo muy común causado por más de 200 mutaciones diferentes en el gen de la beta globina, causando anemia crónica de varios grados de severidad dependiendo si es mayor, intermedia o menor ^{Malcorra, 2001}. La primera descripción clínica de la talasemia la realizó Thomas Cooley en Detroit en 1925, en 1960 era aparente que las talasemias eran un grupo heterogéneo de trastornos genéticos causados por la disminución o ausencia de formación de una cadena de globina. Se clasifican en α -talasemia, β -talasemia y además existe una fusión inestable $\delta\beta$ -globina ^{Passarge, 2007}.

En la β -talasemia puede haber alteraciones homo o heterocigoto en los genes β que pueden diferir entre sí en la extensión del bloqueo de la síntesis de cadena β . Existen dos variedades del gen que se han denominado β^+ y β^0 , la mutación del gen β^+ produce un bloqueo parcial en la síntesis de la cadena β . La mutación en el gen β^0 produce una ausencia completa de la síntesis de la cadena β o una proteína pequeña deficiente en función. La existencia de dos mutaciones del gen de la cadena β -talasemia ayuda a explicar la variabilidad en las concentraciones de la HbA y de la HbS en paciente heterocigotos para β^S y β^{tal} . Las personas que tienen el genotipo β^S/β^{0-tal} producen ambas Hbs alteradas, pero no la Hb normal (HbA), mientras que aquellos con el genotipo β^S/β^{+tal} producen alguna cantidad de la Hb alterada junto con la HbS.

La β -talasemia se debe pocas veces a pérdida del gen estructural, la mayor parte de los defectos son mutaciones puntuales en las regiones controladoras de la expresión del gen β . Las mutaciones pueden afectar cualquier etapa en la vía de expresión del gen de la globina, incluso la transcripción del gen, la transformación del RNA o el traslado del mRNA y la integridad postraslacional de la proteína.

Normalmente se sintetizan cantidades iguales de las cadenas α y β por eritrocitos en maduración lo cual da lugar a una relación de las cadenas β y α de 1:1. En la β -talasemia la síntesis de cadenas β está disminuida o ausente y da lugar a un exceso de cadenas α libres. En la talasemia heterocigota la relación de cadena β a α es de 0.5 a 0.7; mientras en la homocigota la relación es inferior a 0.25, esta síntesis desequilibrada de cadenas α y β tiene varios efectos adversos: 1) disminución en la producción de hemoglobina total del eritrocito, 2) eritropoyesis ineficaz y 3) proceso hemolítico crónico ^{Harrison, 2002 y Malcorra, 2001}.

En los homocigotos, la síntesis desequilibrada de α y β -globina causa la acumulación de cadenas α no emparejadas muy insolubles, que forman cuerpos de inclusión tóxicos que destruyen en el interior de la médula ósea a los precursores de los eritrocitos, son pocos los preeritroblastos que inician la maduración eritroide que sobreviven, los escasos eritrocitos supervivientes son portadores de una carga de cuerpos de inclusión, que se detecta en el bazo lo que acorta su supervivencia y genera una grave anemia hemolítica ^{Harrison, 2002}.

Con el advenimiento de la biología molecular, las talasemias se han estudiado ampliamente por muchos grupos de investigadores. Métodos desarrollados durante los últimos veinticinco años permiten a los investigadores medir la cantidad de cadenas de globina sintetizadas e identificar mutaciones genéticas específicas. Los estudios genealógicos revelan que las talasemias se heredan de manera mendeliana autosómica dominante. La variabilidad de expresión genética tal vez se vincula con las múltiples mutaciones distintas que conducen a la talasemia, y con la interacción del gen de talasemia con otros codificadores genéticos o adquiridos.

Las talasemia beta se originan, en general, por sustituciones de un solo par de bases, más que por deleciones, existen tantas mutaciones diferentes de talasemia beta que las personas que tienen dos de estos alelos es más probable que sean compuestos genéticos que verdaderos homocigotos para un solo alelo. Los términos talasemia mayor, intermedia y menor son utilizados para indicar la gravedad de las manifestaciones clínicas y no necesariamente indican heterocigotos u homocigotos. ^{Ruiz, 2003 y Nussbaum, 2004}.

5.4.1 Talasemia Menor

Estos individuos tienen eritrocitos hipocrómicos microcíticos, esplenomegalia y pueden presentar una leve anemia que podría confundirse inicialmente con una deficiencia de hierro. El diagnóstico de talasemia menor puede confirmarse con electroforesis de la hemoglobina, donde suele haber un incremento del valor de HbA₂.

5.4.2. Talasemia Intermedia

Los pacientes de éste tipo de talasemia se caracterizan por presentar anemia moderada, eritropoyesis infectiva, microcitos, morfología anormal de los eritrocitos, esplenomegalia sobrecarga de hierro, pero no requieren de transfusiones.

5.4.3 Talasemia Mayor

También conocida como anemia de Cooley en honor a Thomas Cooley que realizó la primera descripción clínica. Se distingue por provocar una anemia grave que requiere de atención médica toda la vida, aquí se puede tener el gen β^0 sin la formación de la Hb A₁, o bien el gen β^+ con poca producción de Hb A₁. Además de la anemia se encuentran otras complicaciones como daño orgánico en corazón, hígado, etc; sobrecarga de hierro, eritropoyesis extramedular y hepatoesplenomegalia ^{Turgeon, 2006}.

A continuación se muestra en la figura 12 la diferencia de un frotis sanguíneo normal y uno de un portador de beta-talasemia, en donde los glóbulos rojos se encuentran más pequeños, en mayor cantidad y pálidos (hipocrómicos) que están asociados con esta enfermedad.

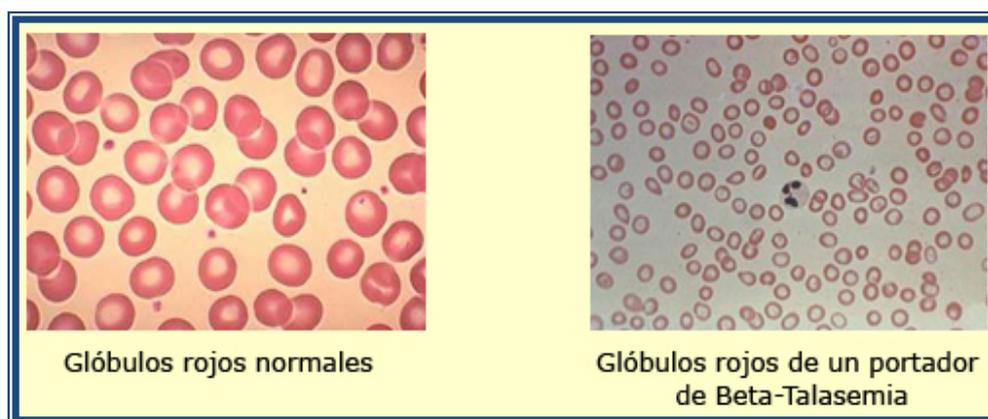


Figura 11. Características comparativas de los glóbulos rojos en un frotis sanguíneo. Del lado izquierdo se muestran los glóbulos rojos normales y del derecho los de un portador de beta-talasemia ^{Fundación Argentina de talasemia, 1999}.

5.5 Hb S / Talasemia β ($Hb S\beta^{tal}$)

Dentro del grupo de las Hemoglobinopatías designadas como enfermedad drepanocítica, se encuentran los dobles heterocigotos o heterocigotos compuestos, en donde uno de los padres aporta el gen S y el otro alguna otra variante anormal, en este caso, el de la β -tal.

En la hemoglobinopatía Hb S β tal se distinguen tres tipos clínicos:

1. Pacientes que padecen manifestaciones clínicas leves, con una proporción de HbA que oscila entre 15 y 30% y se designan como S-talasemia β^{++} .

2. Pacientes que sufren de manifestaciones clínicas graves similares a las de los pacientes con SS, no sintetizan HbA, se conocen como S-talasemia β^0 .

3. Este tipo de hemoglobinopatía incluye a los enfermos con manifestaciones clínicas intermedias que sintetizan una proporción también intermedia de Hb A, alrededor de 15% y se designan como Hb S β^{+tal} *Shinton, 2008*.

La HbS β tal puede diagnosticarse mediante el examen de un frotis sanguíneo, donde se pueden observar eritrocitos hipocrómicos y microcíticos con policromatofilia, y con la electroforesis de la Hemoglobina, en la cual se ha visto que 60-90% es HbS y 10-30% HbF.

5.6 México y las hemoglobinopatías

En México, las encuestas practicadas en algunas zonas de la República Mexicana, específicamente en algunos lugares ubicados en las costas del Golfo y del Pacífico, han descubierto algunos sitios con alta prevalencia de portadores de hemoglobina S y β -talasemia. También se han descubierto tres nuevas variantes de la molécula., las hemoglobinas México, Chiapas y Colima e identificado otras hemoglobinas anormales por medio de encuestas o estudiando enfermos con síndromes hemolíticos. Lisker y colaboradores demostraron que en ciertas zonas de las costas del Golfo y el Pacífico, la Hb S es frecuente y que existen algunas poblaciones con alta prevalencia de portadores.

En México la prevalencia de portadores de talsemia β no debe considerarse como poco frecuente, se han identificado grupos de población en los que la prevalencia de talasemia β es de 15%, con datos que sugieren que es autóctona y en otras poblaciones que orientan a considerarla como importada del área del Mediterráneo. En la tabla 3 se indican los resultados de una investigación prospectiva de hemoglobinas anormales en 1812 sujetos efectuada en el lapso de 15 años (1987 y 2002) en los laboratorios clínicos de Puebla, en muestras de sangre referidas de diversas partes de la República Mexicana, para descartar anomalías de la hemoglobina.

Tabla. 3 Presencia de Hemoglobinopatías en México. (Ruiz, 2003).

Condición	Número	%
Talasemia β Heterocigotos Homocigotos	337 4	71.2
Talasemia compuesta HbS β^{tal} HbS β^{tal} /PHHF Talasemia δ/β	14 1 1	3.3
Hemoglobina S Heterocigotos Homocigotos	66 49	24.0
Otras	6	1.4
TOTAL	478	99.9

Nota: PHHF: Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal

Puede apreciarse la prevalencia de talasemia β heterocigota, homocigota y sus combinaciones con otras variantes de la hemoglobina (Hb SC, Hb S β^{tal}), ocupa 74.5% de todas las anomalías de la hemoglobina detectadas y que tres de cada 4 sujetos con alguna alteración de la Hb son heterocigotos, homocigotos o heterocigotos compuestos de talasemia β . Resultados análogos se obtuvieron en Guadalajara en un grupo de enfermos con procesos hemolíticos. En el 2003 la Gaceta Médica de México publicó un artículo en el cual se menciona que la talasemia β está presente en 67 % y 76 % de los pacientes con desórdenes de la hemoglobina estudiados en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente y en los Laboratorios Clínicos de Puebla respectivamente. Los datos anteriores permiten concluir que la talasemia β no es infrecuente en México, como durante mucho tiempo se pensaba ^{Ruiz, 2003}.

Estudios realizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez han demostrado que el mayor número de casos de enfermedad drepanocítica provienen de los estados de Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Tabasco, que son los estados en los que los estudios realizados previamente han mostrado tener poblaciones con el más alto índice de portadores de hemoglobina S, la causa de la drepanocitosis, tomado de la página web del HIMFG. La figura 12 muestra una grafica representativa de lo mencionado anteriormente.

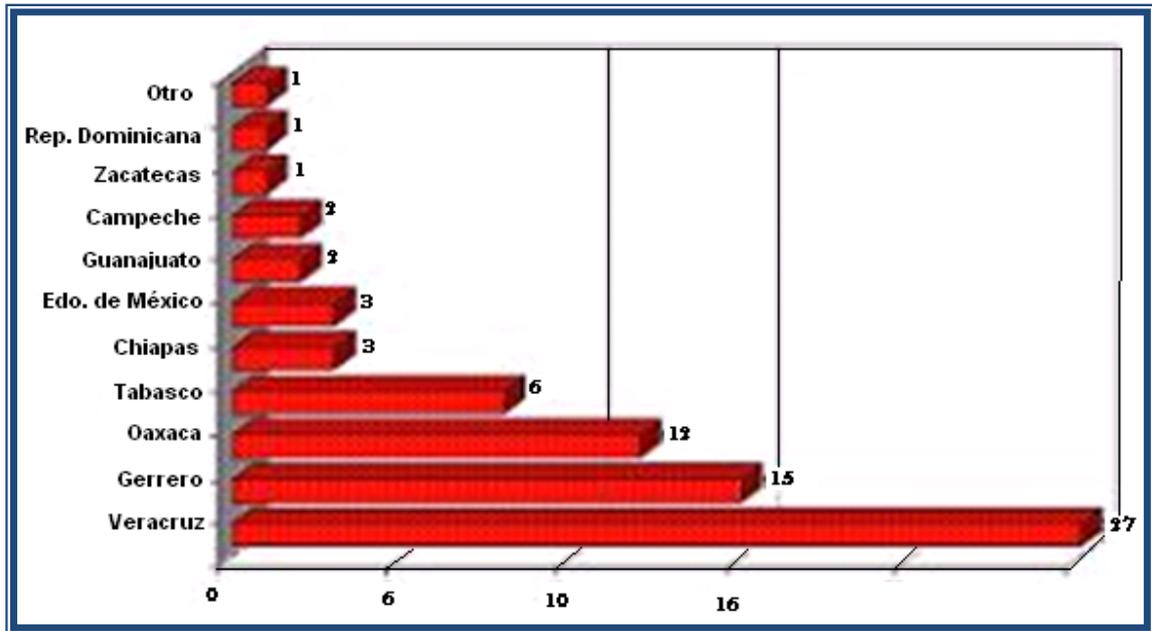


Figura12. Procedencia de enfermedad deprimaria en Hospital Infantil de México Federico Gómez

VI. Objetivos

- ◆ Realizar el análisis molecular del gen de la beta-globina en pacientes pediátricos que presentan severo cuadro clínico y que han sido diagnosticados con anemia de células falciformes, para darles un diagnóstico más específico.
- ◆ Mediante la secuenciación del gen beta globina identificar la mutación Hb S (Glu>Val), así como nuevas alteraciones moleculares que puedan estar interviniendo en la enfermedad.
- ◆ Conocer más acerca de la constitución molecular de la población mexicana, identificando la procedencia de las mutaciones que presenten los pacientes en estudio.

