

304406
1
205



UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

ESCUELA DE BIOLOGIA

INCORPORADA A LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESTUDIO POR AMPLIFICACION ENZIMATICA DE LA
PRESENCIA DE VARIANTES POLIMORFICAS EN EL
GEN ESTRUCTURAL DE LA GLOBULINA HUMANA
TRANSPORTADORA DE ESTEROIDES SEXUALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA LA ALUMNA:

CECILIA CARIÑO MORALES

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Justificación.....	14
Objetivo.....	15
Hipótesis.....	16
Material y método.....	17
Material.....	17
Método.....	18
1. Preparación de las muestras previa al isoelectroenfoque.....	18
2. Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en placa.....	19
3. Transferencia de proteínas separadas por isoelectroenfoque a papel de nitrocelulosa.....	19
4. Sistemas de saturación para el estudio de las capacidades de unión de la SHBG por hormonas esteroides.....	20
5. Extracción de ADN de sangre periférica.....	21
6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
6.1 Amplificación de los exones del gen de la SHBG a partir de ADN genómico.....	23
7. Manejo de la copia complementaria del ADN que codifica a la SHBG.....	24
7.1 Transfomación de <u>Escherichia coli</u>	24

7.2 Obtención del ADN.....	26
7.3 Digestión del plásmido con <u>EcoRI</u>	26
8. Recuperación de fragmentos de ADN en geles	
de agarosa por electroelución.....	27
9. Preparación de la sonda radiactiva.....	28
10. Dot blot.....	28
11. Hibridación.....	29
12. Clonación de pSHBG en M13.....	30
12.1 Digestión del vector M13 con <u>SmaI</u>	30
12.2 Desfosforilación del vector.....	31
12.3 Llenado de los extremos 3' del ADN inserto.....	31
12.4 Ligación del inserto al vector M13.....	32
12.5 Preparación de bacterias competentes.....	32
12.6 Transformación.....	33
12.7 Elección de recombinantes.....	33
13. Secuenciación de ADN.....	34
Resultados.....	37
1. Identificación y descripción de variantes genéticas de SHBG humana.....	37
2. Estudio familiar.....	38
3. Análisis genético.....	39
4. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las variantes.....	40
5. Estudios a nivel molecular.....	40
5.1 Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica.....	40

5.2 Amplificación de las secuencias codificadoras del gen de SHBG.....	41
5.3 Hibridación de los exones de SHBG con la sonda específica.....	42
5.4 Clonación en M13.....	42
5.5 Estandarización del método de secuenciación de ADN.....	44
Discusión.....	45
Conclusiones.....	54
Bibliografía.....	55

RESUMEN

La globulina transportadora de testosterona y estradiol (SHBG) es una glicoproteína dimérica que pertenece al grupo de las β -globulinas y es sintetizada en el hígado, de donde es secretada a la circulación general, para unir y transportar a las hormonas esteroideas testosterona y estradiol.

A partir de la identificación de esta proteína en 1966, se han estudiado sus características fisicoquímicas y funcionales, además de su estructura molecular; sin embargo, queda mucho por comprender acerca de su significado biológico en la fisiología de las hormonas sexuales.

La existencia de polimorfismos genéticos en las proteínas, es un fenómeno ya conocido; en los seres humanos se encuentran varios ejemplos como los del sistema de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) o los de los grupos sanguíneos ABO.

El objetivo de este trabajo fue la identificación de las variantes polimórficas de la SHBG, además del desarrollo de las estrategias para el estudio genético de las causas de este polimorfismo.

Para la identificación de las variantes polimórficas de la SHBG en suero de individuos mexicanos, las muestras de suero se analizaron por medio de un sistema de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en un límite de pH establecido de 3 a 10. Esta identificación, posterior a su análisis por carga, se realizó por medio de la

utilización de anticuerpos específicos después de la transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa.

El estudio genético de las causas del polimorfismo estructural se llevó a cabo principalmente por la obtención de porciones específicas del ADN genómico por medio de iniciadores específicos a los marcos de lectura del gen de SHBG en sujetos normales y portadores heterocigotos de la variante.

Como conclusión, se demuestra la existencia de variantes genéticas estructurales de la SHBG, la cual es codificada por un sistema bialélico de genes que se expresan de manera codominante. Además se estableció el método fundamental para el estudio de las bases genéticas responsables del polimorfismo estructural de esta proteína.

INTRODUCCION

Las hormonas esteroides, producto de síntesis de los diferentes órganos esteroidogénicos, son secretadas a la circulación general o al sistema linfático para ser transportadas y captadas por sus respectivos tejidos blanco. Estos compuestos químicos de pequeño peso molecular y de naturaleza lipofílica, son transportados en medios acuosos gracias a su interacción con componentes proteínicos del plasma que forman complejos esteroide-proteína.

Por lo general, los efectos biológicos de las hormonas esteroides están relacionados con la regulación y la activación de procesos de transcripción de segmentos específicos del ADN, con la consecuente síntesis de ARN mensajeros y su traducción a proteínas. Estos efectos, de regular o modificar las funciones de una célula, son precedidos por diversos sucesos que ocurren en diferentes sitios de la economía celular y que comprenden desde la síntesis de las hormonas esteroides, su transporte y distribución sanguínea, hasta su interacción con receptores específicos o elementos transreguladores localizados en el interior de la célula.

Como se mencionó, una vez que las hormonas esteroides son secretadas a la circulación general, interactúan con proteínas específicas a manera de complejos, para ser incorporadas y transportadas a sitios específicos de la economía celular. Hace más de 60 años se sabe que moléculas o sustancias de bajo peso molecular como los lípidos, ácidos biliares, hormonas esteroides, pigmentos y colorantes, así como

algunos fármacos, interactúan con la fracción de la albúmina del plasma¹. Esta proteína, que representa cerca del 60% del total de las proteínas circulantes, además de funcionar como regulador de la presión osmótica del plasma, sirve como transportador de compuestos u hormonas como las arriba señaladas. La albúmina se caracteriza por poseer múltiples sitios de unión, de afinidad variable por diferentes compuestos. La afinidad de esta proteína por las hormonas esteroides es del orden de 1×10^3 a 10^4 M², la cual es considerablemente menor si se le compara con la que caracteriza a las proteínas que reconocen de forma específica las diferentes hormonas esteroides. En 1966³ se tuvo la primera prueba para identificar una proteína específica del plasma que reconoce y une a la testosterona y el estradiol. En estos estudios, y utilizando técnicas de electroforesis, fue posible demostrar un componente proteínico del plasma perteneciente a la fracción de las β -globulinas con la capacidad de unir a la testosterona de manera específica. Posteriormente, Rosembaum y colaboradores⁴, informaron la capacidad de esta proteína de reconocer y unir con alta afinidad, además de la testosterona, a otras hormonas esteroides con actividad estrogénica (estradiol). Estas observaciones dieron lugar a que a este componente del plasma se le denominara **globulina transportadora de testosterona y estradiol**, a la que para fines prácticos y de presentación, en el curso de este trabajo llamaremos SHBG.

Estructura de la SHBG

Después del descubrimiento original de la presencia de la SHBG en el plasma del ser humano, en la actualidad existe un gran número de informes sobre su

distribución en diferentes especies de aves y mamíferos⁵ y otros relacionados con la caracterización de esta proteína utilizando diversas técnicas y procedimientos para su análisis, incluidos su aislamiento y purificación⁶. En los estudios iniciales sobre la caracterización fisicoquímica de la SHBG, los resultados fueron contradictorios y de difícil interpretación. Sin embargo, en el decenio de 1980, varios grupos de investigadores, utilizando sistemas de cromatografía de afinidad, y los sistemas preparativos en cromatografía de alta resolución hicieron posible obtener la SHBG con un elevado grado de pureza, y la descripción de sus propiedades fisicoquímicas. El peso molecular de la SHBG calculado por cromatografía es de 93 400⁸, el cual es muy similar al obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida (94 000 - 98 000)⁹. La presencia de agentes reductores de enlaces disulfuro en sistemas analíticos (electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida) provoca la disociación de la SHBG en dos componentes que presentan pesos moleculares diferentes de aproximadamente 53 000 y 46 000, denominados protómeros pesados (H) y ligeros (L), respectivamente⁹. Estos hallazgos indicaron la presencia de subunidades en su estructura, que hacen pensar que la molécula de esta proteína es un homodímero constituido por una mezcla compleja de dímeros híbridos a base de combinaciones entre el protómero H y el L, los cuales generan diferentes combinaciones moleculares entre ambas: H:H; L:H; L:L. Estudios posteriores¹⁰ indicaron que el protómero L era el producto de la hidrólisis limitada de la subunidad H, generado en los procedimientos de aislamiento durante su purificación. Sin embargo, por el análisis de la secuencia de aminoácidos¹¹ y del cADN estructural de la SHBG¹² se ha podido establecer que las

secuencias primarias de ambas cadenas son idénticas y que la subunidad H y la L provienen de un mismo gen estructural¹³. La diferencia en el peso molecular entre ambos constituyentes se debe probablemente a la adición diferencial de carbohidratos como modificación postraducciona de un precursor común¹⁴. Estudios recientes¹¹ sobre la secuencia de aminoácidos de la SHBG, la cual se observa en la figura 1, han demostrado que en su estructura intervienen 373 aminoácidos, dos puentes disulfuro localizados probablemente en los residuos de cisteína 332-361 y 163-187 y tres cadenas de oligosacáridos: una en el residuo de treonina 7 y dos en los residuos de asparagina 351 y asparagina 367 respectivamente. En fecha reciente, se ha clonado el gen que codifica para la SHBG, y se conocen su secuencia y algunas de sus características. La obtención del cADN de la SHBG ha permitido identificar a la región completa que codifica para la SHBG, constituida por ocho exones, distribuidos a lo largo de 3.2 kilobases del ADN genómico¹⁵. Por otra parte, el producto de transcripción obtenido de ARN total de hígado ha sido identificado por estudios de hibridación al cADN y se demostró un peso aproximado de 1.6 kilobases¹⁶.

Propiedades fisicoquímicas de la SHBG

Las hormonas esteroideas derivadas de los núcleos básicos como el androstano y el estrano (testosterona y estradiol respectivamente) representan los ligandos principales de la SHBG. Los resultados de analizar las características estructurales de los esteroides han permitido conocer el tipo y posición espacial de los grupos funcionales que son importantes para conservar, aumentar o inhibir su interacción con

el sitio activo (sitio de unión) de la SHBG. La afinidad relativa de la testosterona por la SHBG es cerca de dos veces mayor que la observada para el estradiol¹⁷. La presencia de cambios estructurales o sustituciones en los anillos A y D de la molécula de testosterona repercuten de manera importante en su interacción con la globulina transportadora. La configuración planar del anillo A y la presencia de un grupo hidroxilo en posición 17-β en el anillo D, son indispensables para la unión de la testosterona al sitio activo de la SHBG. La reducción de la doble ligadura del C-4 del anillo A en posición 5-α, así como la sustitución en orientación α por grupos metilo o hidroxilo en los átomos C-10 y C-17, respectivamente, aumenta la afinidad de la testosterona por el sitio activo de la globulina¹⁸. Las características de afinidad de la SHBG por sus ligandos son similares a las observadas para los receptores intracelulares de estas mismas hormonas ($K_d 1 \times 10^{-9} M$). Sin embargo, a diferencia del receptor intracelular, la SHBG se caracteriza por su elevada velocidad de disociación al igual que la vida media de disociación del esteroide, la que a 37°C es del orden de segundos¹⁹. Esta característica propia de las globulinas transportadoras, condiciona la existencia de dos fracciones de esteroides circulantes: la fracción unida y la fracción libre (no unida o disociada).

Regulación hormonal

El sitio de síntesis de la SHBG es el hígado, donde se forma un transcrito de un peso aparente de 1.6 kilobases^{12,20}. Las concentraciones circulantes de esta proteína varían de acuerdo con la edad y sexo de los individuos, así como en ciertos estados

fisiopatológicos. En recién nacidos, la concentración de la SHBG es similar en uno y otro sexo, cuyo valor es casi la mitad de lo observado en el adulto normal²¹. En la mujer en edad reproductiva, la concentración de la SHBG es aproximadamente dos veces mayor que en el varón adulto^{9,22}, y alcanza valores máximos durante el embarazo^{23,24}. La administración exógena de hormonas esteroides produce cambios muy importantes en la concentración circulante de la SHBG. El uso farmacológico de compuestos naturales o sintéticos de actividad estrogénica aumenta significativamente las concentraciones en plasma de la SHBG²⁵; se observa el efecto contrario con el uso de compuestos con actividad androgénica²⁶. El hipertiroidismo y algunas enfermedades que afectan la función hepática se acompañan de aumentos significativos de la SHBG²⁷. Por otra parte, enfermedades caracterizadas por aumento en andrógenos circulantes se relacionan con disminución en las concentraciones de la SHBG²⁸.

Significado biológico de la SHBG

Debido a las propiedades fisicoquímicas que caracterizan la interacción de las hormonas esteroides con el sitio activo de la SHBG, a esta proteína se le han conferido las funciones de transportador o amortiguador sanguíneo²⁹. A este respecto, la formación de complejos esteroide-proteína, ocasiona una poza circulante de esteroides biológicamente inactivos²⁹. Esta fracción está en relación con la porción del esteroide unido a la SHBG, que no es accesible a su captación por tejidos blanco específicos o a la acción de enzimas y agentes químicos que lo biotransformen a otros metabolitos con mayor o menor actividad biológica³⁰. Estas observaciones indican que la fracción

libre de los esteroides representa la porción del esteroide circulante donde reside su actividad biológica²⁵. Sin embargo, estudios recientes sobre el papel biológico de la SHBG indican una participación mas activa en los mecanismos causantes del efecto biológico de los esteroides que la simple función de transportador sanguíneo.

Pardridge y colaboradores³¹ han demostrado que la porción unida de los esteroides a proteínas transportadoras del tipo de la SHBG representa una fracción del esteroide con importantes funciones biológicas. Estos autores postulan que el mecanismo de difusión de una hormona esteroide a un órgano blanco depende de por lo menos tres factores: el tiempo de tránsito capilar, la velocidad de disociación unidireccional del complejo proteína-receptor y la permeabilidad de la membrana a cada uno de los esteroides. Esta relativamente nueva alternativa basa sus principios en las propiedades físicas y dinámicas del tránsito capilar que caracterizan a ciertos órganos y tejidos esteroide dependientes. El tiempo de tránsito capilar depende de la longitud y el volumen del capilar, así como de la velocidad del flujo sanguíneo, e implica, por otra parte, el tiempo de exposición de las proteínas plasmáticas, el cual está inversamente relacionado con la velocidad del flujo sanguíneo. Existen diferencias importantes entre órgano y órgano; por ejemplo, el tiempo de tránsito capilar en el cerebro es de aproximadamente un segundo, y de dos a tres en los capilares mesentéricos, y un poco mayor (cinco segundos) en los espacios sinusoidales del hígado. Lo más importante en estos estudios es la correlación que existe entre el tiempo de tránsito capilar en un órgano dado, con la velocidad de disociación del complejo proteína-esteroide. De esta manera, si la velocidad de disociación de un

esteroide a 37°C es igual o mayor de cinco segundos, su captación por el tejido cerebral será más difícil que a nivel de los sinusoides hepáticos, en donde el tránsito capilar es menor. Para la SHBG estas observaciones indican una función relacionada con la descarga vectorial selectiva de sus ligandos a sitios específicos de la economía.

Otro de los aspectos recientes, en cuanto a las propiedades biológicas de la SHBG, es su capacidad de interactuar de manera específica con receptores de membrana localizados en un número importante de tejidos tales como los de la próstata, el endometrio y la placenta³²⁻³⁵. Las constantes fisicoquímicas que caracterizan esta interacción son diferentes de las que se han descrito para otras proteínas. Las velocidades de asociación y disociación de la SHBG del sitio activo de la membrana son menores que las observadas para otros ligandos^{32,33}. Por otra parte, esta asociación de la SHBG y la membrana da por resultado la estimulación de la adenilato ciclasa y la acumulación de AMP cíclico a nivel intracelular. El sitio de interacción de la SHBG con la membrana es independiente del sitio de la unión de las hormonas esteroides. Un hecho interesante es que la ocupación del sitio activo de la SHBG por una hormona esteroide imposibilita a esta proteína para interactuar con la membrana celular, esto hace pensar en que hay interrelaciones de tipo alostérico entre ambos sitios activos. Sin embargo, la interacción del esteroide con la SHBG, unida previamente a la membrana, es necesaria para la activación de la adenilato ciclasa y el aumento consecutivo del AMP cíclico, situación que depende de la actividad biológica de los ligandos naturales de la SHBG³⁶. Estas observaciones son importantes dentro de los mecanismos causantes del efecto de las hormonas esteroides a nivel de

sus respectivos órganos blanco, ya que ofrecen un mecanismo de acción adicional que no requiere la participación de receptores intracelulares para el efecto hormonal.

Heterogeneidad molecular y polimorfismo estructural

En la actualidad se conocen la estructura, sitio de síntesis y regulación hormonal de la SHBG; sin embargo, sus consecuencias e importancia biológica en el ser humano son motivo de estudio por varios grupos de investigación. La falta de información sobre la presencia de mutaciones o deficiencia de esta proteína en el ser humano, ha dificultado la descripción de muchas de sus funciones biológicas. Es interesante señalar que la rata representa una especie caracterizada por ausencia de SHBG en la circulación³⁷; sin embargo, la falta de manifestaciones físicas causadas por la deficiencia de esta proteína, indica que en esta especie, existen otras proteínas como la albúmina que sustituyen las funciones atribuibles a la SHBG.

Como se señaló en párrafos anteriores, la SHBG es una glicoproteína que en su estructura contiene entre 18 y 35% de carbohidratos. El análisis de esta proteína por técnicas de isoelectroenfoque demuestra la presencia de varias formas moleculares (heterogeneidad) lo cual es atribuible a su elevado contenido de ácido siálico (aproximadamente 30% del contenido total de carbohidratos)^{10,11} ya que la hidrólisis enzimática de estos residuos de azúcar casi siempre da por resultado la desaparición del tipo heterogéneo^{9,10,37}. Esta característica estructural, propia de las glicoproteínas, es posterior a la adición y remoción de carbohidratos de la molécula de SHBG, como parte de las modificaciones postraduccionales que sufre una proteína durante su

síntesis y posteriormente su secreción a través de las membranas del retículo endoplásmico y de ninguna manera representa alteraciones o modificaciones en la estructura primaria de la proteína. La remoción de residuos de ácido siálico de la SHBG no modifica las constantes fisicoquímicas de unión por sus ligandos (testosterona y estradiol); sin embargo, este tratamiento sí obstaculiza algunas de sus propiedades biológicas y disminuye su vida media circulante.

Por otra parte, la modificación en la estructura primaria y por tanto, en la generación de diferentes moléculas o variantes de una misma proteína se conoce como polimorfismo estructural. Esto generalmente obedece a cambios en la estructura de la proteína debidos a deleciones o mutaciones puntuales que ocurren en el gen estructural y que conducen a la síntesis de productos de transcripción con características y estructura diferentes del producto de transcripción normal. Por otra parte, existen mecanismos causantes de la producción de múltiples proteínas por modificaciones del producto de transcripción primario. Estos cambios son el resultado de empalmes alternativos en el ARN mensajero, que, dependiendo de las posibilidades de ellos, explicaría cómo un solo gen tiene la facultad de producir diferentes proteínas.

En los seres humanos se conocen numerosas proteínas polimórficas, como las hemoglobinas, los antígenos mayores de histocompatibilidad y algunas enzimas y proteínas transportadoras del plasma. En este respecto se han descrito variantes genéticas para la globulina transportadora de corticosteroides (CBG)³⁹ y para la de tiroxina (TBG)⁴⁰. En ambos casos, la identificación de variantes se realizó por el análisis de las propiedades de carga de la proteína por técnicas de isoelectroenfoque.

Para el caso de la TBG, la naturaleza del polimorfismo estructural reside en el cambio de un aminoácido en la cadena polipeptídica⁴¹, que representa un tipo de herencia ligado al cromosoma X. Esta mutación se debe a un solo cambio de bases en el codón que codifica para el aminoácido número 171, y ocasiona la sustitución de ácido aspártico por asparagina.

Existen algunos informes en la literatura en cuanto a la descripción de variantes polimórficas de la SHBG. Luckock y Cavalli-Sforza⁴², describieron cuatro variantes genéticas de la SHBG, dependiendo de su movilidad en geles nativos de poliacrilamida. Estos autores establecieron que los fenotipos encontrados corresponden a productos de genes autosómicos y a la participación de tres alelos. Este estudio y otros similares no establecen las bases de las variantes encontradas ni la participación de mecanismos a nivel traduccional (glicosilación) que pudieran participar en la generación de variantes encontradas.

Investigaciones recientes realizadas en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán en sujetos mexicanos han demostrado por técnicas de isoelectroenfoque, que hay variantes de carga de la SHBG. En el presente trabajo de Tesis se presentan los estudios de identificación de las variantes de esta proteína, y las estrategias para el estudio genético de las causas del polimorfismo estructural.

JUSTIFICACION

En los seres humanos se conocen numerosas proteínas polimórficas, como las hemoglobinas, los antígenos mayores de histocompatibilidad y algunas enzimas y proteínas transportadoras en el plasma. Además, se han descrito variantes genéticas para algunas globulinas, como la transportadora de corticosteroides (CBG) y la de tiroxina (TBG). En estos estudios no se establecen las bases de las variantes encontradas, ni los mecanismos que pudieran participar a nivel traduccional, como la glicosilación de estas proteínas, en la generación de las variantes encontradas.

Actualmente, se conocen la estructura, sitio de síntesis y regulación hormonal de la SHBG, además de ciertas características a nivel del gen que la codifica; sin embargo, no se conocen con certeza las consecuencias e importancia biológica en el ser humano. Algunos estudios realizados recientemente sobre el papel de la SHBG indican que tiene una participación más activa en el efecto biológico de los esteroides que su simple función de transportador sanguíneo. La falta de información sobre algunas características tales como la presencia de mutaciones o la deficiencia de esta proteína en el ser humano, ha dificultado la descripción de muchas de las posibles funciones biológicas.

Por estas razones, es importante presentar un trabajo en el cual se identifiquen las variantes de esta proteína, y además se muestren estrategias para el estudio genético de las causas del polimorfismo estructural.