VII. Hipótesis

- ◆ Sí además de la mutación beta-S existen otras mutaciones en el gen beta-globina éstas pueden estar provocando el cuadro clínico severo que presentan los pacientes.

VIII. Materiales y Métodos

8.1 Material

8.1.1 Material Biológico

Se recibieron 8 muestras de DNA, 6 correspondían a pacientes pediátricos diagnosticados con Anemia de células falciformes y dos de familiares, todas ellas procedentes del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y se encuentran representados en la tabla 4.

Tabla.4 Información de pacientes en estudio, proporcionada por el HIMFG.

Paciente	Sexo	Edad	Procedencia	Electroforesis	Hb Total g/dl	Hb Fetal (%)
4	Masculino	10	San Marcos Guerrero	ND	ND	ND
41	Masculino	17	Michoacán	AS	7.9	4.69
50	Femenino	9	Chilpancingo Guerrero	AS	6.5	18.6
53	Masculino	9	Ecatepec Edo. de México	AS	8.9	20
66	Femenino	11	Edo. de México	SS	8.8	9.11
67	Masculino	5	Llano Grande Oaxaca	SS	ND	ND
68	Femenino ^a	---	Llano Grande Oaxaca	AS	ND	ND
102	Femenino ^b	----	Edo. México	AS	ND	ND

a) Madre de paciente 67, b) Madre del paciente 66 y ND. No determinado

8.1.2 Material Instrumental

- ◆ Tubos al vacío con EDTA (tapa lila)
- ◆ Torundas de algodón
- ◆ Jeringas (5 ml)
- ◆ Ligadura
- ◆ Tubos eppendorf (200 µl, 600 µl y 1.5 ml)
- ◆ Micropipetas (0.1-2.0 µl, 1-20 µl, 20-200 µl y 200-1000 µl)
- ◆ Puntas para micropipetas (0.1-2.0 µl, 1-20 µl, 20-200 µl y 200-1000 µl)
- ◆ Gradillas para tubos eppendorf

- ◆ Marcador indeleble
- ◆ Guantes de latex o nitrilo
- ◆ Matraz Erlenmeyer 150 ml
- ◆ Probeta graduada 100 ml
- ◆ Peines para cámara de electroforesis
- ◆ Espátula

8.1.3 Equipos

- ◆ Centrifuga para tubos de ensaye
- ◆ Balanza analítica
- ◆ Campana UV para PCR
- ◆ Termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf)
- ◆ Cámara de electroforesis horizontal (Bio Rad)
- ◆ Fuente de poder para electroforesis
- ◆ Centrifuga para tubos eppendorf (Eppendorf)
- ◆ Transiluminador UV (Bio Rad)
- ◆ Concentrador (Concentrator 5301 Eppendorf)
- ◆ Nanodrop

8. 2 *Reactivos*

Extracción de DNA (ver anexo)

- ◆ Solución de lisis
- ◆ NaCl 5 mM y solución saturada
- ◆ SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)
- ◆ Etanol 70 y 100 %
- ◆ Agua inyectable

Electroforesis horizontal Ver anexo

- ◆ Agarosa
- ◆ Buffer
- ◆ TAE 1 X

- ◆ Bromuro de Etidio
- ◆ Colorante de carga

Reacción en Cadena de la Polimerasa

- ◆ Buffer para 10 X PCR (Invitrogen)
- ◆ Cloruro de Magnesio 25 mM (Invitrogen)
- ◆ dNTPs 2 mM (BIOGENICA)
- ◆ Taq polimerasa 5 u/μl (BIOGENICA)
- ◆ Agua inyectable
- ◆ 2 pares de oligonucleótidos, primer o cebadores. Un par corresponde al exón 1 y 2 y el segundo al tercer exón, los datos de cada uno de ellos se pueden ver en la tabla 5.

Tabla.5 Datos de Oligonucleótidos (primers o cebadores) utilizados para la amplificación del gen de beta globina.

Primer	Orientación	Secuencia (No. Bases)	Tamaño de Amplificación	(T _m) °C
BG1,2 (Exón1,2)	Sentido (Forward)	TGG GCA TAA AAG TCA GGG C (19)	543 (Pb)	56.0
	Antisentido (Reverse)	TAG ACT CAC CCT GAA GTT CAC AG (23)		
BG3 (Exón 3)	Sentido (Forward)	GCT ACA ATC CAG CTA CCA TT (20)	482 (Pb)	56.0
	Antisentido (Reverse)	TGT TTT AAA TGC ACT GAC CTC (21)		

Nota: T_m. Temperatura de fusión

Purificación del producto de PCR

- ◆ Kit de purificación (Kit QIAquick PCR)
 - Buffer de unión
 - Buffer de lavado
- ◆ Agua Inyectable

Secuenciación

- ◆ Buffer (BigDye[®] Terminator v3.1 5X sequencing buffer)
- ◆ BigDye terminator (BigDye[®] Terminator v3.1)
- ◆ Primer (Sentido o antisentido)
- ◆ Producto de PCR purificado
- ◆ Agua inyectable
- ◆ Kit de purificación de BigDye (Dyex[™] 2.0 Spin Kit 250 for dye-terminator renewal Qiagen)

8.3 Métodos

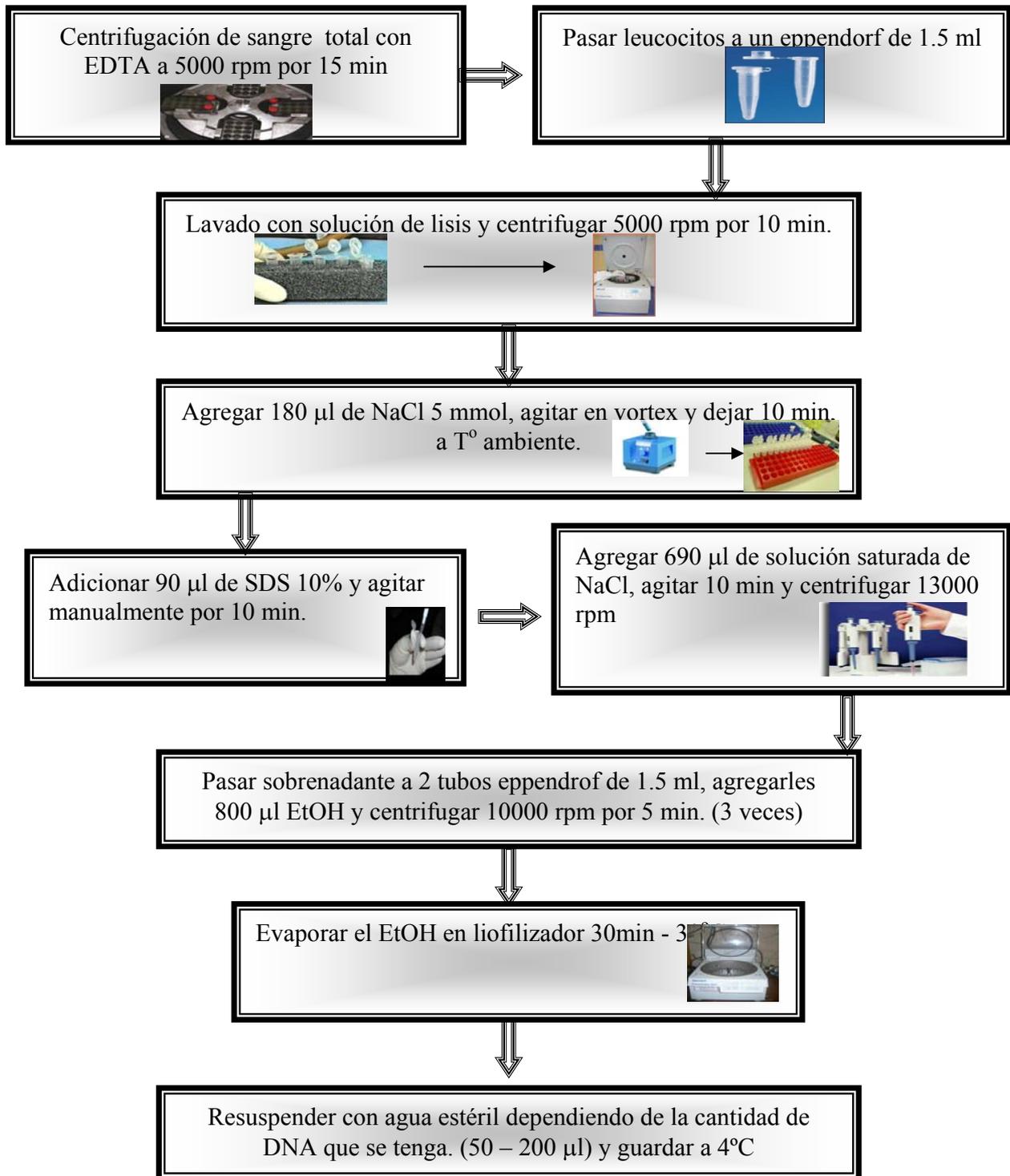
Se recibió el DNA previamente extraído en el HIMFG de sangre periférica en tubos al vacío con anticoagulante EDTA en condiciones estériles, posteriormente se realizó la extracción de DNA. Se mencionará el método de extracción que se emplea en la Unidad de Investigación en Genética Humana de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

8.3.1 Extracción de DNA (Concentración de sales)

8.3.1.1 Fundamento

La técnica empleada es por el método de concentración de sales, que se basa en las diferencias de solubilidad del DNA en función de las concentraciones de sales, para que finalmente se llegue a la liberación de los Ácidos nucleicos. La solución de lisis rompe los restos de eritrocitos dejando intactos a los leucocitos, el NaCl 5 mM (solución hipotónica) hidrata la célula de los leucocitos para que el detergente SDS 10 % rompa su membrana liberando el DNA, la solución saturada de NaCl precipita las proteínas como son las Histonas y no Histonas. El Etanol al 100 % insolubiliza el DNA y es posible de visualizar, el de 70 % libera al DNA de todas las sales que se encuentren en el medio y finalmente en el agua estéril se disuelven los ácidos nucleicos (11). Es de suma importancia mencionar que en todo el procedimiento es necesario utilizar guantes de látex o nitrilo para proteger al DNA de las DNasa que se encuentran presentes en las manos y vez extraído el DNA guardar a una temperatura de 4°C si se va a utilizar o bien a -20 °C si no se utilizará.(1).

8. 3.1.2 Diagrama de flujo de extracción de DNA



Nota: En cada uno de los protocolos es de suma importancia rotular perfectamente los eppendorf

8.3.1.3 Cuantificación de DNA

Para la cuantificación del DNA extraído se hace uso de un aparato llamado nanodrop, el cual mide la absorbancia de la muestra y nos proporciona los siguientes datos:

- 1.- Cantidad de DNA en ng/ μ l
- 2.- Relación en entre la absorbancia 260/280 nm

La relación entre las lecturas a 260/280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácido nucleicos, preparaciones puras de DNA arrojan valores de 1.8 a 2.0, mientras que valores menores a 1.8 indican contaminación por fenol o proteínas y por su parte valores mayores a 2 muestran la existencia de RNA puro.

Estos datos son necesarios, ya que para la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se necesita entre 70 a 100 ng/ μ l, además de un gran grado de pureza.

8.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para poder realizar la secuenciación del gen de la beta globina es necesario tener miles de copias del fragmento de DNA que codifican para éste gen y no el DNA completo, es por ello que se recurre a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

8.3.2.1 Fundamento

Esta técnica elaborada por el Químico Kary Mullis en 1985, se basa en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico de DNA delimitado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas (primers) con la molécula de DNA. La síntesis y copia del fragmento sucede por la acción de una DNA polimerasa, que une ácidos nucleicos sintéticos a la hebra simple de la molécula de DNA (la que resulta de la desnaturalización de la cadena doble original), formando una nueva cadena doble, posteriormente será sujeto de desnaturalización y plantillas de nuevas moléculas de DNA. *Montiel Ávila y Benítez, 2007; Necochea, 2004 y Turner, 1998*.

Los requisitos para la reacción son los siguientes:

1. La plantilla de DNA que en estudio, tales como DNA genómico o cDNA muestra de un paciente.

2. Primers o iniciadores. Uno de estos es diseñado para alinearse a la hebra con sentido y el otro a la hebra sin sentido, con sus extremos 3' apuntándose el uno al otro.
3. Los cuatro nucleótidos trifosfatados (dNTPs).
4. Una DNA polimerasa termoestable.
5. Un buffer adecuado.

La reacción de las mezclas se somete a ciclos de calentamiento y enfriamiento, que deben estar entre 25 y 40 ^{Corkcer, 2003 y Walter, 1997}. La síntesis comienza a partir de los extremos 3' hasta que la reacción es detenida mediante un aumento de la temperatura hasta el punto de fusión por segunda vez. En la tabla 6 y 7 se muestran los datos con los que se trabajó para realizar la PCR.

Tabla 6. Mezcla realizada para la PCR del gen beta globina

Reactivo	Concentración	Microlitos
PCR Buffer	10X	2.5
dNTP's	2 mM	1.0
MgCl ₂	25 mM	1.5
Primer Sentido	10 pM	1.0
Primer Antisentido	10 pM	1.0
H ₂ O inyectable	—	cbp. 25 µl
Taq Polimerasa	5 U / µL	0.25
DNA	> 70ng/µl	2
Volumen total	—	25

Tabla 7. Condiciones de reacción para la amplificación del gen de beta globina.

<i>Etapa</i>	<i>°C</i>	<i>Tiempo (min.)</i>
Inicio	94	2:00
Desnaturalización	94	0:30
Hibridación	50	0:25
Amplificación	68	0:45
Finalización	72	7:00

La reacción consta de tres etapas claves: desnaturalización de la cadena doble de DNA, hibridación de la cadena sencilla con los oligonucleótidos y elongación (amplificación, extensión) de las hebras sencillas de DNA por la acción de una DNA polimerasa a partir de un oligonucleótido. A continuación se detallará cada una de las etapas mencionadas ^{Montiel Ávila y Benítez, 2007}.

Desnaturalización: Es requerida para la obtención de hebras simples de la molécula de DNA, esta desnaturalización no es más que la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen los pares de bases y las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas al desnaturalizarse. La temperatura está generalmente entre los 68 y 97 °C, pero siempre debe ser mayor a la temperatura de fusión (T_m) de la región de DNA que se desea amplificar.

Hibridación: llamada también con palabra inglesa annealing, aquí los oligonucleótidos se unen a una región específica y complementaria del DNA original en dirección $5' \rightarrow 3'$. Las temperaturas usuales están en un rango de 37 y 65 °C, pero se requiere una temperatura adecuada que se tiene que calcular para cada pareja de primers en concreto.

Elongación: Es la etapa de amplificación propia dicha, la DNA polimerasa polimerasa se encarga de alongar los oligonucleótidos de acuerdo con la hebra sencilla de DNA que en este caso sirve de molde para generar una nueva cadena doble de DNA. El sustrato de la enzima son los desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) y como cofactor al magnesio en su forma de Cloruro de Magnesio ($ClMg_2$). La replicación se lleva a cabo en dirección $5' \rightarrow 3'$ a partir del extremo de cada cebador, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que

comience una nueva etapa de desnaturalización, al finalizar esta etapa se obtiene cadenas dobles nuevamente, pero duplicando a las que existían al principio, en la figura 13 se puede ver una representación de las etapas de la reacción.

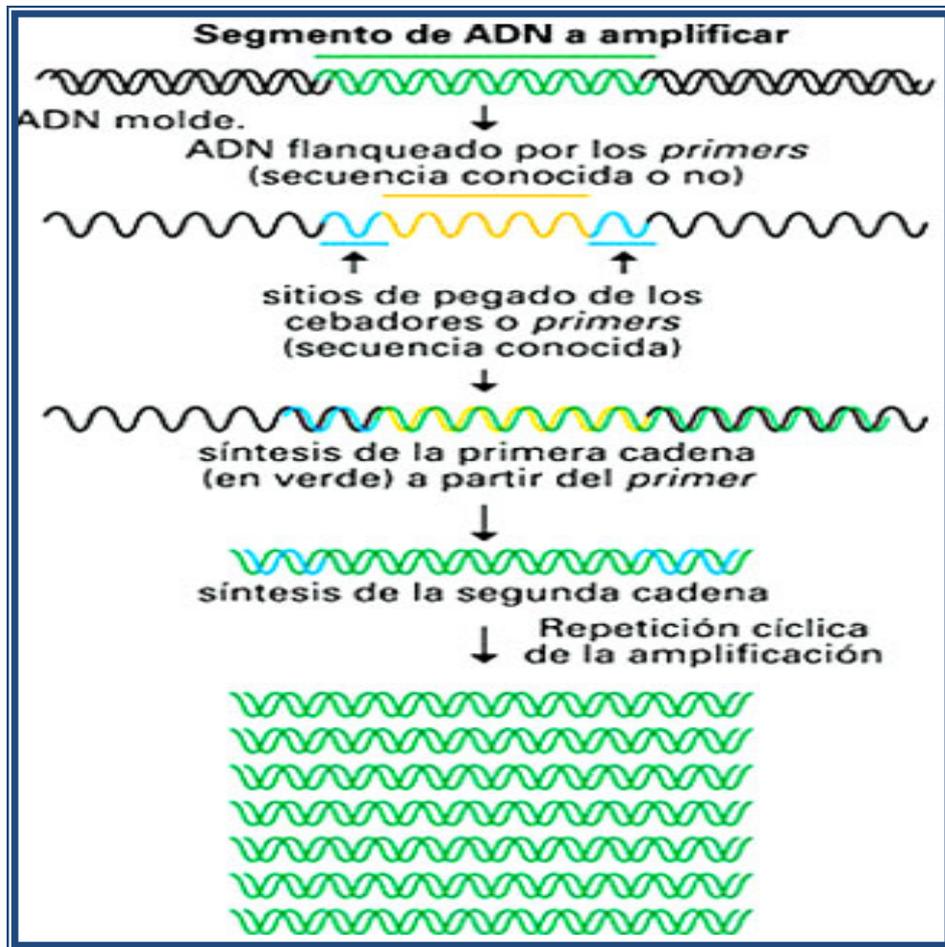


Figura 13. Mecanismo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Posik Diego M, 2007.

8.3.2.2 Diagrama de flujo de la reacción en cadena de la polimerasa

Esterilizar material en campana con luz UV




Realizar la mezcla de cada una de las muestras a trabajar, para los primers Bg1,2 y otra para los primers BG3. En base al siguiente protocolo:

<i>Componentes</i>	<i>μL</i>
Buffer 10X	2.5
dNTPs 2mM	1.0
MgCl ₂ 25mM	1.5
H ₂ O inyectable	cbp 25 μl
Taq Polimerasa 5u/μl	0.25
Primer Sentido y antisentido 10pM*	1 c/u
DNA	**



** Se colocan los μl correspondientes a una cantidad mayor 70 ng/ul de DNA



Colocar los tubos eppendorf en termociclador con las siguientes condiciones:

<i>Etapa</i>	<i>°C</i>	<i>Tiempo (min.)</i>
Inicio	94	2:00
Desnaturalización	94	0:30
Hibridación	50	0:25
Amplificación	68	0:45
Finalización	72	7:00

36
ciclos



Es importante siempre comenzar rotulando los tubos para cada una de las muestras a trabajar para un mejor control.

8.3.4 Purificación del producto de PCR

8.3.4.1 Fundamento

A los productos de PCR de beta globina (exones 1,2 y 3) se les realiza una purificación con la finalidad de eliminar todos los reactivos de la PCR y dejar puro al fragmento amplificado, para esto ya existen kits comerciales. Los sistemas comerciales de Purificación de PCR como lo son Marligen y Qiagen (Fig. 14), están diseñados para limpiar de los componentes de reacción de PCR (primers, nucleótidos, enzimas, sales, colorantes y otras impurezas) del DNA amplificado. La cadena de DNA purificado está lista para usarse en una variedad de aplicaciones tales como secuencias automáticas de DNA fluorescentes, secuencias manuales, mapas de restricción, clonados y etiquetados.



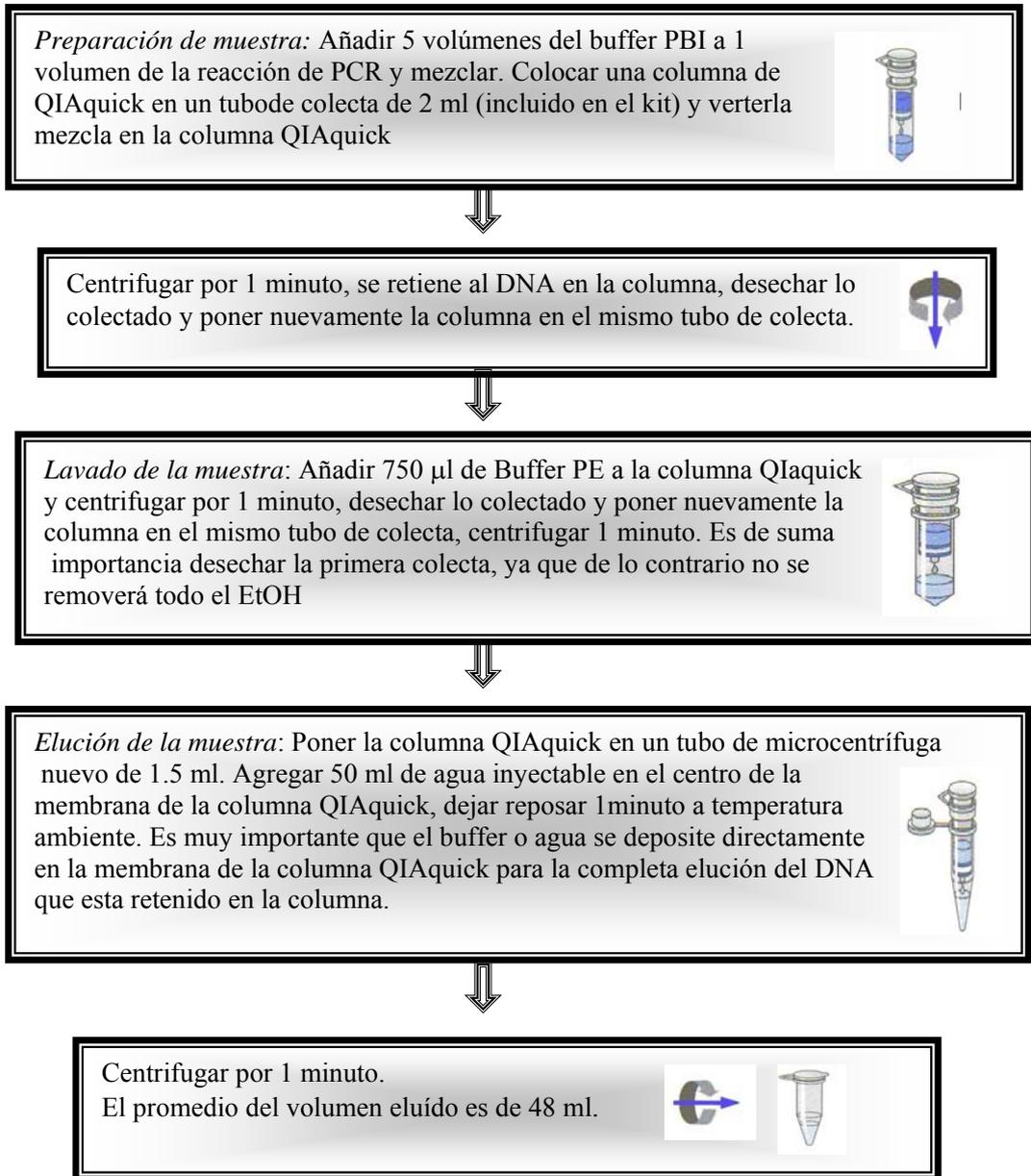
Figura14. Kit's de purificación para los productos de PCR ^{Marligen y Qiagen}.

Los componentes que del kit son:

- 1.-PBI: Buffer de unión
- 2.- PE: Buffer de lavado, para poder utilizarlo es necesario agregar 150 ml de etanol
- 3.- Buffer de elución, para su uso requiere de calentamiento a 50 °C.

Se puede sustituir al buffer de elución por agua inyectable y da los mismos resultados. Para realizar el proceso de purificación se tiene que utilizar guantes para evitar contaminación de la muestra.

8.3.4.2 Diagrama de flujo de la purificación del producto de PCR



8.3.4.3 Cuantificación del producto purificado

Al igual que en la extracción de DNA, éste producto purificado se cuantifica por medio del nanodrop para saber qué cantidad se tiene que agregar a la hora de marcarse con fluorocromos.

8.3.5 Electroforesis horizontal

8.3.5.1 Fundamento

La técnica de electroforesis horizontal es capaz de separar fragmentos que no pueden ser separados adecuadamente por otros procedimientos, se realizan en una cámara con 2 electrodos, un contenedor de gel y se vierte buffer de electroforesis (TAE 1X), ver figura 15. Los geles de agarosa de alta concentración mejoran la resolución de los fragmentos de DNA de pequeño tamaño. Por el contrario los de baja concentración permiten una mejor separación de los fragmentos de gran tamaño. A continuación se muestra en la tabla 8 como elegir el porcentaje de agarosa en base a la concentración de acuerdo al tamaño del DNA de estudio.

Tabla. 8 Concentraciones de agarosa recomendadas en base al tamaño del DNA.

Concentración % agarosa	Rango de DNA (Kb)
0.8	0.8 – 10
1.0	0.4 – 8
1.2	0.3 – 7
2.0	0.1 – 3

Para su preparación es utilizado el Bromuro de Etidio (BrEt) el cual es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción de DNA en el gel, esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión tipo van der Waals con las bases de la cadena. La posición arreglada de la molécula y su proximidad a las bases causa que el colorante exhiba un campo fluorescente. En cuanto al colorante o buffer de carga tiene tres funciones: 1) incrementar la densidad de la muestra, 2) asegurar que el DNA descienda uniformemente en el posillo y 3) añadir color a la muestra, este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico Aránega y cols, 2002 y Montiel, Ávila y Benítez, 2007.

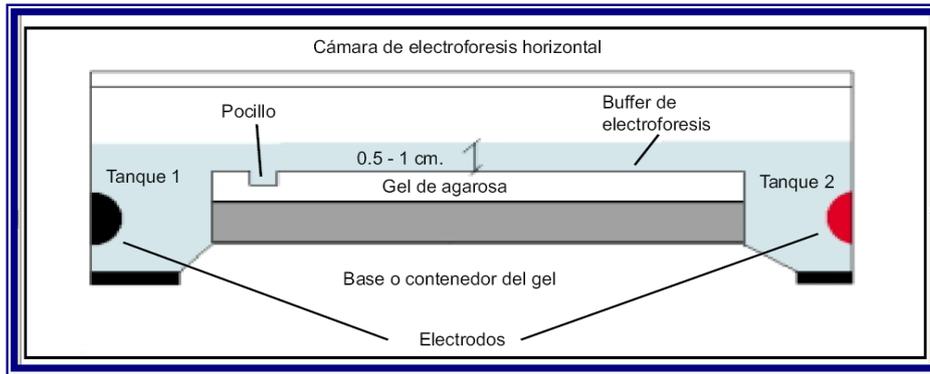
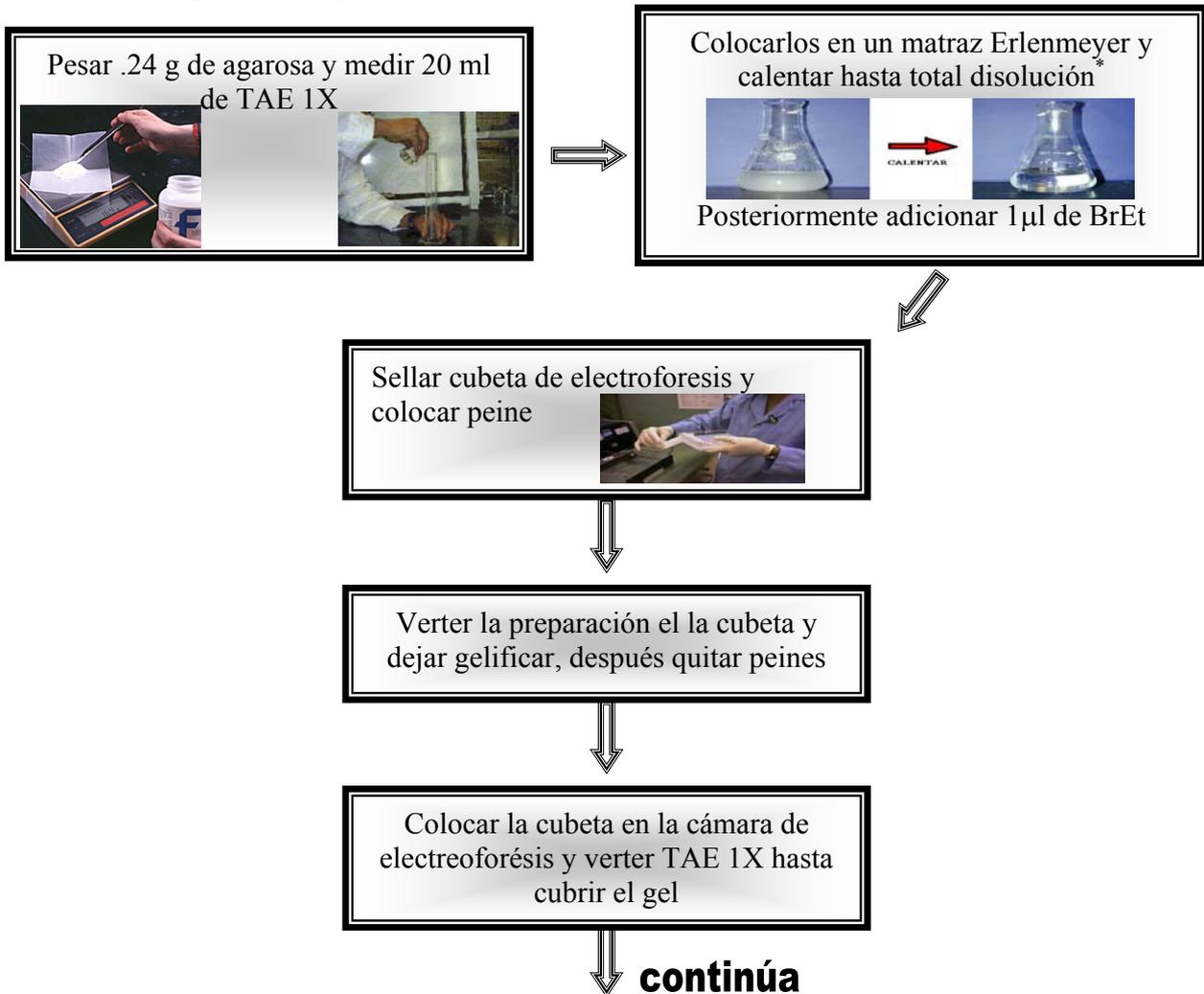