OBJETIVOS

1. Establecer la existencia del polimorfismo genético de la molécula de SHBG por medio de sus propiedades de carga en un sistema de electroenfoque en muestras representativas de la población mexicana y establecer las bases de su transmisión genética.

2. Determinar las repercusiones de este polimorfismo en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

3. Estandarizar las condiciones necesarias para un ensayo que permita conocer la existencia de diferencias a nivel del gen estructural o la secuencia codificante para SHBG, responsables de la presencia de variantes genéticas de esta proteína.

HIPOTESIS

La presencia de formas moleculares diferentes de la globulina humana transportadora de esteroides sexuales resistentes a la digestión enzimática de los residuos de ácido siálico con neuraminidasa representan variantes polimórficas del gen estructural.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL

Los esteroides no radiactivos se obtuvieron de Steraloids Inc. (Wilton, NH) cuya pureza química se analizó por cromatografía en papel y recristalización, hasta obtener actividades específicas constantes. La 1,2-³H-testosterona (³H-T) con actividad específica de 40-60 Ci/nmol y la 1,2-³H-dihidrotestosterona (³H-DHT) con actividad específica de 40-60 Ci/nmol se obtuvieron de Du Pont NEN Research Products (Boston, MA). Ambos esteroides radiactivos se purificaron antes de su utilización por cromatografía en Sephadex LH-20, usando como solvente cloroformo:etanol 25:2. De BIO RAD Laboratories (Richmond, CA) se obtuvieron acrilamida, N,N'-dialiltarrardiamina (DATD), N,N'-metilenbisacrilamida (Bis), N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), azul de Coomassie R-250, persulfato de amonio, sulfato dodecílico de sodio (SDS), affi-gel blue, papel de nitrocelulosa, estándares de punto isoeléctrico, y los anfolitos. La albúmina sérica bovina (ASB), Tris, glicina, ácido glutámico, Tween-20, glicerol, Neuraminidasa Tipo X, inhibidor de Tripsina Tipo I-S, Proteinasa K, EDTA, Ficoll 400, fenol, acetato de sodio y aceite mineral se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los oligonucleótidos complementarios a las cadenas 5',3' de cada uno de los ocho exones del gen de la SHBG fueron sintetizados y proporcionados por el Centro de Investigación Biomédica del Consejo de Población de la Ciudad de Nueva York, Nueva York, EUA. Los reactivos para la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR), así como la polimerasa del ADN derivada de Thermus aquaticus (Taq polimerasa) se obtuvieron de Perkin Elmer Cetus (Norwalk,CT). Los reactivos para la secuenciación de ADN se obtuvieron de United States Biochemical Corporation (Cleveland,OH). Todos los demás reactivos y sustancias químicas que se utilizaron en este estudio fueron de un elevado grado de pureza. El cADN que codifica para la SHBG fue proporcionado por el Dr. G.L. Hammond (University of Western Ontario, London Ontario, Canadá). Este cADN ha sido amplificado en el plásmido BR322 en nuestro laboratorio en dos fragmentos EcoRI 5' (0.64 kb) y 3' (0.55 kb), respectivamente ¹⁵. El anticuerpo anti-SHBG humana fue generosamente donado por el Dr. C. Wayne Bardin, Director del Centro de Investigación Biomédica del Consejo de Población de la Ciudad de Nueva York, NY.

Las muestras de sangre utilizadas en este estudio se obtuvieron, previa información y consentimiento, de 360 individuos adultos de uno y otro sexo, residentes de la Ciudad de México. Las muestras se centrifugaron a 1 500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

METODO

1. Preparación de las muestras previa al Isoelectroenfoque

A cada muestra de suero se le realizó el siguiente tratamiento, con la finalidad de analizarlas en sistemas de Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida: la eliminación de esteroides endógenos de las muestras de suero se llevó a cabo por medio del tratamiento por adsorción a carbón activado Norit-A a razón de 1 mg de

carbón por mililitro de la muestra³⁹. El tratamiento se realizó por incubación en agitación continua durante una hora a 4°C. Al finalizar el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. La albúmina presente en el suero fue removida mediante resinas de afinidad (affi-gel blue) a razón de 1 ml de la resina por cada 0.6 ml de suero. Las incubaciones se realizaron en tubos siliconizados durante una hora a 4°C en agitación continua. La muestra (sobrenadante) se obtuvo por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 minutos. La eliminación de residuos de ácido siálico por medio de su hidrólisis enzimática se realizó por la incubación de cada muestra en presencia de 0.05-0.5 unidades de Neuraminidasa Tipo X en solución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0. Al final de la incubación se añadió 0.1 ml de solución de Tris, pH 7.4, glicerol 10% (sol. TG) en presencia de azida de sodio 0.2% y estas muestras se centrifugaron a 3 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos fueron guardados en alícuotas a -80°C. Los estudios testigo para valorar la posibilidad de degradación en la proteína durante el proceso experimental se realizaron en presencia de inhibidores de proteasas (0.001 mg de inhibidor de Tripsina Tipo I-S) durante toda la preparación del suero, y se valoró el efecto sobre la capacidad de unión de andrógenos durante varios ciclos de congelación-descongelación de las muestras.

2. Isoelectroenfoco en geles de poliacrilamida en placa

Para la identificación de las variantes polimórficas de la SHBG en suero de

individuos mexicanos, las muestras ya preparadas se analizaron por un sistema de isoelectroenfoque que se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en placa de 11 X 12 cm prefabricados por LKB (Uppsala, Suecia) con un límite de pH de 3 a 10. Se aplicaron las muestras y se hizo el corrimiento de los geles de acuerdo con las especificaciones de la casa manufacturera. El isoelectroenfoque se realizó a 4°C en un aparato LKB 2117 Multiphor utilizando corriente constante 50 mA, hasta alcanzar un total de 1 500 voltios. Al final del análisis se transfirieron las proteínas a papel de nitrocelulosa. Se utilizaron marcadores adecuados de punto isoelectrónico. El perfil de pH se obtuvo en fragmentos de 5 mm del gel, eluidos en 2 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante dos horas en agitación continua, utilizando un minielectrodo de pH.

3. Transferencia de proteínas separadas por isoelectroenfoque a papel de nitrocelulosa

Para la identificación de la SHBG, las proteínas del suero separadas por isoelectroenfoque, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa para su posterior incubación con el antisuero específico anti-SHBG. Para este caso, se equilibró el gel en presencia de 100 ml de ácido acético al 0.7% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron dos piezas de nitrocelulosa cortadas de acuerdo con las dimensiones del gel, así como tres hojas de papel filtro previamente equilibradas en ácido acético, seguidas de varias tiras de papel secante. En la parte superior se colocó presión con un peso aproximado de 0.5 kg, y todo el sistema bajo una atmósfera húmeda durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de este período, la

porción del filtro de nitrocelulosa en contacto directo con el gel se despegó y equilibró en solución amortiguadora de Tris 0.05 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M (solución Tris-salina), procedimiento que se repitió durante tres ocasiones a temperatura ambiente y en agitación continua. Finalmente el filtro se incubó en presencia de albúmina al 5% en solución Tris-salina. Al finalizar este lapso, los filtros de nitrocelulosa se lavaron en varias ocasiones en solución Tris-salina y se incubaron en presencia del antisuero anti-SHBG a una dilución final de 1:100 durante 24 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpos no unidos a la SHBG se eliminó por medio de lavados repetidos, y los complejos antígeno-anticuerpo se identificaron con anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa. Los complejos inmunitarios se pudieron ver por medio de tinción para peroxidasa, utilizando diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

4. Sistemas de saturación para el estudio de las capacidades de unión de la SHBG por hormonas esteroideas

Para este caso se utilizaron esteroideas radiactivos como la ^3H -DHT, los cuales son ligados, con elevada afinidad, al sitio activo de la SHBG. Las incubaciones se realizaron en tubos de diálisis de 12 X 75 mm en presencia de suero y concentraciones variables del andrógeno. Cada tubo contiene 1 nM de la dihidrotestosterona radiactiva, y cantidades crecientes (1-40 nM) del andrógeno no marcado radiactivamente. La incubación se llevó a cabo en un volumen final de 0.2 ml utilizando solución amortiguadora TG y cantidades adecuadas de la muestra, durante una hora a 4°C. La separación de la fracción unida y la libre se realizó

mediante la adición de 0.8 ml de carbón-dextrán (250 mg de carbón y 25 mg de dextrán T-70 en 100 ml de TG), seguido por centrifugación a 3 000 rpm durante 30 minutos. Se decantaron los sobrenadantes en frascos de conteo, con 5 ml de solución de centelleo líquido. La unión específica se valoró por incubaciones en paralelo, con un exceso de DHT no radiactiva (100X). La unión específica es el resultado de sustraer la unión no específica a la unión total. El contenido de radiactividad se investigó en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard) con una eficiencia para tritio de 52%.

5. Extracción de ADN de sangre periférica

La obtención de ADN a partir de muestras de sangre total se realizó de acuerdo con el método descrito por Signer y colaboradores⁴³. Se mezclaron las muestras de sangre (5 ml) con 8 ml de agua bidestilada y se centrifugaron a 10 000 X g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 8 ml de Nonidet P40 al 0.1% (v/v) y se centrifugó de manera similar a lo descrito anteriormente. El precipitado final se resuspendió en 16 ml de solución de lisis (Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.4 M, EDTA 0.002 M, pH 8.2, SDS 0.5%) con 125 µg/ml de Proteinasa K y se incubó durante 16 horas a 37°C. Al finalizar este período se añadieron 4 ml de solución saturada de NaCl, se mezcló vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó a 1 000 X g durante 15 minutos a 20°C. Se transfirió el sobrenadante, y se precipitó el ADN mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto a una temperatura de -20°C. El ADN se obtuvo por medio de una varilla de vidrio para y se transfirió a tubos con

0.5 ml de Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.002 M pH 7.5, y se almacenaron a -20°C . El grado de pureza de cada uno de los ADN se valoró por la relación $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, obtenida por lectura en espectrofotómetro, el cual mide la cantidad de radiación UV absorbida por las bases o por proteínas. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una OD de 1 (UDO) corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ADN de cadena doble, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de cadena sencilla y ARN, y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para oligonucleótidos de cadena sencilla. La lectura a 280 nm indica la presencia de proteínas o de fenol como contaminantes en la muestra. El ratio entre las lecturas a 260 nm y 280 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) da una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN y ARN tienen valores $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ de 1.8 y 2.0 respectivamente⁶⁰.

6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta metodología tiene la capacidad de generar el enriquecimiento selectivo de una secuencia específica de oligonucleótidos del ADN para su posterior estudio o manipulación analítica. La amplificación de segmentos del ADN involucra el diseño de dos oligonucleótidos que delimiten las porciones del ADN que van a ser amplificadas (fig. 2). Estos oligonucleótidos se hibridan de manera opuesta a ambas cadenas de las secuencias que van a ser amplificadas y se orientan en tal forma que la síntesis del ADN por la polimerasa, se lleva a cabo en la región ubicada entre los oligonucleótidos. Por otra parte, los productos de síntesis son complementarios y con la capacidad de unir o hibridar a las secuencias de oligonucleótidos que delimitan al ADN generando,

por tanto, la acumulación exponencial de los fragmentos o secuencias blanco que van a ser amplificadas. Esta reacción se lleva a cabo en ciclos que consisten cada uno en una fase de desnaturalización por calor del ADN, en otra de hibridación o alineación de los oligonucleótidos y por último, la fase de síntesis del ADN por acción de la polimerasa. En la actualidad, este procedimiento es de mayor simplicidad y eficiencia que el descrito inicialmente⁴⁴, debido a la identificación y aislamiento de una ADN polimerasa a partir de la bacteria termofílica Thermus aquaticus (Taq), que tiene la propiedad de conservar su actividad en incubaciones prolongadas, a temperaturas del orden de los 95°C⁴⁵. Esta característica de conservar la actividad durante las condiciones de la reacción de la polimerasa, permite la utilización de una sola dosis de la enzima, sin la necesidad de su adición en cada uno de los ciclos de amplificación.

6.1 Amplificación de los exones del gen de la SHBG a partir de ADN genómico:

La amplificación de los marcos de lectura (exones) del gen de la SHBG (n=8) se llevó a cabo en tubos de microcentrifuga que contenían los siguientes constituyentes: solución amortiguadora de polimerasa (1X = Tris-HCl 0.01 M, pH 8.3, KCl 0.05 M, MgCl₂ 0.0015 M, gelatina 0.001% (w/v)), nucleótidos (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) 0.2 mM, oligonucleótidos (dependiendo de cada exon) 4 mM de cada uno, 1 µg del ADN genómico y la ADN Taq polimerasa 2.5 unidades en un volumen final de la reacción de 50 µl. A cada tubo de reacción se le añadió 0.1 ml de aceite mineral con la finalidad de reducir la evaporación y condensación durante los ciclos de amplificación. Un ciclo típico de amplificación consistió en (ver detalles para cada exon en la sección de resultados): fase de desnaturalización a 95°C durante dos a cuatro

minutos; fase de hibridación de los oligonucleótidos a 60°C durante tres a seis minutos y la fase de extensión de la polimerasa a 72°C durante cuatro a siete minutos realizándose por lo general de 30 a 40 ciclos. La temperatura en la fase de hibridación de los oligonucleótidos (parámetro importante en la especificidad de la reacción) depende de la proporción de bases G,C,T y A existentes en cada uno de ellos. La temperatura aproximada en esta fase se calculó, para cada uno, mediante la siguiente fórmula:

$$4(G + C) + 2(A + T) = \text{temperatura } ^\circ\text{C}$$

7. Manejo de la copia complementaria del ADN que codifica a la SHBG humana

7.1 Transformación de Escherichia coli:

La transformación se realizó con los fragmentos de restricción EcoRI 5' y 3' del cADN^{48,53}. Las células de E.coli pueden ser transformadas por diversos métodos, pero la eficiencia de la transformación depende del tamaño del vector. Las técnicas de transformación se basan principalmente en el uso de sales como cloruro de calcio o cloruro de cesio, las cuales, en las condiciones adecuadas de temperatura y pH, debilitan la pared celular de las bacterias y las vuelven competentes para introducir un ADN extraño presente en el medio, por la acción de un choque térmico, de tal manera que se producen células transformantes que son seleccionadas de acuerdo con las características que les confiere el vector introducido. En este experimento se cultivaron células de E.coli DH5 α en medio estéril LB (peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L, pH 7.5) durante 18 horas a 37°C. Posteriormente se

tomó un inóculo para obtener un cultivo en fase logarítmica en 100 ml de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.4 - 0.5 U a 550 nm. Las células se centrifugaron a 2 500 X g durante 15 minutos a 4°C; el precipitado celular se resuspendió en CaCl₂ 0.1 M en la mitad del volumen original y se incubó durante 30 minutos sobre hielo. Al cabo de este periodo, las células se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en 1/10 del volumen original en CaCl₂ 0.1 M con la finalidad de aumentar la competencia celular. La transformación de E.coli con los cADN se realizó en tubos estériles, mezclando 0.1 µg de cada fragmento del plásmido BR322 por cada 0.2 ml de células competentes e incubando 40 minutos sobre hielo. Posteriormente la mezcla se calentó a 42°C durante dos minutos, al cabo de los cuales se agregan 2 ml de medio LB, se incubó a 37°C durante dos horas permitiendo de esta manera el crecimiento celular, y la expresión del gen de resistencia a ampicilina. Las células se sembraron sobre la superficie de cajas de Petri que contienen agar/medio LB en presencia o ausencia de antibiótico y se dejaron crecer a 37°C. Después de 12 a 16 horas, se seleccionaron las colonias resistentes a la ampicilina.

7.2 Obtención del ADN:

Las colonias resistentes a la ampicilina (una por análisis) se inocularon en 5 ml de medio LB estéril incubándose durante 16 a 18 horas. Las células se obtuvieron por centrifugación en una microcentrífuga y se resuspendieron en 0.1 ml de solución GTE (glucosa 0.05 M, Tris 0.025 M, pH 8.0, EDTA 0.01 M) durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0.2 ml de una solución de NaOH 0.2M y SDS 1% (w/v) y se incubaron sobre hielo durante cinco minutos. Al finalizar

este lapso se añadieron 0.15 ml de una solución de acetato de potasio 5M, pH 4.8, se mezclaron vigorosamente y se colocó cada preparación sobre hielo durante cinco minutos. Después se centrifugó, y se obtuvo el sobrenadante, el cual se mezcló con 0.8 ml de etanol absoluto. Al cabo de dos minutos, los ácidos nucleicos fueron precipitados por centrifugación durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%, y resuspendió en 0.03 ml de solución TE (Tris-HCl 0.01 M, pH 8.0; EDTA 0.001 M). Posteriormente se almacenó a -20°C. Los cADN así obtenidos se utilizaron como sondas para la identificación de secuencias específicas del gen de la SHBG en estudios posteriores de hibridación.

7.3 Digestión del plásmido con EcoRI:

El ADN plasmídico que contiene los cADN de la SHBG fue digerido con EcoRI (Farmacia LKB Biotechnology) de la siguiente manera: se trató 1 µg de ADN en presencia de 25 unidades de EcoRI en un volumen final de 15 µl de solución amortiguadora (Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5; NaCl 0.1 M; MgCl₂ 0.01 M; β-ME 0.001 M; 100 µg/ml de albúmina sérica bovina) durante tres horas a 37°C. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en gels de agarosa al 1% en solución TBE (1x: Tris base 10.8 g/l; ácido bórico 5.5 g/l; EDTA 0.5 M 4 ml/l pH 8.0), el ADN se identificó por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml de agua bidestilada durante 10 a 30 minutos). Las bandas de ADN identificadas se fotografiaron y cortaron del gel de agarosa para su electroelución posterior.

8. Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa por electroelución

La recuperación del ADN de los geles de agarosa se realizó por electroelución⁴⁶ de la siguiente manera: las piezas de los geles que contenían el ADN fueron depositadas en bolsas de diálisis en presencia de 0.5 ml de TBE 0.25X estéril previamente tratadas con bicarbonato de sodio al 2% y EDTA 0.001 M. Para la electroelución del ADN se colocaron las bolsas de diálisis selladas en una cámara de electroforesis submarina con TBE 0.25X a 80 voltios durante dos horas. El ADN electroeluido se transfirió a tubos de centrifuga, se añadió 0.5 ml de fenol saturado con TE y se agitó para extraerlo. La muestra se centrifugó y el ADN de la fase acuosa se extrajo con éter, posteriormente se precipitó por la adición de acetato de sodio 3M pH 5.0 (1/10 del volumen), y etanol absoluto a -20°C (1.5 volúmenes). Se agitó la mezcla y se dejó a -20°C durante 16 horas. Se centrifugó a 4°C a 10 000 rpm durante 15 minutos, se lavó con etanol 80%, y se resuspendió en 15µl de solución TE para almacenar el ADN obtenido a -20°C.

9. Preparación de la sonda radiactiva

Los cADN obtenidos como se señaló en párrafos anteriores, se marcaron con [α -³²P]dCTP, utilizando un estuche comercial para marcaje de oligonucleótidos distribuido por Pharmacia LKB Biotechnology AB. La incorporación del nucleótido radiactivo se realizó por la técnica de random prime⁴⁷ que consiste en la desnaturalización (95°C durante tres minutos) de la molécula lineal de ADN para posteriormente incubarla en presencia de los nucleótidos dATP, dGTP y dTTP, además

de dCTP³² en presencia de oligonucleótidos de seis bases (hexámeros), y una ADN polimerasa (fragmento de Klenow). Los hexámeros se hibridizan al azar a lo largo del ADN iniciando la síntesis de la doble cadena, la cual queda uniformemente marcada. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante una hora, al término de la cual, se detuvo con EDTA y aforó a 0.150 ml con TE. El producto de la reacción se separó de la fase libre en columnas de Sephadex G-50 y se almacenó a -20°C.

10. Dot blot

El ADN se desnaturalizó en 10 μ l de agua estéril a 95°C durante cinco minutos y se colocó en hielo. Se agregaron 40 μ l de SSC 20X (1X: NaCl 8.7 g/l, citrato de sodio 4.4 g/l, pH 7.0). El aparato de dot blot con el papel de nitrocelulosa previamente equilibrado en SSC 20X, se conectó al vacío y se lavó cada pozo con 0.1 ml de SSC 20X. Se depositaron las muestras en los pozos, y éstos se lavaron nuevamente con 0.1 ml de SSC 20X. Se secó el papel de nitrocelulosa al vacío a 80°C durante dos horas, para posteriormente realizar experimentos de hibridización.

11. Hibridización

Con la finalidad de localizar el ADN correspondiente al gen de la SHBG, se realizaron estudios de hibridización con la sonda radiactiva de la siguiente manera: el filtro de nitrocelulosa fue incubado en solución de prehibridización (200 μ l/cm²) (Formamida 50%, SDS 0.2%, EDTA 10 mM, solución Denhardt 4X (Ficoll 400 20 g/l, polivinilpirrolidona 20 g/l, ASB 20 g/l), amortiguador de fosfatos 120 mM (NaH₂PO₄

0.5 M, Na_2HPO_4 0.1 M, pH 6.5); SSC 2X, ADN desnaturalizado de esperma de salmón 10%) durante cuatro a 16 horas a 37°C. Después de este tiempo, se descartó la mitad de la solución y se agregó la sonda de SHBG previamente desnaturalizada. Se incubó a 42°C durante 16 a 20 horas; se lavó dos veces con 250 ml de SSC 2X, y una durante 30 minutos con 150 ml de SSC 0.1 X, SDS 0.1% a 50°C cambiando la solución dos veces. El papel de nitrocelulosa se secó y expuso a placas de rayos X.

12. Clonación de pSHBG en M13

Para llevar a cabo la secuenciación del ADN correspondiente a los ocho exones del gen codificante para hSHBG, se necesitó un vector de clonación, para lo cual se eligió el M13 mp18 y mp19^{56,57}, y se realizó lo siguiente:

12.1 Digestión del vector M13 con SmaI:

Con la finalidad de producir extremos rasos en los cuales fuera introducido el inserto, se realizó la digestión con una enzima que produce este tipo de extremo: se incubaron 2 μg del vector (mp18 y mp19) con la enzima SmaI en 20 μl de reacción con solución 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; 60 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM β -ME, 100 mg ASB/ml) durante dos horas a 30°C. La reacción se detuvo con EDTA 0.25 M (3 μl) y se aforó a 50 μl con TE, para después extraer con 25 μl de fenol y 25 μl de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó a 10 000 rpm durante ocho minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se agregaron 5 μl de acetato de sodio 3M y etanol 100% (dos volúmenes), para precipitar a -20°C por 16 horas. Se lavó con etanol 80% y se resuspendió en 49 μl de Tris-HCl 50 mM pH 8.0).