Figura 15. Corte sagital de un sistema de electroforesis horizontal en gel de agarosa ^{Watson, 2006 y Yábar, 2006}

8.3.5.2 Diagrama de flujo de electroforesis horizontal

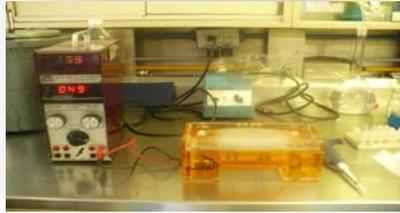


Continuación diagrama de flujo de electroforesis horizontal

En un papel parafilm colocar 2 μ l de colorante, posteriormente adicionar 2 μ l de la muestra y colocarla en un pozo del gel, lo mismo se realizará con cada una de las muestras y al final se colocara en un pozo un marcador de pares de bases.



Conectar a la fuente de poder y correr a 120 volts por 20 minutos.



Leer el gel con luz ultravioleta en analizador de imágenes



Este protocolo es para DNA total, PCR y su purificado.

8.3.6 Secuenciación de los fragmentos amplificados del gen beta globina

8.3.6.1 Fundamento

Para la secuenciación se necesitan varios pasos el primero de ellos es el marcar al DNA con fluorocromos, en este trabajo se utilizó el marcado por medio de un nucleótido terminal, en el que los nucleótidos marcados responsables de la terminación se llaman dideoxinucleótidos (ddNTP), esto asegura que todas las cadenas sintetizadas a partir de una plantilla lleven incorporado una sola marca en el mismo lugar (al final de la cadena, en el extremo 3'), de esta manera se obtienen fragmentos que producen bandas uniformes y cuyas secuencias se pueden determinar más fácilmente. Una ventaja adicional de tener el nucleótido terminal marcado es que se pueden usar nucleótidos terminales que lleven cuatro tipos distintos de marcaje (uno diferente para cada nucleótido), esto implica que las cuatro reacciones de terminación específica (ddATP, ddCTP, ddGTP, y ddTTP) se puedan llevar a cabo en el mismo tubo, sin tener que hacerlo por separado como se hacía anteriormente. Además, debido a que se puede determinar cuál es el nucleótido terminal de los fragmentos de DNA con base en su señal, es posible resolver la secuencia de una plantilla con sólo un carril. Las bandas que se ven emiten una señal distinta dependiente del nucleótido terminal incorporado, el hecho de que las bandas puedan ser diferenciadas en un carril elimina la variación que puede ocurrir entre carriles.

Si por alguna razón se produce terminación inespecífica (en un dNTP) no se detecta el fragmento porque no lleva un ddNTP marcado al final, hoy en día, este es el método que más se utiliza para marcar las cadenas de DNA. Kelley (1994) reportó que la información obtenida en las primeras 300 bases de la secuenciación, es más precisa (98% contra 95%) utilizando terminadores (ddNTPs) que llevan una marca fluorescente en lugar de iniciadores con una marca fluorescente ^{Necochea, 2004}.

Los ddNTPs se encuentran marcados con 4 fluorocromos cada uno en una base nitrogenada, de tal forma que a medida que se incorporan y detienen la elongación marcan la base que han incorporado, estos fluorocromos están incorporados en el kit Big Dye (Applied Biosystems, Foster, EUA) que se utiliza y que incluye la polimerasa, el MgCl₂, los dNTPs, ddNTPs marcados y tampón. La reacción de marcaje de secuenciación se realiza mediante la PCR, posteriormente se realiza nuevamente una purificación para eliminar los reactivos

La purificación se lleva a cabo por medio de la técnica de cromatografía de exclusión o filtración en gel, que es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de moléculas en función de su tamaño. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel que se introduce en una columna como soporte cromatográfico, el gel está constituido por partículas esféricas que tienen poros de un determinado tamaño, las moléculas de pequeño tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardadas en su paso por la columna, por su parte las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se denomina “volumen vacío” de la columna, se dicen que son excluidos del gel. De esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular.

El siguiente paso para terminar la secuenciación es la obtención de los electroferogramas, que son una representación gráfica de la secuencia marcada con los dideoxinucleótidos y éstos se pueden ver por medio de un programa llamado CHROMAS. Los secuenciadores automatizados separan los fragmentos por electroforesis, de tal forma que las moléculas con diferencia de un nucleótido sean separadas en el gel, esta electroforesis requiere por lo tanto de cuatro carriles, uno para cada fragmento que termina en cada una de las cuatro bases nitrogenadas del DNA. La posición de los fragmentos se localiza por autorradiografía y sabiendo qué bases representa a cada carril, éste secuenciador automatizado utiliza el método de secuenciación enzimático de Sanger, que se basa en el uso de la DNA polimerasa para sintetizar cadenas de DNA con una terminación específica, con este método se generan fragmentos de DNA de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico, en la figura 16 se observa lo que ocurre en éstos equipos automatizados.

El elemento clave consiste en la introducción de dideoxinucleótidos (ddNTP), estas moléculas son nucleótidos que contienen un azúcar modificado, de modo que el OH anormal de la posición 3' está reemplazado por un H; estos nucleótidos modificados son capaces de unirse a una cadena de DNA por la vía normal, sin embargo una vez incorporados a la cadena ésta ya no puede crecer puesto que carece del grupo OH en posición 3' requerido para la unión del siguiente nucleótido, en consecuencia la incorporación de ddNTP implica la terminación de la cadena y la incorporación de éstos es al azar ^{Necochea, 2004; Tagu, 2006 y Walker, 1997}.



En el interior

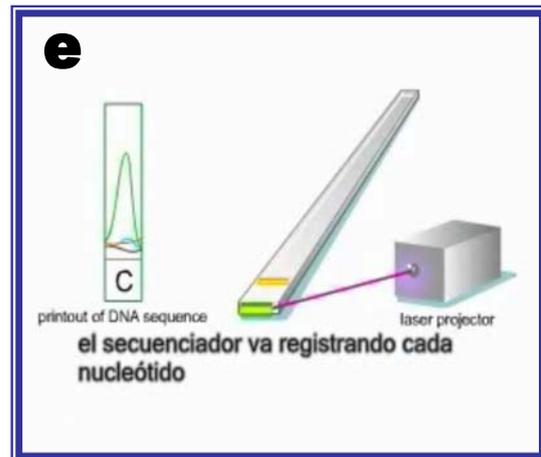
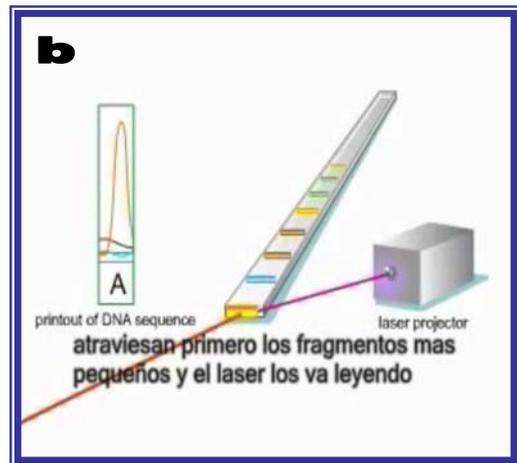
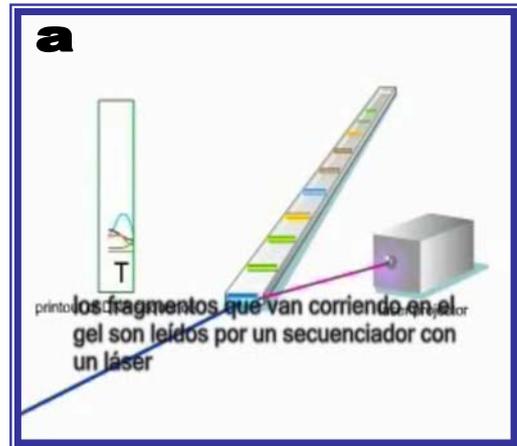


Figura16. Proceso de secuenciación automatizada por método de Sanger.

Los incisos de a,b,c,d y e muestran como se van leyendo los fragmentos marcados con dDNTP's del más pequeño al mayor, registrándolos para finalmente obtener un electroferograma ^{You tube}.

8.3.6.2 Diagrama de flujo del Marcaje con Big Dye 3.1 de los fragmentos amplificados del gen beta globina

Esterilizar material en campana con luz UV




Realizar la mezcla de cada una de las muestras a trabajar, para los dos pares de cebadores. En base al siguiente protocolo:

<i>Componentes</i>	<i>μL</i>
Buffer 5X	3.0
Big Dye	1.0
H2O cbp	10
Primer Sentido o antisentido 10pM	.20
Producto purificado	*



*Se requieren 10ng por cada 100 pares de bases. Al terminar la reacción agregar 10 μl de agua inyectable.



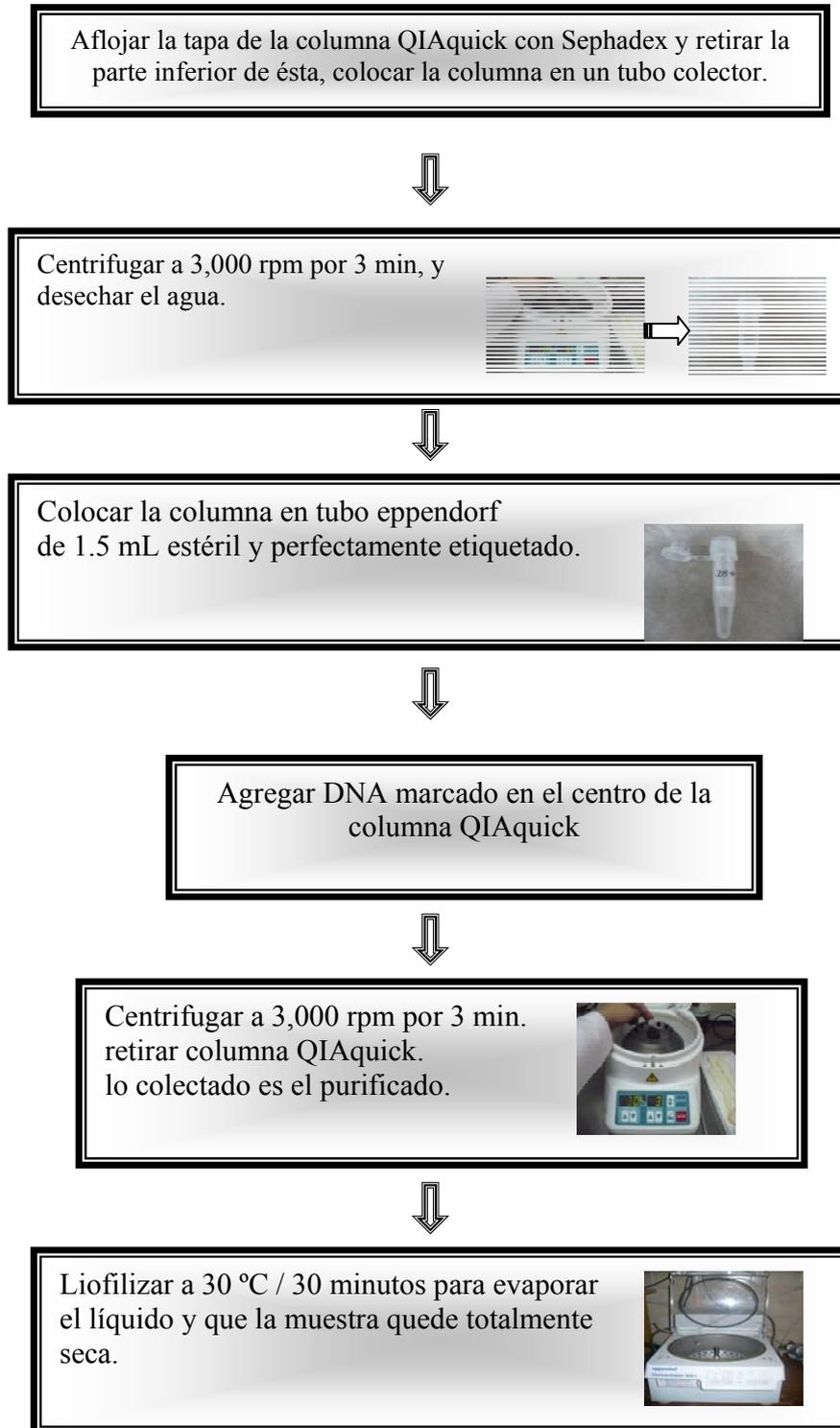
Colocar los tubos eppendorf en termociclador con las siguientes condiciones:

<i>Etapa</i>	<i>°C</i>	<i>Tiempo (min.)</i>
Inicio	94	2
Desnaturalización	96	0.10
Hibridación	50	0.05
Amplificación	68	4

25 ciclos



8.3.6.2.1 Diagrama de flujo de la purificación de producto marcado



8.3.7 Secuenciación automatizada y procesamiento de datos

El Hospital de Pediatría cuenta con los servicios de secuenciación del Instituto de Biología y del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, sólo es necesario llevar las muestras secas en los tubos eppendor de 1.5 ml perfectamente rotulados para su procesamiento. Posteriormente se recibe un correo con los electroferogramas de todas las muestras., en la figura 17 se muestra un ejemplo de éstos.