12.2 Desfosforilación del vector:

Para evitar un alto porcentaje de autoligación del vector, se trató con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP), que remueve los fosfatos 5' necesarios para la formación de los enlaces fosfodiéster por la enzima T4 ligasa. Se tomaron dos testigos, uno para medir la eficacia de ligación y otro para medir la inespecificidad por vector no digerido. La reacción se hizo en tubos de microcentrífuga con 50 U de BAP. Se incubó 40 minutos a 65°C. Se extrajo con fenol/cloroformo dos veces, se precipitó con etanol a -20°C durante 16-20 horas y se resuspendió en 10 µl de TE.

12.3 Llenado de los extremos 3' del ADN inserto:

Como no todos los productos del PCR se encuentran con extremos rasos, se deben tratar con la enzima Pol I o fragmento de Klenow, que permite el "llenado" de los extremos que hayan quedado incompletos. Esta reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: se incubó 1 µg de inserto con 1 U de polimerasa I en un amortiguador de reacción de polimerasa I (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, MgCl₂ 100 mM, NaCl 300 mM) 4 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM a temperatura ambiente (22°C) durante 15 minutos, y se extrajo con fenol/cloroformo dos veces. El ADN se precipitó con acetato de sodio 3M y etanol absoluto, y se resuspendió en TE, para almacenarlo a -20°C.

12.4 Ligación del inserto al vector M13:

Esta reacción se realizó para formar un enlace fosfodiéster entre el hidroxilo 3' de un fragmento de ADN y el fosfato 5' de un segundo fragmento de ADN. La enzima usada fue la T4 ADN ligasa, la cual requiere de la proximidad entre los dos extremos

a unir para formar el enlace fosfodiéster, por lo que su eficiencia depende de la concentración del ADN y del vector, que debe encontrarse en una relación molar de 1:2. Para esta reacción se emplearon 2 fM de vector (4 fM de extremos) y 4 fM del DNA inserto (8 fM de extremos), para que se tuviera la relación de 1:2. La reacción se llevó a cabo de la siguiente forma: se tomaron 10 ng de vector para 0.6 a 0.9 ng de cada inserto (ver concentración para cada exon en la sección de resultados) en un amortiguador de reacción de la T4 ligasa 5X (Tris-HCl 250 mM pH 7.6, MgCl₂ 50 mM, polietilenglicol 8 000 25% (w/v), ATP 5mM, ditiotretol 5mM) y se incubó con 1 U de T4 ligasa a 15°C durante cuatro a ocho horas. La reacción se detuvo con 2 µl de EDTA 0.25 M y se aforó a 25 µl con agua estéril. Se almacenó a -20°C.

12.5 Preparación de bacterias competentes:

El método de transformación empleado en esta parte del trabajo fue el siguiente: se inocularon 3 ml de medio YT (Peptona 140 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.5) con una colonia aislada de E.coli JM 101. Las bacterias se dejaron crecer 16 horas a 37°C en agitación y se inoculó una alícuota (dilución 1:1 000) en medio YT (0.3 ml de medio por cada transformación) y se dejó crecer a 37°C hasta que la densidad óptica alcanzó de 0.4 a 0.5 U a 550 nm. Se colocó el cultivo en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 3 000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en la mitad del volumen original con CaCl₂ 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, y se incubó en hielo 30 minutos. Se centrifugó de nuevo, y se resuspendió en 1/10 del volumen original en la misma solución. Las bacterias competentes pueden almacenarse a 4°C durante ocho a 16 horas.

12.6 Transformación:

Se alicuotaron 0.3 ml de bacterias competentes a cada tubo de muestra, y se les agregaron de 2 a 3 ng de plásmido con el inserto. Se agitaron suavemente, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Al terminar esta incubación, se les dió un choque de calor a 42°C durante dos minutos. Estas células se vaciaron en tubos precalentados a 42°C con agar superior YT (Peptona 140 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.5 y agar selecto 12 g/L). Se dejaron crecer a 37°C durante 16 a 24 horas, al término de las cuales se identificaron las bacterias recombinantes.

12.7 Elección de recombinantes:

Las bacterias se hicieron crecer en un medio con IPTG (isopropil-tio-beta-galactósido) el cual induce la actividad β -galactosidasa en las bacterias, y con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), que es el sustrato histoquímico necesario para la β -galactosidasa⁵⁵. Esta actividad se evalúa por el desarrollo de color debido a la hidrólisis en el ensayo en placa de E. coli, que da un precipitado azul. La interrupción del gen lac para el fragmento α de la β -galactosidasa evita la α -complementación y por tanto no es codificado por el genoma bacteriano, lo que da lugar a placas blancas, que son producidas por las bacterias recombinantes. Estas colonias se picaron con un asa estéril y se inocularon en 5 ml de medio YT, para infectar las células huésped que se han crecido con anterioridad en este medio. Se incuban solamente de seis a ocho horas a 37°C para evitar que el crecimiento supere la fase logarítmica por incubación prolongada. De esta forma se liberan al medio los fagos de cadena sencilla con el inserto. Se centrifugaron en tubos de microcentrifuga, y se recuperó el sobrenadante,

en donde se encuentra el ADN de cadena sencilla. Se agregaron 0.3 ml de PEG-NaCl (polietilenglicol (PEG-6 000) 20%, NaCl 2.5 M) para precipitar el ADN, se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugó a 11 000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 0.1 ml de TES (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 10 mM, EDTA 0.1 mM) y se extrajo con fenol/cloroformo. Se precipitó con acetato de sodio 3M pH 5.0 y etanol absoluto. El precipitado se resuspendió en TE y se almacenó a -20°C para posteriormente identificar las bacterias que poseen el fragmento por medio de experimentos de hibridación con la sonda de SHBG en un dot blot, y realizar la secuencia de este ADN de cadena sencilla.

13. Secuenciación del ADN

El análisis de secuencia se basó en el método de Sanger^{58,59}, que consiste en la incorporación al azar de análogos de los deoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) en una cadena de ADN en crecimiento sintetizada por el fragmento de Klenow. Estos análogos son llamados dideoxinucleósidos trifosfatos (ddNTP) debido a que se les ha eliminado el grupo 2'-OH del extremo 3' de la molécula de la ribosa. La incorporación de un ddNTP en la cadena de ADN provoca la interrupción de la síntesis debido a que falta el grupo hidroxilo 3' necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Por esto, los ddNTP se conocen como terminadores de cadena.

Esta interrupción en la reacción de secuencia es específica debido a que hay cuatro ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) que se utilizan en cuatro reacciones por separado, cada una contiene sólo uno de estos ddNTP y los cuatro dNTP, lo que

provoca la distribución al azar de las interrupciones en la cadena y la determinación de la secuencia completa del ADN. Cada cadena sintetizada es terminada con un ddNTP específico a una distancia de acuerdo con la secuencia del ADN templado.

La síntesis del ADN se inicia por medio de una secuencia de 17 nucleótidos complementaria a la región del sitio múltiple de clonación en el vector. La polimerasa comienza la síntesis a partir del extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido y sigue en dirección 5'-3'. De esta forma se obtiene la secuencia complementaria de cualquier inserto presente en el vector de clonación. Los fragmentos obtenidos tienen el extremo 5' en común, y cada uno termina en posiciones específicas de acuerdo con la incorporación de los ddNTP. Para detectarlos, los fragmentos se marcan radiactivamente por la incorporación de dCTP³² durante la síntesis.

La enzima que se utiliza en la reacción es el fragmento de Klenow, porque no posee actividad exonucleasa 5'3', por lo que no provoca la degradación del extremo 5' común donde se une la secuencia de 17 bases, y evita la formación de fragmentos de tamaño uniforme que impedirían la correcta interpretación de la secuencia.

Los fragmentos se desnaturalizan a 95°C y se corren en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. La secuencia se obtiene en una autorradiografía del gel, y se interpreta leyendo las bandas en las cuatro líneas que corresponden a cada nucleótido, donde las bandas de mayor migración representan los fragmentos más cortos por lo que se comienza leyendo las bandas de la parte inferior de la placa hacia arriba. Para estandarizar la técnica de secuenciación se realizó la siguiente reacción con el material proporcionado en el estuche comercial: se incubaron 3 ng del oligonucleótido

con la secuencia iniciadora de 17 bases (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') y el ADN testigo (1 μ g) en un amortiguador (5X:Tris-HCl pH 7.5 200mM, MgCl₂ 100mM, NaCl 250 mM) en un volumen final de 10 μ l durante dos minutos a 65°C y se dejó que bajara la temperatura lentamente para permitir la hibridización del iniciador con el ADN. A la reacción se le agregó 1 μ l de DTT (ditiotreitól) 0.1 M, 2 μ l de la dilución del amortiguador de reacción 5X, 10 mCi de dCTP³², 2 μ l de dilución de enzima y amortiguador de manganeso (isocitrato de sodio 0.15 M y MnCl₂ 0.1 M) en un volumen final de 16 μ l. Se mezcló e incubó cinco minutos a temperatura ambiente, al término de los cuales se alicuotaron 3.5 μ l de esta reacción a cada tubo con 2.5 μ l de amortiguador de terminación de cada nucleótido (NaCl 50 mM, 80 μ M de cada dNTP y 8 μ M del ddNTP específico). Se incubaron a 37°C durante cinco minutos y se detuvo la reacción con 4 μ l de solución de depósito (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xilencianol FF 0.05%). Se desnaturalizaron a 80°C y se depositaron 3 μ l en el gel, que había sido corrido previamente hasta alcanzar alrededor de 50°C. Después de depositar la muestra se corrió a 2 800 V durante dos a tres horas. Al terminar la electroforesis se lavó el gel con un litro de solución de lavado (metanol 5%, ácido acético 5%). Posteriormente se enjuagó con agua destilada y se secó durante dos horas. El gel seco se expone a placas para radiografía KODAK XO MAT durante 72 horas para obtener la autorradiografía.

RESULTADOS

1. Identificación y descripción de variantes genéticas de la SHBG

Con la finalidad de identificar variantes estructurales de la molécula de la SHBG, se procedió al análisis de muestras de suero de individuos mexicanos de uno y otro sexo por sistemas de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida. Para ello, la albúmina presente en las muestras fue removida por cromatografía de afinidad en affigel blue y sujetas a tratamiento enzimático con neuraminidasa. Los resultados de este análisis se muestran de manera representativa en la figura 3. La identificación de la SHBG del total de proteínas separadas por este método se realizó por el análisis de su actividad biológica posterior a su elución del gel de poliacrilamida. Como puede observarse, la actividad de unión a ^3H -DHT se localizó en un solo pico de actividad con un punto isoeléctrico aparente entre 5.4 y 5.85. La adición de DHT no radiactiva al sistema de análisis de la actividad biológica, resultó en la inhibición de la unión de la DHT radiactiva al sitio activo de la SHBG. El tratamiento con neuraminidasa, causó alteraciones de las propiedades de carga de la proteína caracterizadas por el cambio en el punto isoeléctrico de la SHBG de 5.5 a 6.9 aproximadamente. Estos resultados permiten concluir que el sistema de análisis para la identificación de variantes moleculares de la SHBG, así como el manejo y tratamiento químico y enzimático de las muestras de suero no modifican de manera aparente las propiedades biológicas (de unión a andrógenos) de la SHBG.

Para el estudio y descripción de las variantes en suero de la SHBG en una muestra de la población mexicana, se procedió al análisis de 110 muestras de suero de individuos sanos de uno y otro sexo. La presencia de variantes de la SHBG en la población estudiada se llevó a cabo por isoelectroenfoque de las muestras, previa separación de residuos de ácido siálico, e identificación de la SHBG por inmunotinción con anticuerpos específicos. Con este análisis fue posible la identificación del fenotipo más frecuente de la SHBG en la población estudiada. Este se caracterizó por la presencia de dos bandas por isoelectroenfoque bien definidas y con un punto isoelectrónico aparente de 6.50 y 6.63, respectivamente (fig. 4). Por otra parte, permitió identificar, en cinco muestras de las 110 estudiadas, un fenotipo por electroenfoque de cuatro bandas caracterizado por dos bandas adicionales hacia el cátodo del gel con puntos isoelectrónicos aparentes de 6.70 y 6.76 respectivamente (fig. 4)

Ambos fenotipos de la SHBG se encontraron en muestras de suero independientemente del sexo y edad de los individuos. De manera similar, estos fenotipos se mantuvieron sin cambios bajo diferentes condiciones experimentales como variaciones de las concentraciones de la enzima utilizada o alterando el tiempo y sitio de colocación de las muestras en el isoelectroenfoque.

2. Estudio familiar

Con el fin de establecer si los fenotipos encontrados representan variaciones en la proteína transmisibles genéticamente, se estudió la descendencia familiar de sujetos caracterizados por la presencia de SHBG de dos bandas, así como de personas

caracterizadas por la de cuatro bandas. Los resultados de estos estudios (fig. 5), demostraron que familiares de los sujetos con SHBG de dos bandas presentaron únicamente el patrón caracterizado por dos bandas. Por otra parte, el estudio de descendientes portadores del patrón de cuatro y dos bandas demostraron que 50% de la descendencia de esta familia tuvo el patrón de cuatro bandas. Con estos resultados se comprobó la presencia de las variantes en una misma familia y la transmisión genética de los fenotipos encontrados.

3. Análisis genético

Por los estudios de población y familiares se puede sugerir la presencia de un sistema de segregación autosómico con la participación de dos alelos que se expresan de manera codominante. Así, es posible establecer un sistema para la SHBG constituido por dos alelos denominados SHBG-1 y SHBG-2. El alelo SHBG-1, codificaría para el fenotipo más frecuente o silvestre (95.45%), y el alelo SHBG-2 para las dos bandas adicionales presentes en el fenotipo de cuatro bandas. De esta forma, el fenotipo menos común que representa el patrón de cuatro bandas, estaría representado por el genotipo SHBG-1,2 (4.55%). Existe, sin embargo, la posibilidad real de otro fenotipo representado únicamente por la presencia de las dos bandas adicionales en el isoelectroenfoque. Este fenotipo correspondería al fenotipo SHBG-2,2, el cual no fue posible identificar en el presente estudio. El cálculo de la frecuencias génicas derivadas de los fenotipos encontrados en la población estudiada y comparada con la frecuencia génica esperada y expresada de acuerdo con la ley de

Hardy-Weinberg se muestra en la tabla 1. Como puede observarse, la frecuencia génica observada para la variante SHBG-1,2 no mostró diferencias estadísticamente significativas ($X^2 = 0.0027$; $p > 0.80$) con la frecuencia génica esperada para este fenotipo en la población estudiada. Por otra parte, la frecuencia esperada para la variante SHBG-2,2, de acuerdo con los fenotipos encontrados es de aproximadamente 0.50%, que equivale a 1 en 2 000 individuos ($q^2 = 0.0005$).

4. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las variantes

La repercusión de las variantes de carga sobre las características y propiedades de unión de la SHBG se llevó a cabo por análisis de saturación utilizando como ligandos radiactivos a la ^3H -DHT y ^3H -T. Estos estudios se realizaron a dos diferentes temperaturas (4°C y 28°C respectivamente) utilizando tanto los sueros de individuos con el patrón normal como con el variante. Al obtenerse las diferentes constantes de afinidad de las dos variantes fenotípicas de la SHBG, representadas como la constante de asociación y disociación y el número de sitios de unión, éstas no mostraron diferencias con significado estadístico independientemente de la temperatura estudiada (fig. 6). Por otra parte, la determinación de la velocidad (K-1) y vida media de disociación ($t^{1/2}$) de ^3H -T del sitio activo de la SHBG variante y silvestre se muestran en la figura 7. Como puede observarse, independientemente de la temperatura, la velocidad y vida media de disociación de la SHBG variante y silvestre no mostraron diferencias que fueran estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

5. Estudios a nivel molecular

Los resultados de los estudios arriba mencionados indican la existencia de variantes moleculares de la SHBG, debida probablemente a mutaciones genéticas o modificaciones a nivel estructural. Los estudios familiares indican que las modificaciones estructurales de la molécula de la SHBG son probablemente posteriores a mutaciones localizadas a nivel del gen que codifica para esta proteína. Con el fin de investigar esta posibilidad, parte de los objetivos de esta tesis fue la estandarización de métodos contemporáneos en biología molecular para ser utilizados en el estudio de mutaciones a nivel genético tomando como modelo experimental las variantes genéticas de la SHBG.

El enfoque experimental que se consideró más adecuado para conocer las causas y origen del polimorfismo genético de la SHBG fue la obtención de secuencias específicas del ADN genómico que codifican para la SHBG y su análisis por diferentes sistemas que involucrarían, en estudios futuros, la determinación de puntos de mutación por análisis de la secuencia de oligonucleótidos.

5.1 Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica:

Con el objeto de estudiar a nivel genético las posibles modificaciones causantes de la presencia de variantes estructurales de la SHBG, se procedió a obtener el ADN de sangre periférica de personas normales y portadoras de la variante. En la tabla 2 se muestran la concentración y pureza de los ADN obtenidos de los diferentes sujetos estudiados. Como puede observarse, y a juzgar por las relaciones de lecturas a dos diferentes longitudes de onda (260/280), las cuales fueron en su mayoría cercanas a

1.8, así como su análisis electroforético en geles de agarosa (fig. 8), los ADN obtenidos fueron adecuados y de buena calidad.

5.2 Amplificación de las secuencias codificadoras del gen de la SHBG:

Los exones del gen de SHBG se obtuvieron a partir de los ADN genómicos ejemplificados en la tabla 2 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Para esta finalidad se diseñaron y sintetizaron 16 cadenas de oligonucleótidos que delimitaran las secuencias que comprometen a cada exon del gen de la SHBG (fig. 8). Cada ciclo de amplificación se caracterizó por tres etapas o fases realizadas a diferentes temperaturas y tiempos. La primera fase de desnaturalización del ADN se llevo a 95°C. La segunda fase, que consistió en la hibridación de los oligonucleótidos a ambas cadenas del ADN, se llevó a cabo dependiendo del número de citosinas y guaninas presentes, las cuales se pueden observar en la tabla 3. La tercera y última fase, llamada fase de alargamiento enzimático del ADN, se hizo en todos los casos a 72°C por ser la temperatura óptima de la Taq polimerasa. En la tabla 4 se muestran las condiciones ideales para la amplificación, por reacción en cadena de la polimerasa, de segmentos específicos del ADN utilizando los oligonucleótidos señalados en la figura 2. Como se observa en la figura 9, la mayor parte de las porciones del ADN que se iban a analizar fueron amplificadas por este método a excepción de la correspondiente al exon 2. Para obtener esta región del ADN, se utilizaron los oligonucleótidos complementarios que delimitan a los exones 1 y 3. Las condiciones de la reacción incluyeron una temperatura de hibridación de 64°C y tiempos similares a los descritos en la tabla 4. Como se observa en la figura 10, la reacción

de amplificación enzimática delimitada por los oligonucleótidos 1 y 3 resultó en un producto con peso molecular similar al esperado (806 pb), demostrando que bajo estas condiciones fue posible obtener la región del ADN correspondiente al exon 2 del gen de la SHBG.

Con este método se procedió a obtener las regiones codificadoras del gen de la SHBG de sujetos normales y portadores de la variante. En la figura 11 se muestra el análisis en electroforesis en geles de agarosa de cada uno de los exones de los ADN estudiados. Como puede observarse, la movilidad electroforética correspondiente a cada uno de los exones estuvo de acuerdo con el peso molecular esperado que se muestra en la tabla 5, sin que exista ninguna diferencia entre sujetos normales y portadores de la variante de SHBG.

5.3 Hibridización de los exones de SHBG con la sonda específica:

Para establecer la especificidad de las porciones del ADN amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa, se procedió a hibridizar los productos de la reacción utilizando los fragmentos EcoRI 5',3' del cADN marcados previamente con dCTP³². En la figura 12 se muestran los fragmentos amplificados e hibridizados al cADN. Como se puede observar, todos mostraron complementaridad a la sonda utilizada, demostrando su identidad estructural en relación a las secuencias que caracterizan al gen de la SHBG.

5.4 Clonación en M13:

Como se señaló en la sección de material y método se utilizó al bacteriófago M13 como vector de clonación para obtener cadenas sencillas de ADN, y

secuenciarlas por el método de terminación de cadena utilizando los 2',3'-dideoxinucleósido 5'-trifosfato (ddNTP) de cada una de las bases en el ADN.

En la figura 13 se puede observar el vector tratado con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) y extraído con fenol/cloroformo. Después del tratamiento del ADN inserto con la enzima pol I con el propósito de llenar los extremos incompletos, se procedió a la ligación del vector y el inserto. Las concentraciones necesarias para la ligación de cada inserto se pueden observar en la tabla 6.

La transformación se realizó aprovechando las características de permeabilidad en la membrana de la bacteria huésped, provocadas por el choque térmico y la salinidad del cloruro de calcio, y se introdujeron los vectores de clonación M13 mp18 y mp19, los cuales son complementarios uno del otro (fig. 14). Estas bacterias se sembraron en medio de cultivo para permitir su crecimiento, tanto de las que tomaron el inserto (recombinantes), como de las que no lo hicieron. Estas últimas se identificaron en los experimentos testigo por la coloración azul que presentaron las colonias, dada por la actividad de la enzima β -galactosidasa de la bacteria sobre el sustrato X-gal, en diferentes porcentajes según el tipo de testigo, los cuales pueden observarse en la figura 15. El testigo número 1, que es el vector digerido con la endonucleasa y sometido a la reacción de ligación, determina la máxima eficacia de ligación y debe mostrar un 50% o menos de colonias azules. El testigo número 2 es el vector digerido, tratado con BAP y sometido a ligación, y muestra la eficacia al tratamiento con BAP. El número de colonias azules debe ser de 1% hasta de 10% dependiendo del éxito de este tratamiento. En el testigo número 3 se utiliza el vector

en forma replicativa sin haber sido tratado con la ligasa, este testigo determina la máxima eficacia de transformación y debe mostrar un 100% de placas azules. El testigo número 4 es el vector digerido con la endonucleasa sin tratarse en la reacción de ligación, y determina el fondo del experimento debido a vector no digerido, el número de colonias mostradas en este experimento testigo debe ser menor de 1%.