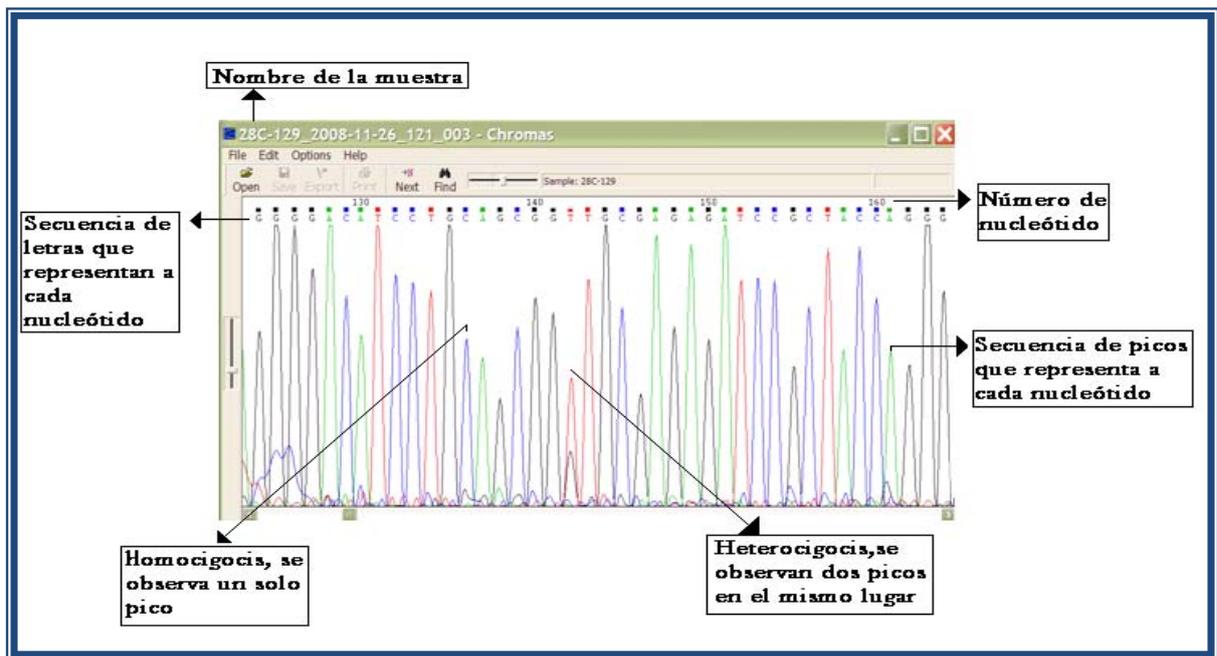
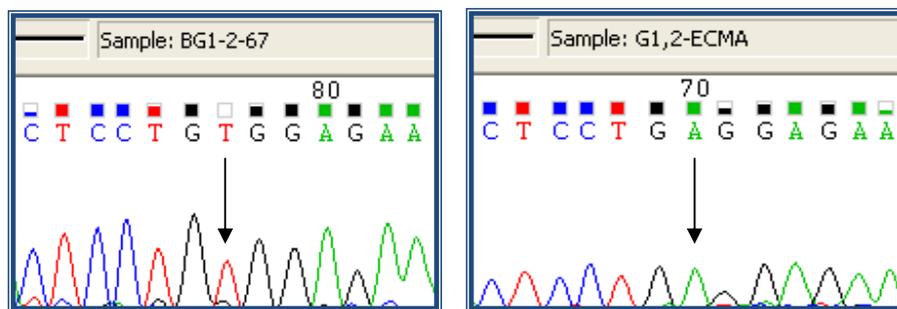


Figura17. Ejemplo de un electroferograma en el programa Chromas y cada una de las partes que lo conforman.



Figuras 18 y 19. Electroferogramas de una secuencia con una mutación y una secuencia normal. En la parte izquierda se puede ver la mutación causante de la Hb S en donde hay una Timina, por su parte en la derecha se muestra la secuencia normal y se observa la Adenina que es la que corresponde a un individuo sano.

Una vez que se tiene la secuencia a analizar, lo primero que se hace es comprobar que haya sido leída bien toda la secuencia, de no ser así, incluir las bases en las que se muestre el pico y no haya ninguna letra. Posteriormente es necesario hacer una búsqueda de secuencia en la base de datos que supere un alto grado de similitud a nuestra secuencia “problema” (query). Para ello se dispone de herramientas bioinformáticas que realizan alineamientos de secuencias de modo rápido y eficaz, por lo que una búsqueda típica en GenBank se completa en cuestión de segundos. Hoy en día la más utilizada para búsquedas en bases de datos es un programa llamado BLAST (siglas en inglés de Basic Local Alignment Search Tool) en español, herramienta de búsqueda de alineación local básica. BLAST compara secuencias de modo “apareado” (pairwise), es decir, de dos en dos, y cada comparación da como resultado una puntuación (Score) que se va incrementando en cuanto mayor es el parecido entre las secuencias que se comparan ^{Novo, 2007 y Watson 2006}.

A continuación un ejemplo de lo que arroja la búsqueda de Blast:

gene, partial cds Length=675 GENE ID: 3043 HBB | hemoglobin, beta [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links) Score = 850 bits (942), Expect = 0.0 Identities = 477/480 (99%), Gaps = 1/480 (0%) Strand=Plus/Minus

```

Query  41  CTCACTCAGTGTGGCAAAGGTGCCCTTGAGGTTGTCCAGGTGAGCCAGGCCATCACTAAA  100
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  561  CTCACTCAGTGTGGCAAAGGTGCCCTTGAGGTTGTCCAGGTGAGCCAGGCCATCACTAAA  502

Query  101  GGCACCGAGCACTTTCCTTGCCATGAGCCTTCACCTTAGGGTTGCCATAACAGCATCAGG  160
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  501  GGCACCGAGCACTTTCCTTGCCATGAGCCTTCACCTTAGGGTTGCCATAACAGCATCAGG  442

Query  161  AGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCCTCTGGGTCCAAGGGTAGACCACCAGCAG  220
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  441  AGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCCTCTGGGTCCAAGGGTAGACCACCAGCAG  382

```

Lo primero que se muestra es una breve descripción de la secuencia que se encontró, es decir a que gen pertenece, y de donde se obtuvo en este ejemplo se obtuvo de Pub Med, además de mostrar el porcentaje de parecido que se puede ver donde dice identities. Posteriormente se encuentra la secuencia en donde la serie de nucleótidos que se encuentra en Query es la secuencia del paciente, o conocida como pregunta, en tanto que el Subjet es lo encontrado en la base de datos que se tiene registrada en Blast de la página de NCBI.

IX. Resultados

Se realizó una prueba de temperatura para cada par de cebadores BG1,2 que amplifica los exones 1,2 con un producto de 543 pares de bases y BG3 correspondiente al exón 3 con otro producto de 482 pares de bases del gen de beta globina. Se realiza una mezcla para una reacción y se dividen esos 25 microlitros en 5 tubos, cada uno con 5 microlitros, posteriormente cada tubo se somete a diferente temperatura, la figura 20 muestra los amplificadores de ésta prueba y se puede ver que la temperatura óptima para el primer BG1,2 es de 56 |C.

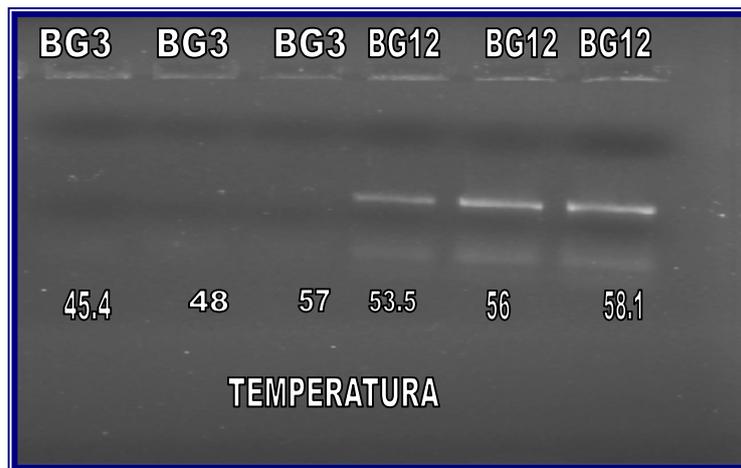


Figura 20. Electroforesis horizontal del gradiente de temperatura para la amplificación de BG1,2 y BG3 del gen de beta globina en gel de agarosa al 1.2 %

Se volvió a realizar el gradiente de temperatura a BG3, pero con la modificación de agregar 1 microlitro de gelatina en la mezcla para la PCR y de igual forma que en BG1,2 la temperatura óptima fue 56° como se muestra en la figura 21.

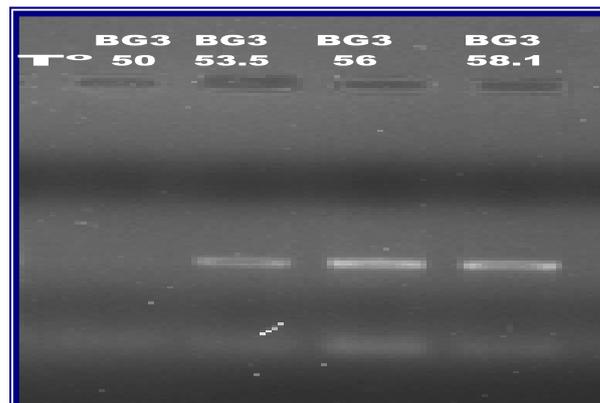


Figura 21. Electroforesis horizontal del gradiente de temperatura para la amplificación de BG3 del gen de beta globina en gel de agarosa al 1.2 %

Se amplificaron dos regiones diferentes del gen de beta globina, uno correspondiente al exón uno y dos (BG1,2) de 543 pares de bases y BG3 para el exón tres de 450 pb (Figuras 22,23). Se utiliza un marcador de pb para verificar que lo amplificado coincida con la región que se está buscando.

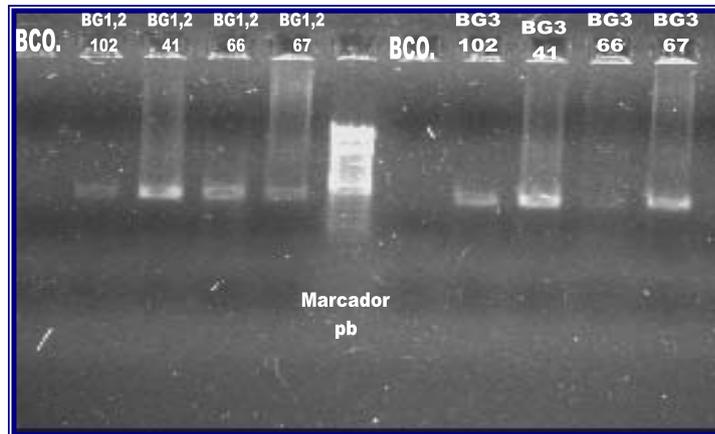


Figura 22. Gel de agarosa 1.2%, amplificados BG1,2 y 3, se cargaron 2 μ l de cada amplificado y 1 μ l del marcador de pares de bases.