Se seleccionaron las recombinantes y con éstas se inocularon los medios de cultivo para infectar a las células huésped, que se hicieron crecer para posteriormente recuperar el ADN de cadena sencilla por medio de precipitación con PEG.

5.5 Estandarización del método de secuencia de ADN:

La identificación de cambios o puntos de mutación en las diferentes secuencias codificadoras del gen de la SHBG requiere de técnicas que permitan la secuenciación de las bases que componen al ADN. Los experimentos iniciales nos han permitido obtener con éxito la secuencia del vector de clonación M13 sin el inserto del ADN. Estos primeros resultados se observan en la figura 16, donde pueden leerse con claridad aproximadamente 200 bases que corresponden a la secuencia esperada.

DISCUSION

El objetivo principal de esta tesis fue la descripción y caracterización de variantes estructurales de la globulina transportadora en sangre de las hormonas sexuales como la testosterona y el estradiol. El escaso conocimiento del significado fisiológico, así como la falta de información sobre la deficiencia heredada de esta proteína y de la presencia de variantes estructurales en seres humanos, hacen importante el planteamiento de los objetivos de este estudio.

Por lo general la naturaleza heterogénea de la proteínas obedece a mutaciones en sus genes codificadores. Estas mutaciones consisten, en la mayoría de los casos, en la simple sustitución de una base o nucleótido del ADN, que da por resultado el cambio o ausencia de uno o varios aminoácidos en la estructura primaria de la proteína. Estas mutaciones son de graves consecuencias en organismos haploides; sin embargo, cuando sucede en organismos diploides, en los cuales la mutación toma lugar en uno de los dos loci genéticos, puede resultar benéfico a la especie animal de la que se trate. Este fenómeno se conoce con el nombre de polimorfismo en equilibrio. Sin embargo, según las leyes mendelianas de la herencia, los descendientes de dos organismos portadores (heterocigotos) del polimorfismo en equilibrio dará por resultado un número importante de individuos homocigotos al gen mutado caracterizados por la pérdida de su(s) función(es) que fue o fueron adquiridas por un fenómeno de selección natural.

En el organismo heterocigoto, la mutación genética le confiere la propiedad de expresar un "nuevo gen" además de tener los productos de transcripción, aunque en menor proporción, del locus alelo del gen mutado. En la población estos cambios provocan efectos relacionados con la eficacia biológica, y dependiendo de ésta condicionan la permanencia o desaparición (selección natural de la expresión y funciones de los productos de estos genes. Esta propiedad, de "adicionar nuevos genes" a la estructura genética de un individuo, representa uno de los mecanismos involucrados en los fenómenos de evolución y desarrollo que ocurren a nivel molecular.

En el ser humano existe un número importante de proteínas que representan ejemplos de polimorfismo estructural. El sistema mayor de antígenos leucocitarios, los grupos sanguíneos, isoenzimas y las globulinas transportadoras de glucocorticoides y tiroxina son algunas de las más importantes. En estas últimas las variantes genéticas son el resultado de la sustitución de un aminoácido en la cadena polipeptídica que le confiere a la proteína propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes a las de la molécula nativa. Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de una proteína permiten su identificación cuando son objeto de análisis utilizando técnicas apropiadas. En ausencia de preparaciones de alta pureza química de una proteína, la identificación de cambios a nivel de su estructura primaria puede realizarse por medio de técnicas que permitan la separación de moléculas que difieran tanto en peso molecular como en sus propiedades de carga. A este respecto, el isoelectroenfoque como sistema analítico tiene la propiedad de discriminar proteínas caracterizadas por

diferencias en sus propiedades de carga a pesar de tener pesos moleculares idénticos. En esta tesis se utilizó el isoelectroenfoque como sistema de análisis, con el fin de separar las variantes de carga molecular de la globulina humana transportadora de testosterona y estradiol, y la transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa para su identificación posterior con anticuerpos específicos. Con este método se analizaron 110 sueros de individuos adultos mexicanos que correspondieron a 55 matrimonios.

Es importante mencionar que la SHBG, por su contenido de carbohidratos, es una proteína de naturaleza heterogénea que muestra múltiples especies cuando es analizada mediante sistemas de electroenfoque. Esta característica de las glicoproteínas que impide naturalmente la identificación de variantes genéticas, en la mayoría de los casos es secundaria a la adición de manera diferencial de residuos de ácido siálico, que confiere a la molécula un número variable de cargas negativas. El tratamiento onzimático de la proteína con neuraminidasa elimina la mayor parte de los residuos de ácido neuramínico, lo que en su análisis posterior por isoelectroenfoque da por resultado la disminución considerable de especies moleculares. En este estudio, y previa separación por isoelectroenfoque, las muestras de suero fueron tratadas enzimáticamente con neuraminidasa. La evaluación de la eficacia del tratamiento enzimático de las muestras de suero se realizó en todos los casos mediante el análisis del punto isoeléctrico de la SHBG por técnicas de electroenfoque en geles de poliacrilamida. La hidrólisis enzimática de los residuos del ácido siálico confirió a la molécula de la SHBG un punto isoeléctrico más básico (6.9 ± 0.4) que el obtenido con la molécula nativa (5.4-5.85). Estos resultados preliminares nos permitieron evaluar

el tratamiento enzimático, y por otra parte uniformar los tipos de electroenfoque de la SHBG en la población estudiada. La ausencia de bandas y picos de actividad en el electroenfoque, ubicadas entre las áreas de pH de 5.85 y 6.5 en las muestras tratadas enzimáticamente, indicó que el tratamiento enzimático realizado fue uniforme y completo en todas las muestras estudiadas.

Con este método se procedió al estudio sistemático de 110 sujetos de uno y otro sexo. El análisis de las muestras de suero se realizó utilizando isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en placa, para estudiar en un solo análisis el mayor número posible de muestras de suero. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de dos fenotipos de la SHBG, el más frecuente (95.45% de los sujetos) caracterizado por dos bandas inmunorreactivas con puntos isoelectrónicos aparentes de 6.50, 6.63, 6.70 y 6.76, respectivamente, presente en el 4.55% de los individuos. Estos fenotipos se encontraron bajo diferentes condiciones experimentales, incluida la incubación con cantidades variables de la enzima. Estos resultados permitieron establecer que hay variantes polimórficas de la SHBG en la población estudiada. El análisis de muestras de suero provenientes de familiares de los sujetos afectados demostró la ocurrencia familiar y la posibilidad de la participación de bases genéticas en la transmisión de los fenotipos encontrados. El análisis del tipo de transmisión de los fenotipos de la SHBG concuerda con un sistema mendeliano autosómico, con la participación de los alelos que se expresan de manera codominante. Estos resultados están de acuerdo con la reciente demostración sobre la localización del gen de la SHBG en los brazos cortos del cromosoma 17⁵². Por otra parte, los resultados de estos estudios, nos permiten

sugerir por vez primera, que existe un sistema de genes polimórficos responsables de los fenotipos encontrados en este estudio. El patrón de dos bandas presente en la mayoría de los sujetos estudiados corresponde al fenotipo silvestre o al estado homocigoto normal (SHBG-1,1). De manera similar, el patrón de cuatro bandas constituido por las dos bandas del fenotipo silvestre más las dos bandas adicionales en el polo catódico del isoelectroenfoco corresponde al estado heterocigoto (SHBG-1,2) el cual representó el 4.55% de los casos. Desafortunadamente no fue posible identificar el fenotipo caracterizado por el estado homocigoto a la variante, el cual estaría constituido únicamente por dos bandas catódicas observadas en los heterocigotos (SGBH-2,2). Es interesante mencionar que el cálculo de las frecuencias génicas encontradas para el locus genético polimórfico constituido por dos alelos no fue diferente, desde el punto de vista estadístico, del cálculo de las frecuencias génicas esperadas ($\chi^2 = 0.059$, $P > 0.8 < 0.9$). Estos resultados establecen el equilibrio genético de nuestros hallazgos y nos permiten descartar razonablemente interferencias en la población estudiada sobre los resultados obtenidos. Como se mencionó antes, en este estudio no fue posible identificar el fenotipo SHBG-2,2 constituido sólo por las dos bandas con puntos isoelectrónicos de 6.70 y 6.76 respectivamente. Esto se debió, tal vez, a la baja probabilidad de identificar este fenotipo ($q^2 = 0.0005$) que de acuerdo con la frecuencia génica observada para el alelo SHBG-2 ($q = 0.0227$) su incidencia observada fue de aproximadamente 1/2000 individuos. Según estos resultados, y si tomamos en consideración que por polimorfismo genético se entiende la presencia de dos o más alelos en una población estudiada cuya frecuencia del más

raro es mayor de 0.01 y menor de 0.05, el presente estudio demuestra por primera vez la existencia de genes polimórficos de la SHBG humana.

Como resultado de este polimorfismo hay que esperar que haya alteraciones de las funciones de la SHBG. El estudio de algunas de las propiedades fisicoquímicas de esta proteína, como la estimación de sus características de afinidad por andrógenos no mostraron diferencias significativas con las obtenidas con la proteína nativa. Estos resultados indican que la mutación en la molécula de la SHBG como causa de la variante encontrada no afectó de manera importante el sitio activo de unión de los andrógenos. Por otra parte, no podemos descartar la posibilidad de alteraciones en otras funciones de la proteína, las cuales no se han descrito, o de difícil extrapolación de los resultados obtenidos en este estudio.

En la literatura existen informes relacionados con de variantes estructurales de la SHBG utilizando sistemas de análisis diferentes a los descritos en este estudio. Las investigaciones de Luckock y Cavalli-Sforza⁴² y de Ahrentsen y colaboradores⁵⁴ indican la existencia de variantes genéticas de la SHBG de acuerdo con su movilidad electroforética en geles nativos de poliacrilamida y por las propiedades de unión a los andrógenos, respectivamente. En estos informes se señala la presencia de un sistema genético autosómico constituido por la participación de tres alelos, que por los fenotipos encontrados, dos de ellos serían codominantes y uno recesivo. Estos estudios son de difícil interpretación ya que por las técnicas utilizadas no se puede descartar del todo la presencia de artefactos experimentales secundarios a la disociación y pérdida del andrógeno, utilizado como marcador, durante el

procedimiento de electroforesis. Por otra parte, estos estudios han sido de poco significado y penetrancia en la comunidad científica, muy probablemente debido a las limitantes metodológicas descritas antes. Es interesante mencionar que en estos informes sobre la presencia de variantes de la SHBG, existen individuos caracterizados por la deficiencia de esta proteína en sangre. A este respecto, en un número importante de individuos Hammond y colaboradores⁵⁸ analizaron la presencia de la SHBG por métodos inmunoradiométricos sin encontrar un solo caso de deficiencia en más de un millón de personas estudiadas. Esta investigación demuestra la baja incidencia de mutaciones en el gen de la SHBG responsables de alteraciones, o de la deficiencia de esta proteína en la especie humana.

Se desconoce la naturaleza del polimorfismo genético en este estudio; sin embargo, las mutaciones en el gen estructural, como causa de las variantes de carga observadas por isoelectroenfoque, son, a nuestro juicio, las posibilidades más viables y motivo también de estudio en la presente tesis.