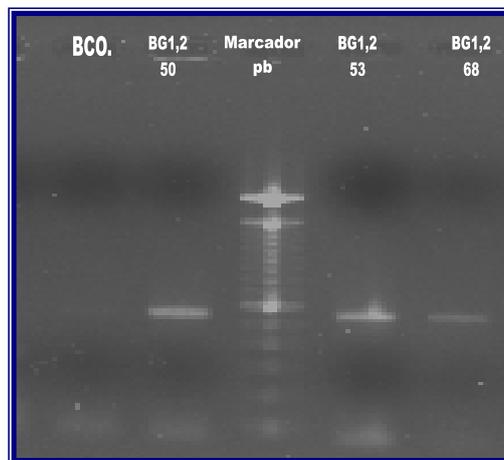


Figura 23. Amplificación de la región 1,2, de las muestras 50,53 y 68, se colocaron 2 μ l de amplificado y 1 μ l de maracador, en gel de agarosa 1.2%

Una vez obtenidos los amplificados se realizó su purificación por medio de un kit de purificación comercial y posteriormente se cargaron 4 μ l del amplificado purificado y 1 μ l de marcador de pares de bases en gel de agarosa al 1.2%. (ver figura 24)

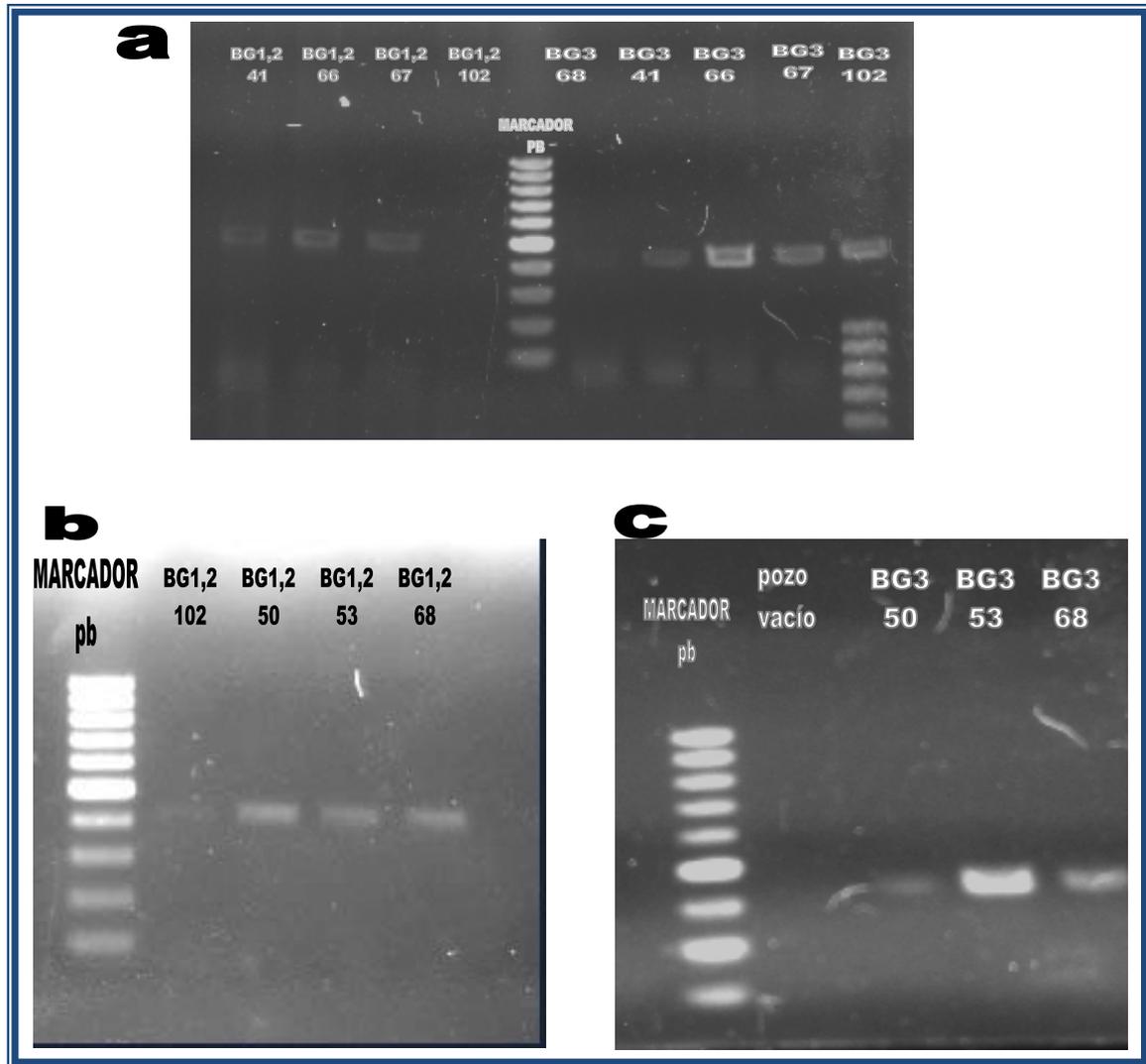


Fig. 24 Electroforesis horizontal de amplificados purificados del gen beta globina en gel de agarosa 1.2%. a) se pueden ver los amplificados purificados de los pacientes 41,66,67,102, b) y c) se muestran los amplificados purificados de los pacientes 50, 53 y 68, así como nuevamente el 102. En ambos casos se tiene un marcador de pares de bases para corroborar que si se tenga el amplificado purificado deseado.

De las ocho muestras estudiadas se encontraron seis mutaciones ya informadas y cuatro nuevas, además de un polimorfismo ya reportado como variación y otro nuevo, que están resumidas en la tabla 9.

Tabla.9 Alteraciones encontradas en el gen de beta globina de los pacientes estudiados. (Globin)

No. Muestra	Región	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de alteración	Nombre Reportado
4 Secuencia en sentido	1,2	20 A>T Het. 92 +1 G>A 16 9T>C	E6V Intron S5P H2H	beta 6(A3) Glu>Val HBB:c.92+1G>A Beta5(A2) Ser>Pro Polimorfismo	HbS IVS-I-1 (G->A); AG^GTTGGT->AGATTGGT beta0 Hb Tyne Variación
	3	Sin cambio			
41 Secuencia en antisentido	1,2	65 A>T Het. 20 A>T Hom. 9T>C Hom.	D21V E6V H2H	beta 21(B3) Asp>Val beta 6(A3) Glu>Val Polimorfismo	HbRockyMountain HbS Variación
	3	Sin cambio			
50 Secuencia en antisent.	1,2	20 A>T Het. 110G>A 9 T>C	E6V INTRON 1 H2H	beta 6(A3) Glu>Val betaivs1-.110 G->A Polimorfismo	HbS Beta ⁺ Variación
	3	Sin cambio			
53 Secuencia en antisent.	1,2	20 A>T Het 209 G>T het. 210 T>A	E6V G69V G69G	beta 6(A3) Glu>Val Hb Ecatepec Polimorfismo Nvo	HbS polimorfismo
Sec. sentido	3	364 G>C	E121Q	β121(GH4)Glu>Gln	Hb D-Los Angeles
66 Secuencia en antisentido	1,2	20 A>T Hom. 94 C>G 9 T>C	E6V L31V H2H	beta 6(A3) Glu>Val beta 31(B13) Leu>Val Polimorfismo	HbS Hb Badalona Variación
	3	Sin cambio			
67 Secuencia en sentido	1,2	9T>C 20 A>T Hom. 42G>A	H2H Hom. E6V INTRON	Variación Beta 6(A3) Glu>Val Polimorfismo Nvo.	polimorfismo HbS Polimorfismo
	3	Sin cambio			
68 sec. en antisentido	1,2	20 A>T Het. 9 T>C Het.	E6V H2H	beta 6(A3) Glu>Val Polimorfismo	HbS Variación
	3	Sin cambio			
102 Secuencia en antisent.	1,2	20 A>T Het. 9T>C Hom	E20V H2H	beta 6(A3) Glu>Val Polimorfismo	HbS Variación
	3	Sin cambio			

X. Discusión

Las hemoglobinopatías (Hbps) constituyen el grupo de trastornos genéticos más frecuentes en todo el mundo, dos de las más frecuentes son la anemia o rasgo de células falciformes y la talasemia, la mayoría de las hemoglobinopatías surgen de la sustitución de un solo aminoácido. Alguno de de estos trastornes se deben a la herencia de un gen autosómico dominante que produce enfermedad hemolítica en su estado heterocigoto, otros son genes recesivos y deben encontrarse en estado homocigoto para producir la enfermedad. Cerca del 25 % de todas las hemoglobinopatías conlleva a la disminución en la esperanza de vida de los eritrocitos características de la enfermedad hemolítica.

En la manifestación genética de las Hbps se hace una diferenciación entre la enfermedad y el rasgo. Una enfermedad se define como la presencia homocigota del gen propio de la anomalía o la posición de un gen heterocigoto dominante que produce un trastorno hemolítico. Un rasgo se describe como el estado heterocigoto, casi siempre asintomático.

Se han descrito varios cientos de hemoglobinas anormales en la literatura, la mayoría derivan de alteraciones en la cadena β . A nivel molecular, la sustitución de una sola base de DNA en un codón puede producir un cambio de aminoácido, la causa más frecuente de hemoglobinopatía ^{Turgeon, 2006}.

El Departamento de Hematología Pediátrica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” ofrece atención a la salud de los niños que cursan con enfermedades de la sangre, entre las que se encuentran las hemoglobinopatias. La actividad asistencial está orientada al diagnóstico, tratamiento y prevención de las anemias graves tales como las anemias hemolíticas, que en algunos casos pueden provocar la muerte. Es por ello que se realizó la colaboración con el Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional SXXI, IMSS para realizar el análisis molecular y darle al paciente un diagnóstico más preciso, ya que la clínica sólo reveló la existencia de hemoglobina S y no la presencia de alguna otra alteración que este agravando la enfermedad.

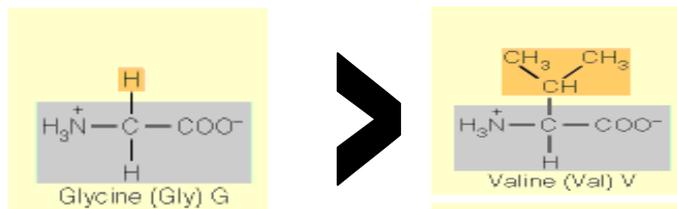
Se recibieron 8 muestras de DNA, a todas ellas se les realizó la PCR para la región 1,2 (Exón1 y 2) y región 3 (Exón 3), al amplificado se le liberó de todo reactivo por medio de un kit de purificación comercial, posteriormente se llevo a cabo el marcado del purificado y su purificación, una vez purificado se liofilizó la muestra y se procedió a llevarla a secuenciar.

Todos los pacientes a los que se les realizó el estudio molecular llegaron al Hospital Infantil por presentar una anemia severa, a excepción de las mamás de dos pacientes, tres de ellos justificada por ser homocigotos para la Hb S (pacientes 41, 66 y 67), pero los demás no, lo que nos hacía sospechar que había algo más que estaba provocando el padecimiento. Se analizaron ocho pacientes, cuatro de género femenino y cuatro masculino.

De las mutaciones encontradas, siete están informadas y se localizaron tres en el exón 1, dos en el intrón uno, una en el exón dos y una en el exón 3; una mutación y dos polimorfismos nuevos, de las que un polimorfismo se encuentra dentro del intrón uno y otro junto con la mutación se ubican en el exón dos. Además de encontrar un polimorfismo ya informado ubicado en el exón uno.

La mutación no reportada corresponde a un paciente masculino. La mutación nueva se encuentra en el exón 2 con el siguiente cambio de aminoácidos:

1) localizada en el nucleótido número 209 la cual se propone sea *Hb Ecatepec*, en donde hay un cambio de aminoácido alifático no polar (Gly) otro de las mismas características (Val) .



3) En el intrón uno (IVS-I) en el nucleótido 42 existe un cambio de Guanina por Adenina al cual se denominó como polimorfismo por no estar interviniendo en el proceso de splicing requerido para la eliminación del intrón.

En lo que respecta a la región 3 no se encontró ninguna alteración nueva, solamente una mutación previamente informada.

La literatura reporta que sólo se han conservado dos aminoácidos en todas las globinas existentes en la naturaleza y las mutaciones que afectan a cualquiera de los dos se asocian a enfermedades, dichos aminoácidos son Histidina 92 que es a la que se enlaza de forma covalente el hierro y Fenilalanina 42 que mantiene el anillo de porfirina del hemo dentro de su receptáculo en la proteína plegada ^{Nussbaum, 2004}. En la descripción anterior de los cambios de

aminoácidos de las mutaciones nuevas que se encontraron se puede ver que ninguno tuvo alteración en los aminoácidos conservados.

Todos los pacientes analizados presentan una variación (polimorfismo H2H) ya reportada en la base de datos de NCBI como variación 351^{ncbi}.

El paciente 4 es un doble heterocigoto, que presenta la mutación HbS y una mutación en el primer nucleótido del IVS-I, traducándose en una $\beta^{\text{o-tal}}$ debido a que se modifica la maduración del mRNA interviniendo así en la eliminación de los intrones ^{González, Ibarra, Perea, 2001 y Perea, Magaña, 2004}.

El paciente 41 además de tener homocigosis para la mutación HbS y la variación informada, se encontró heterocigoto también para la mutación que da lugar a la Hb-Rocky Mountain.

El paciente 50 tiene presenta la mutación HbS y en el IVS-I tiene una mutación que interviene en el proceso “splicing” que de modifica la maduración del mRNA lo que conduce a β^+ ^{Góngora y cols, 2006}.

En lo que respecta al paciente 53 se encontró heterocigoto para una alteración en el nucleótido # 209 provocando un cambio de Glicina por Valina, que se denominó Hb Ecatepec y para el nucleótido #210 dando un polimorfismo nuevo, además es heterocigoto para la Hb D-Los Angeles.

El paciente 66 por su parte homocigoto para la HbS, y heterocigoto para la Hb Badalona.

El paciente 67 presentó sólo la mutación de la enfermedad de células falciformes.

Las muestras 68 y 102 pertenecen a madres de los pacientes 67 y 66 respectivamente, ambas heterocigotas para la mutación HbS.

La composición genética del mexicano es compleja debido a que por factores sociales, demográficos y económicos la distribución alélica no es ecuánime en nuestra población general y cambia de acuerdo a la región geográfica analizada. Existen zonas marginadas con poblaciones amerindias que han sufrido una reducción notable en el tamaño de la población casi al punto de extinción poblaciones mayores donde el flujo genético se ha mantenido constante. El componente amerindio es la base de nuestra población junto con el europeo que trajeron consigo los españoles y una pequeña proporción proveniente de África que trajeron los españoles consigo ^{Guardado-Estrada, 2008}.

En México, Lisker fue quien describió los primeros estudios sobre diversidad genética que se realizaron en poblaciones indígenas como mestizas utilizando marcadores de grupo sanguíneo, haptoglobinas, albúmina y hemoglobina fue, donde se empiezan a observar estas variaciones en las frecuencias alélicas entre los individuos de distintas regiones analizadas ^{Lisker 1981 y Lisker 1996}

La Hb D-Los Ángeles que fue la tercera hemoglobina anormal informada (Itano, 1951; Sturgeon, Itano, y Bergren, 1955) descubierta en una familia de mezcla británica y americano-india originarios de Los Ángeles, sus características clínicas principales son movilidad electroforética idéntica a la de la hemoglobina S y ausencia de células falciformes. ^{Vella y Lehmann, 1974}. La hemoglobina Badalona que es proveniente de España y las Hb Rocky, Hb Tyne y Mountain no son de origen mexicano.

Con lo anterior se demuestra una vez más que la población mexicana es una mezcla de genes indígenas, africanos y caucásicos por el mestizaje indígena-caucásico africano en grado variable con africanos que llegaron a México en la época de la Colonia, ya que se han hecho varios estudios sobre las hemoglobinopatías presentes en el país como los de Lisker y colaboradores, Ibarra y colaboradores, Perea, Ruíz Reyes y Peñaloza y colaboradores, en donde se ha demostrado que hay una frecuencia variable en individuos mestizos, desde menos de 1% en el centro del país hasta más de 14% en las costas, en la tabla 10 se muestra el cálculo de la mezcla trihíbrida de estudios previos mexicanos, ordenados por cantidad de ancestros indígenas ^{Peñaloza Espinosa RI y col, 2008}

Tabla 10. Mezcla trihíbrida de estudios previos mexicanos, ordenados por cantidad de ancestros indígenas

Ciudad	Estado	No. individuos	Frecuencia génica		
			Negros	Indígenas	Blancos
Tlaxcala	Tlaxcala	138	0.079	.762	0.159
Saltillo (La Mina)	Coahuila	123	0.152	.610	0.238
Puebla	Puebla	393	0.107	0.563	0.330
México	DF	510	0.029	0.562	0.409
Saltillo (Chamizal)	Coahuila	104	0.042	0.556	0.402
Paraíso	Campeche	161	0.217	0.474	0.309
El Carmen	Campeche	109	0.284	0.432	0.284
Veracruz	Veracruz	148	0.256	0.394	0.350
Saladero	Veracruz	119	0.302	0.386	0.312
Tamiahua	Veracruz	109	0.405	0.307	0.288
México*	DF	474	0.014	0.276	0.708

* Lisker y colaboradores, 1990 y Pñaloza et al, 1985.

En lo que respecta a las talasemias encontradas β^0 (y β^+ ya han sido encontradas en población mexicana también, por investigadores como Perea y Lisker en estudio en población mexicana.

Con respecto a la cantidad de Hemoglobina (Tabla.4), se observa que los pacientes tienen una cantidad por debajo del rango normal lo que correlaciona con la hemoglobinopatía, y con respecto a la hemoglobina fetal se observó entre 4 y 20%, lo que les da una mejor calidad de vida, puesto este aumento es para compensar la falta de Hb A en el organismo.

El estudio molecular realizado a los pacientes es de suma importancia en este tipo de enfermedades, ya que nos proporciona una información más precisa de la alteración que se encuentra presente para saber lo que está produciendo la sintomatología y con ello proporcionar al médico una mejor herramienta para el diagnóstico preciso y tratamiento adecuado.

XI. Conclusiones

- Se corroboró la mutación β^S (20 A>T, E6V) que da lugar a la HbS en todos los pacientes de manera heterocigota, excepto en tres que fueron homocigotos (muestra 41, 66 y 67).
- Se encontraron 7 mutaciones previamente informadas:
IVS-I-1 (G->A); AG[^]GTTGGT->AGATTGGT beta⁰
Beta IVS-I1-.110 G->A beta⁺
Hb S beta 6(A3) Glu>Val
Hb RockyMountain (65 A>T, beta 21(B3) Asp>Val)
Hb D-Los Angeles (364 G>C, beta121(GH4) Glu>Gln)
Hb Badalona (94 C>G, beta 31(B13) Leu>Val)
Hb Tyne (16T>C; beta 5(A2) Ser>Pro)
- Se identificó una mutación **nueva**:
Hb Ecatepec (209 G>T, Gly69Val)
- Se encontraron dos polimorfismos nuevos IVS-I 46 G>A y 210 T>A G69G
- Es importante realizar el análisis molecular de los pacientes con anemia de células falciformes para dar mejor diagnóstico, tratamiento y asesoramiento genético a las familias que lo ameriten.
- Se corroboró que la composición molecular de la población mexicana es una mezcla de genes.

XII. Glosario

Agarosa. Sustancia péptica derivada del agar-agar (de algas) cuyos geles son muy usados para separar fragmentos de ácidos en electroforesis.

Alelo. Forma alternativa de un gen.

Anemia. Es la disminución de la concentración de hemoglobina en sangre. Este parámetro no es un valor fijo sino que depende de varios factores tales como edad, sexo y ciertas circunstancias especiales tales como el embarazo.

Base. Referido a ácidos nucleicos, cada una de las cuatro bases nitrogenadas Adenina, Guanina, Citocina y Timina del DNA y del RNA (Uracilo). El tamaño de un segmento de ácidos nucleicos se mide por la cantidad de bases o de pares de bases (pb) en el DNA.

Caja TATA. Secuencia de 6 pares de bases localizada en casi todos los sitios promotores de genes eucariontes. Se asocia con el factor de transcripción FTIID.

Codón. Triplete de nucleótidos del RNAm que codifica un aminoácido o bien la iniciación o la terminación de un polipéptido. Los codones *sinónimos* o *degenerados* son los que codifican el mismo aminoácido. Los de terminación UAA, UAG y UGA.

Codominancia. Cuando un par de alelos se expresa en el heterocigoto.

Cromosoma. Cada uno de los 23 pares de estructuras definibles por el microscopio óptico, que llevan las moléculas de DNA que contienen los genes.

Delección. Aberración cromosómica en la que falta un segmento de cromosoma. (Deficiencia).

Desnaturalización. Separación parcial o total de las dos hélices de la molécula de DNA por acción del calor u otros agentes.

Dideoxinuclótidos. Nucleótidos desprovistos del oxhidrilo en la posición 3', usados en el método de secuenciación del DNA.

Dominante. Expresión exclusiva de uno de los dos alelos de un gen en el fenotipo. Se dice de los genes que se expresan igual en estado homocigoto o heterocigoto.

Exón. Secuencias de DNA que son Transcritas y traducidas en una cadena polipeptídica. Es uno de los datos básicos sobre cada ser humano.

Fenotipo. Conjunto de caracteres observables del organismo o de sus componentes.

Gen. Unidad hereditaria que corresponde a un segmento de la molécula de DNA que codifica una o más proteínas, con sus secuencias de control, intrones y secuencias reguladoras.

Genotipo. Conjunto de la información génica propia de un organismo.

Herencia Mendeliana. Patrón de transmisión hereditaria que sigue las reglas establecidas por G. Mendel, se refiere a rasgos codificados por un único gen nuclear.

Heterocigoto. Individuo que posee dos alelos diferentes para un gen.

Hidrofílico. Afinidad al agua.

Homocigoto. Individuo que posee dos alelos del mismo tipo.

Intron. Secuencia interviniente. Región del DNA intercalada entre los exones, que no codifica aminoácidos y es eliminada por el empalme.

Loci. Sitio definido de un cromosoma o de una molécula de DNA donde se puede encontrar un gen.

Mutación. Todo cambio permanente en la secuencia de base del DNA de un organismo, puede ser heredable o no, dependiendo de las células que contengan la mutación.

Polimorfismo. Presencia de dos o más alelos de cualquier sistema en una población en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente.

Promotor. Secuencia de bases de DNA a la cual se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción. Secuencia reguladora de un gen, localizada en sentido 5' con respecto al gen.

Resectivo. Se dice de los genes que sólo se expresan en estado homocigoto.

Primers. Secuencia pequeña de RNA o DNA necesaria para el funcionamiento de la polimerasa.

Portadores. Individuo que carga con un gen anómalo.

Taq polimerasa. DNA polimerasas extraídas de bacterias termófilas (que viven a altas temperaturas), que han hecho posible la reacción en cadena de la polimerasa.

XIV. Anexos

14.1 Preparación de reactivos Aránega y cols, 2007.

❖ Solución de lisis

TRIS-CIH 2M, pH 7.5	5 ml (20 mM)
MgCl ₂ 1M	2.5 ml (5mM)
H ₂ O	c.b.p 500ml

❖ NaCl 5 mM

Pesar 5 moles de NaCl y disolverlos en un litro de H₂O

❖ EtOH 70 %

Etanol absoluto	70 ml
H ₂ O	30 ml

❖ TAE 50 X

TRIS	242 g
EDTA 0.5 %	100 ml
Ácido Acético	57.1 ml
H ₂ O	cbp 500 ml

❖ TAE 1X para 1 litro

TAE 50 X	20 ml
H ₂ O	98 ml

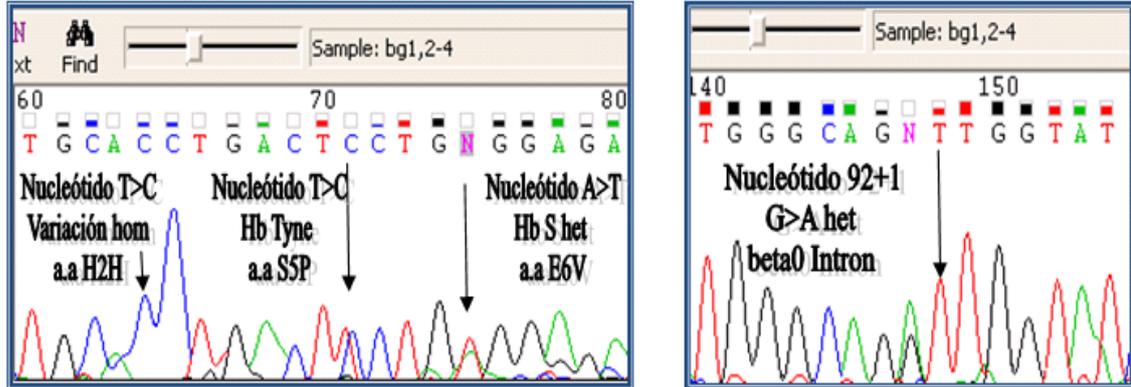
❖ Colorante de carga

Tris_CIH, pH 7.5	250 mM
Azul de bromofenol	0.2 %
Xileno-cianol	0.2 %
Glicerol	40 %

XI.2 Electroferogramas de las mutaciones

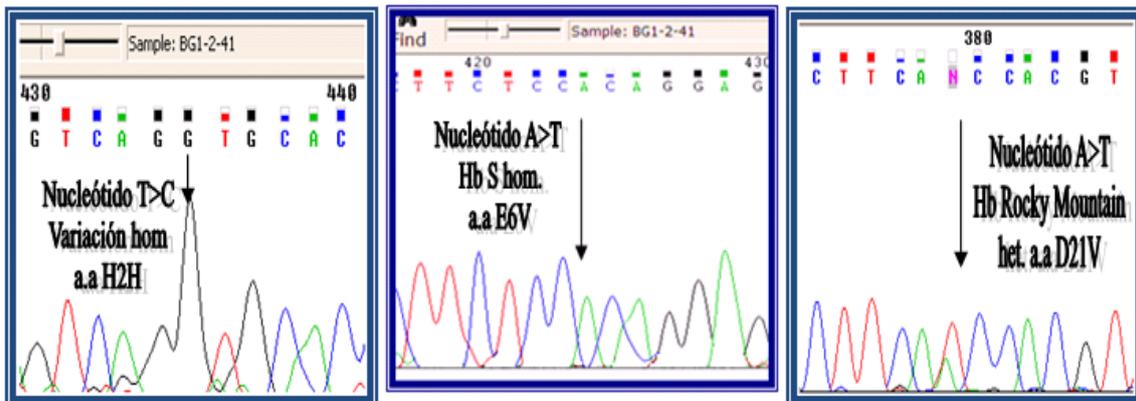
PACIENTE 4

Secuencia en sentido



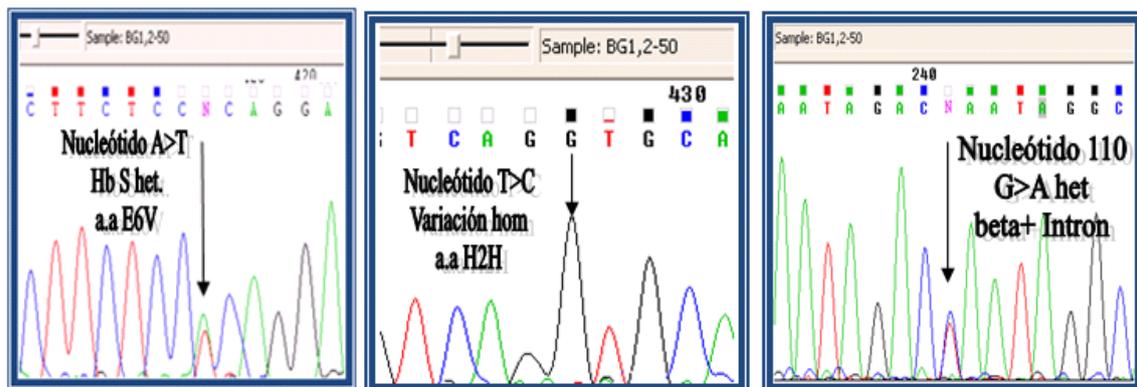
PACIENTE 41

Secuencia en antisentido



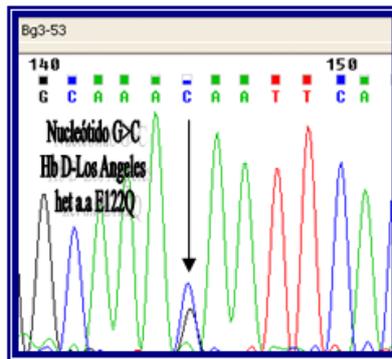
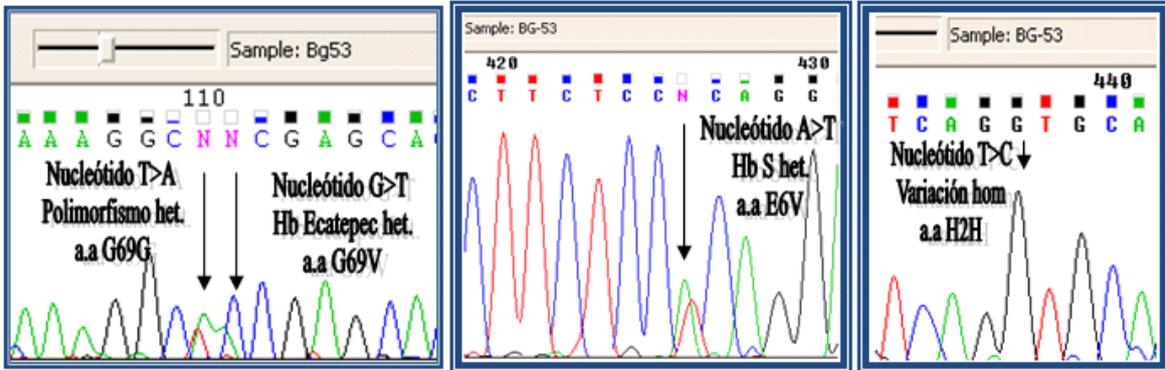
PACIENTE 50

Secuencia en antisentido



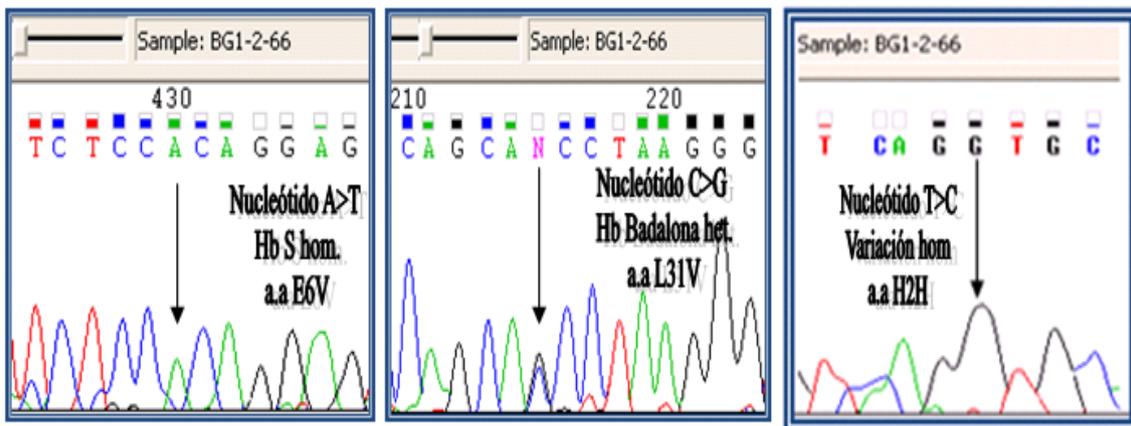
PACIENTE 53

Secuencia en antisentido



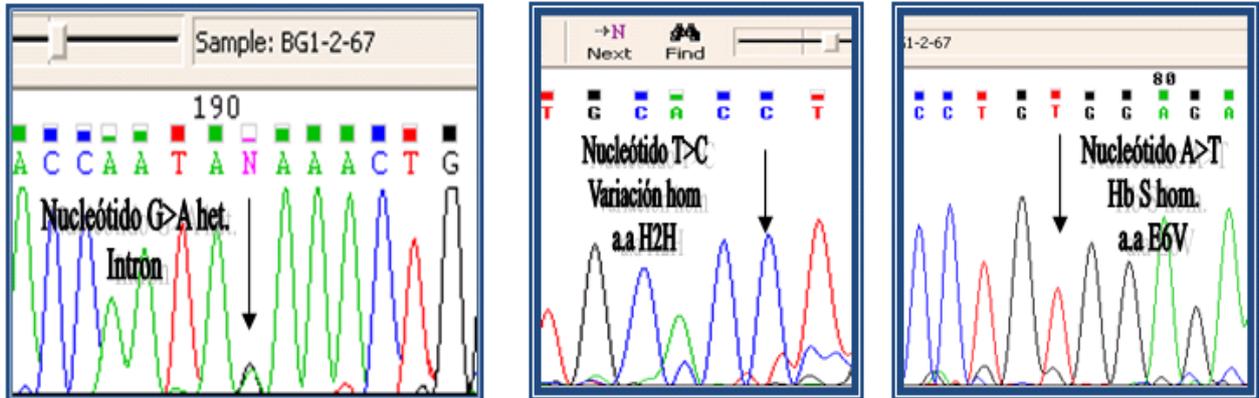
PACIENTE 66

Secuencia en antisentido



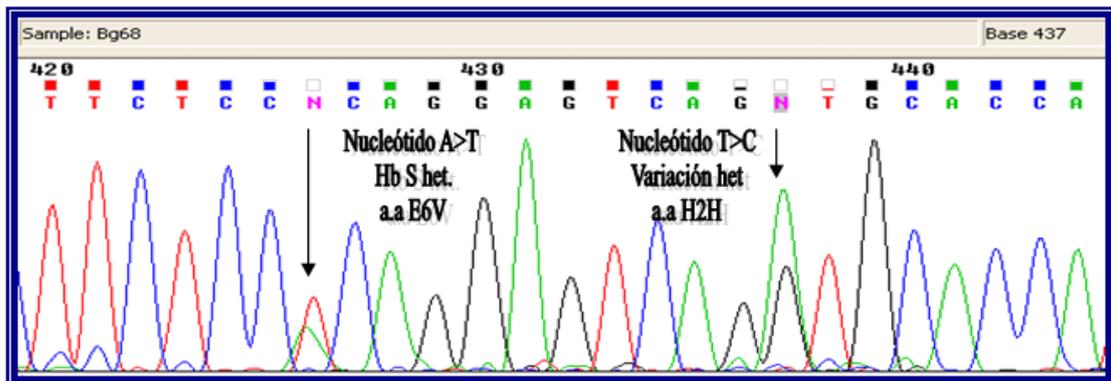
PACIENTE 67

Secuencia en sentido



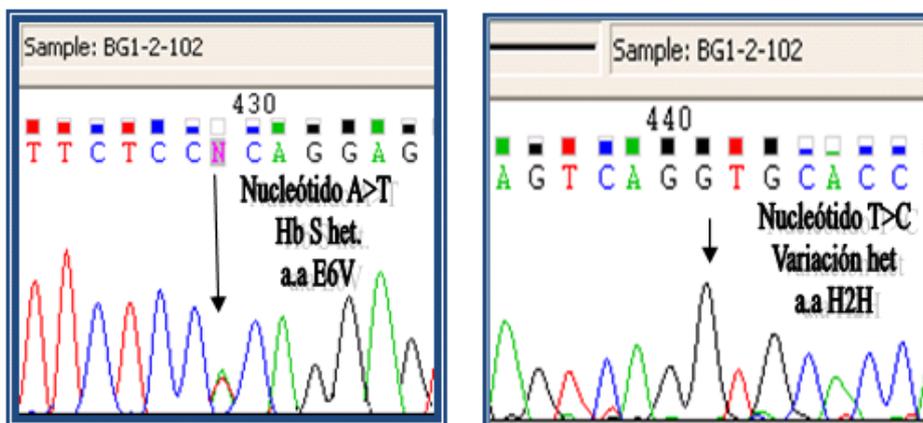
PACIENTE 68

Secuencia en antisentido



PACIENTE 102

Secuencia en antisentido



XIII. Bibliografía

1. ARÁNEGA A y cols.. (2002). *Aplicación de técnicas de Biología Molecular en Genética Clínica*. Granada. España. pp. 9-26 y 83-91
2. BENÍTEZ H. *Anemias Hemolíticas Hereditarias*. Gac Méd Méx 2003; 139 (Supl 2): S6-S11.
3. BRANDAN N. (2008). *Cátedra de Bioquímica: Hemoglobina*. Facultad de Medicina UNNE. República Argentina. pp. 1-9.
4. CROCKER J M P. (2003). *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Wiley. USA. pp. 193-212 y 307-328.
5. DELGADO SR. (2004). *Tesis Diagnóstico Molecular de enfermedades mitocondriales, localización de la mutación A3243G asociada al fenotipo MELAS por medio de la secuenciación completa del DNA mitocondrial*. FESC-UNAM. Edo. de México. pp 66-70
6. ETIENNE J. (2001). *Bioquímica Genética, Biología Molecular*. MASSON. Barcelona, España. pp. 356-401
7. ESPARZA C A. (1997). *Tesis Hemoglobinopatías complicaciones y pruebas diagnósticas*. FESC-UNAM. Edo. de México. pp. 14-74
8. GÓNGORA y cols. *Asociación de hemoglobina S (HbS) y beta talasemia en dos pacientes del Centro Hemato-Oncológico del Hospital Pereira Rossell*. Rev Med Urug 2006; 22: 311-316
9. GONZÁLEZ J R, Ibarra B, Perea J, Jaloma A R, Romero F. (2001). *Genética Clínica: Diagnóstico y manejo de enfermedades hereditarias*. 3ª ed. Manual Moderno. Guizar-Vázquez JJ Edtr. México, D.F. pp. 500-509.

10. GUARDADO-Estrada M. et al. *Diversidad genética en la población mexicana: Utilización de marcadores de ADN*. Rev Med Hosp Gen Mex 2008; 71 (3): 162-174.
11. HARRISON B. (2002). *Principios de Medicina Interna*. Vol.1. Mc Graw Hill. México, D.F. pp. 790-798
12. JARAMILLO M, Sáenz I, Pereira F. *Tamizaje para anemia de células falciformes en recién nacidos del Hospital Universitario del Valle y del Hospital Mario Correa Renjifo*. Portal de revistas científicas de la salud. 1997; 7(1) 13-3
13. KLUG W. (2006). *Conceptos de Genética*. 8^a ed. Pearson Prentice Hall. Madrid, España. pp. 290-295.
14. LISKER R. *Estructura genética de la población mexicana*. Mexico City; 1981.
15. LISKER R, Ramirez E, Perez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. *Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban centres*. Hum Biol 1990; 62:791-811.
16. LISKER R, Ramirez E, Babinsky. V. *Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico*. Hum Biol 1996; 68 (3): 395-404
17. LUQUE J. y Herráez Á. (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Harcourt. Madrid, España. pp. 117-141 y 187-197.
18. LYNN B J. (2004). *Genética Médica*. 3^a ed. Elsevier. Madrid, España. pp. 35-37

19. M.T. Magaña et al. Genetic relationship of a Mexican Afromestizo population through the analysis of the 3' haplotype of the β globin gene in β A chromosomes. *Science direct*. 2007; 39:169–177.
20. MALCORRA J J. *Hemoglobinopatías y Talasemias*. BSCP Can Ped, 2001; 25:265-277.
21. MCKENZIE S. (2000). *Hematología Clínica*. 2ª ed. Manual Moderno. Baltimore, USA. pp. 50-60, 176-212
22. MONTIEL Sosa, J F, Ávila Miyazawa I C y Benítez Esquível G. (2007). *Curso PCR y sus aplicaciones en Biomedicina*. FESC-UNAM. Edo. México.
23. NECOCHEA C R. (2004). *Métodos Físicoquímicos en Biotecnología: Secuenciación de Ácidos Nucleicos*. Instituto de Biotecnología-UNAM. Cuernavaca, Morelos. pp. 13-40.
24. NOVO V F J. (2007). *Genética Humana: Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la genética en el campo de la Biomedicina*. Pearson Prentice Hall Ed. Madrid, España. pp. 275-280
25. NUSSBAUM R. (2004). *Genética en Medicina*. 5ª ed. MASSON. Barcelona, España. pp. 193-208.
26. PASSARGE E. 2007. *Color Atlas of Genetics*. 3rd ed. Thieme Stuttgart. New York, EUA. pp 497.
27. PANIAGUA R. (2003). *Biología celular*. 2ª ed. Mc-Graw Hill. Colombia. pp. 215-216.
28. PEÑALOZA et al. (Gac Med Mex 1985; 121:189-93)

29. PEÑALOZA Espinosa RI y col. *Frecuencia de la hemoglobina S en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en la salud pública de México*. Agosto 2008:50, no. 4.
30. PEREA F. J, Magaña M T, Cobián J, et al. *Molecular spectrum of β -Thalassemia in the Mexican Population*. *Blood Cells, Mol Dis*. 2004; 33:150-152
31. RUIZ Argüelles, G. (2003). *Fundamentos de Hematología*. Medica Panamericana. México, D.F. pp. 107-153
32. SALAZAR-LUGO, R. *La Hemoglobina en la población Venezolana*. *Invest Clín* 2004; 45:175-183. ISSN 0535-5133.
33. SHINTON N K. (2008). *Hematology*. 2ª ed. CRC Press. USA.406-425, 837-840
34. TAGU M. (2006). *Fundamentos de las técnicas de Biología Molecular*. Acribia. Zaragoza, España. pp. 12, 13, 74-80
35. TURGEON M L. (2006). *Hematología Clínica Teoría y Procedimientos*. Manual Moderno. pp. 80-100, 179-193.
36. TURNER P C, McLennan A G, Bates A D, White M R H. (1998). *Molecular Biology*. Springer. New York. pp
37. VELLA and Lehmann. *Hemoglobin D Punjab (D Los Angeles)*. *Journal of medical genetics* 1974; 11:341-348
38. WALKER, J M. (1997). *Biología Molecular y Biotecnología*. 2ª ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 46-65.

39. WATSON J. (2006). *Biología Molecular del Gen*. 5ª ed. Panamericana. Madrid, España. pp. 690-708, 715-717
40. YÁBAR Vargas C A. (2003). *Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y DNA*. INS. Lima, Perú. pp. 21-32
41. *Talasemias y otras hemoglobinopatías*. (2006). (118ª reunión, consejo ejecutivo). Organización Mundial de la Salud. Pp. 1-8.

SITIOS WEB

42. COGUA Jorge et al. *Curso de biología virtual: Proteínas*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá www.virtual.unal.edu.co/.../grupoem.gif
43. DCI. *Enfermedades y trastornos de la sangre: Anemia de células falciformes*. www.nhlbi.nih.gov/.../sca/sca_causes.html
44. Fundación Argentina de talasemia (FUNDATAL). *Talasemia Menor*. 07 Diciembre 1999. <http://www.fundatal.org.ar/images/talamenor.jpg>
45. Globin. *Mutaciones reportadas en los genes globínicos*. http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3
46. HIMFG. *La enfermedad drepanocítica en la población de niños que asisten al HIMFG*. 25 de Enero 2008 <http://www.himfg.edu.mx/hematooncologiadeprano.html>
47. Investigadores del BSC y IRB. *La Hemoglobina al descubierto*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 6 Noviembre 2007.
48. Marligen. *Kits Purificación PCR*. <http://www.marligen.com>

49. NCBI. www.ncbi.nlm.nih.gov
50. POSIK Diego M. et al. *PCR el veredicto de la genética*. CIENCIA HOY, 2007:17 N° 98, www.faba.org.ar/fabainforma/417/ABCL.htm
51. Qiagen. *Kits purificación PCR y marcado de PCR*. <http://www.qiagen.com>
52. Universidad de Alicante. Unidad de genómica y proteómica. *Secuenciación automática de DNA*
http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/genomica/analisis_genetico.html
53. RAISMAN Jorge S. Proteínas: de la estructura primaria a la cuaternaria.
www.hiperbiologia.net
54. YESYD Rodríguez, Ferney. *Introducción a la Biología Evolutiva*. Enero 7, 1996
www.sindioses.org/cienciaorigenes/bioevo.html
55. You tube. *Secuenciación Automática de DNA basada en la técnica de Sanger*.
<http://www.youtube.com/watch?v=ujhxO6dPsX0>