Como se mencionó anteriormente, la SHBG es una globulina en cuya estructura primaria participan oligosacáridos de diferentes tipos. En términos generales, la SHBG contiene tres cadenas de carbohidratos localizadas en los aminoácidos treonina 7, asparagina 351 y asparagina 367. La estructura química de la SHBG consiste en dos componentes o protómeros con pesos moleculares y proporciones diferentes. Estos constituyentes de la proteína provienen de un precursor común de 373 aminoácidos cuya síntesis se encuentra codificada por un solo gen. La presencia de subunidades en la SHBG obedece a la adición variable de carbohidratos durante su síntesis, que da

por resultado diferencias en el contenido de azúcares en su estructura. A este respecto, una de las posibilidades para la presencia de variantes genéticas de carga de la SHBG es la mutación en sitios específicos de glicosilación, que origina la remoción o generación de cadenas de oligosacáridos.

Por el análisis de la estructura primaria de la SHBG existen sitios potenciales de mutación, los cuales podrían originar secuencias blanco para la acción de glicosiltransferasas y generar cadenas adicionales de oligosacáridos. Con el objeto de investigar estas posibilidades el presente trabajo de tesis se dedicó al estudio de las variantes de la SHBG, su estructura y secuencia. Esto se llevó a cabo principalmente por la realización de técnicas básicas utilizadas en la extracción, purificación, identificación y caracterización de ácidos nucleicos, así como las involucradas en el manejo de sondas, incluyendo técnicas de marcaje, clonación e hibridación. También se consideraron las relacionadas con la secuenciación de regiones específicas de oligonucleótidos obtenidas por amplificación enzimática utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en el ADN genómico. Los resultados obtenidos nos permitieron obtener fragmentos específicos del ADN, de sujetos normales y portadores heterocigotos de la variante, correspondiendo a cada una de las secuencias codificadoras del gen de la SHBG. Estudios de hibridación de cada uno de los productos de la reacción con el cADN de SHBG comprobó de manera satisfactoria la especificidad de la reacción y permitió la identificación de estas secuencias génicas obtenidas. Este método representa el paso inicial fundamental para el estudio y comprensión de los mecanismos causantes del polimorfismo estructural de la hSHBG.

Por otra parte, nos permitirá obtener suficiente material genético para su utilización en estudios posteriores de secuenciación, mutagénesis dirigida y estudios de expresión del gen para conocer y delinear las implicaciones funcionales de la SHBG y sus variantes moleculares en el ser humano. Este esfuerzo realizado para el establecimiento de infraestructura tecnológica en Biología de la Reproducción ha sido fundamental y de gran beneficio para el desarrollo de proyectos y programas presentes y futuros de investigación de nuestro grupo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra la existencia de variantes genéticas estructurales de la molécula de SHBG en el ser humano.

Los resultados obtenidos demostraron por vez primera, la participación de un sistema bialélico de genes que codifican para la SHBG que se expresan de manera codominante.

Por último, se estableció el método fundamental para el estudio de las bases genéticas responsables del polimorfismo estructural de la SHBG.

BIBLIOGRAFIA

1. Benhold H. Über die Adsorptionsfähigkeit der Serumkolloide tubularer Nierenkranker gegenüber Farbstoffen. *Z. Ges Exp Med*, 1926; 49:71. Referencia en Wagner RK. Extracellular and Intracellular steroid Binding Proteins. Properties, discrimination, assay and clinical application. *Acta Endocrinologica. Supplementum* 218. Copenhagen, 1978.
2. Westphal U. Steroid-protein interactions: monographs on endocrinology. Vol.4, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971.
3. Mercier C, Alfzen A, Baulieu E-E. A testosterone binding globulin. *Proceedings of the Second Symposium on Steroid Hormones, Ghent, 1965. Excerpta Medica International Congress Series*, 1966; 101:212.
4. Rosebaum W, Christy NP, Kelly WG. Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding beta-globulin in human plasma. *J Clin Endocrin Metab*, 1966; 26:1399.
5. Corvol P, Bardin CW. Species distribution of testosterone-binding globulin. *Biol Reprod*, 1973, 8:277-282.
6. Mowszowicz I, Khan D, Dray F. Influence of testosterone binding to serum proteins on aromatization by enzymes of human placental microsomes. *J Clin Endocrin Metab*, 1970; 31:584.
7. Petra PH, Namkung PC, Titani K, Walsh KA. Binding Proteins of Steroid Hormones.

Forest MG and Pugeat M eds. vol 149. John Libbey, London. 1986:15-30.

8. Corvol PL, Chrambach A, Rodbard D, Bardin CW. Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 1971; 246:3435.

9. Cheng CY, Musto NA, Gonsalus GL, Bardin CW. Demonstration of heavy and light protomers of human testosterone-estradiol-binding globulin. *J Steroid Biochem*, 1983; 19:1379-1389.

10. Hammond GL, Robinson PA, Sugino H, Ward DN, Finne J. Physicochemical characteristics of human sex hormone binding globulin: evidence for two identical subunits. *J Steroid Biochem*, 1986; 24:815-824.

11. Walsh KA, Titani K, Taklo K, Kumar S, Hayes R, Petra FH. Aminoacid sequence of the sex steroid binding protein of human blood plasma. *Biochemistry*, 1986; 25:7584-7590.

12. Que BG, Petra PH. Characterization of a cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma. *FEBS letters*, 1987; 219:405-409.

13. Petra PH, Santosh K, Rutheford H, Ericson LH, Titani K. Molecular organization of the sex steroid protein (SBP) of human plasma. *J Steroid Biochem*, 1986; 24:45-49.

14. Danzo BJ, Bell BW, Black JH. Human testosterone-binding globulin is a dimer composed of two identical protomers that are differentially glycosylated. *Endocrinology*, 1989; 124:2809.

15. Hammond GL, Underhill DA, Smith CL, Goping IS, Harley MJ, Musto NA, Cheng

- CY, Bardin CW. The cDNA deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. *FEBS letters*, 1987; 215:100-104.
16. Hammond GL, Underhill DA, Rykse HM, Smith CL. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol* 1989; 3(11):1869-1876.
17. Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1974;3:69-96.
18. Cunningham GR, Tindall DJ, Lobl TJ, Campbell J, Means AR. Characterization and comparison of the steroid specificity of human testosterone-estrogen binding globulin (TeBG) and rat cytoplasmic receptor (CR). *Proceedings VI International Congress of Endocrinology*, Feb 10-16, 1980; Melbourne, Australia, abstract # 802.
19. Forest MG, Rivarola MA, Migeon CJ. Percentage binding of testosterone, androstendione and dehydroisoandrosterone in human plasma. *Steroids*, 1968; 12:323.
20. Khan MS, Knowles BB, Aden DP, Rosner W. Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line. *J Clin Endocr Metab*, 1981; 53:448-449.
21. August GP, Trachuk M, Grumbach MM. Plasma testosterone-binding affinity and testosterone in umbilical cord plasma, late pregnancy, prepuberal children and adults. *J Clin Endocrinol*, 1969; 29:891.
22. Vermeulen A, Verdonck L, Van der Straeten M, Orie N. Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate. *J Clin Endocrin Metab*, 1969; 29:1470.

23. Pearlman WM, Crepy O, Murphy M. Testosterone-binding levels in the serum of women during the normal menstrual cycle, pregnancy and the post-partum period. *J Clin Endocrinol*, 1967; 27:1012.
24. Demisch K, Grant JK, Black W. Plasma testosterone in women in late pregnancy and after delivery. *J Endocrinol*, 1969; 42:477.
25. Sandberg AA, Slaunwhite UR Jr. Transcortin: A corticosteroid binding globulin of plasma. Levels in various conditions and the effect of oestrogens. *J Clin Invest*, 1959; 38:1290.
26. Dray F, Sebaoun J, Delzant G, Ledru MJ, Mowszowicz J. Activité de liaison de la testostérone dans le sérum des femmes présentant un virilisme pileux idiopathique. *Rev Franc Etud Clin Biol*, 1968; 13:622.
27. De Moor P, Steeno O, Heyns W, Van Baelen H. The steroid binding beta-globulin in plasma: pathophysiological data. *Ann Endocr (Paris)*, 1969; 30:233.
28. Burke CW, Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin is an oestrogen amplifier. *Nature*, 1972; 240:38.
29. Rosner W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocrine Reviews*, 1990; 11:80-91.
30. Westphal U. Interaction between steroids and proteins. In: Mechanism of action of steroid hormones. Eds.: C.A. Villea and L.L. Engel, New York, Pergamon Press. 1961: p.33.
31. Partridge WM. Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones. *Am J Physiol*, 1987; 252:E 157.

32. Strel'chyonok OA, Avvakumov GV, Survilo LI. A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 802:459.
33. Hryb DJ, Khan MS, Rosner W. Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 128:432.
34. Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate. *J Biol Chem*, 1989; 264:5378.
35. Avvakumov GV, Zhuk Ni, Strel'chyonok OA. Subcellular distribution, and selectivity of the protein-binding component of the recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium. *Biochem Biophys Acta*, 1986; 881:489.
36. Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. The control of interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J Biol Chem*, 1990; 265:6048-6054.
37. Murphy BEP. Binding of testosterone and estradiol in plasma. *Canad J Biochem*, 1968; 46:299-302.
38. Mischke W, Weise HC, Graesslin D, Rusch R, Tamm J. Isolation of highly purified sex hormone binding globulin (SHBG); evidence for microheterogeneity. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1979; 90:737-742.
39. Van Baelen H, Brepuels R, De Moor P. Transcortin Leuven: a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol-binding affinity. *J Biol Chem*,

1982; 257 (7):3397-3400.

40. Grimaldi S, Bartalena L, Ramacclotti C, Robbins J. Polymorphism of human thyroxine-binding globulin. *J Endocrinol Metab*, 1983; 57:1186-1192.
41. Janssen EU, Takeda K, Refetoff S. Sequence of the variant thyroxine-binding (TBG) in a Montreal family with partial TBG deficiency. *Hum Genet*, 1991; 87:119-122.
42. Luckock A, Cavalli-Sforza LL. Detection of genetic variation with radioactive ligands. V. Genetic Variants of testosterone-binding globulin in human serum. *Am J Hum Genet*, 1983; 35:49-57.
43. Signer E, Kuenzle C, Thomann P, Hubscher U. DNA fingerprinting: improved DNA extraction from small blood samples. *Nucl Acids Res*, 1988; 16:773.
44. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230:1350-1354.
45. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988; 239:487-491.
46. Blin N, Gabain AV, Bujard H. Isolation of large molecular DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes. *FEBS Lett*, 1975; 53:84-86.
47. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 1983; 132:6-13.
48. Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves

- competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 1974; 6: 23-28.
49. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci*, 1949; 51:660-672.
50. Petra PH, Stanczyk FZ, Seneor DI, Namkung PC, Novy MJ, Alexander Ross JB, Turner E, Brown JA. Current status of the molecular structure and function of the plasma sex steroid-binding protein (SBP). *J Steroid Biochem*, 1983; 19:699-706.
51. Cheng CY, Bardin CW, Musto NA, Gunsalus GL, Chen SL, Ganguly M. Radioimmunoassay of testosterone-estradiol-binding globulin in humans: a reassessment of normal values. *J Clin Endocr Metab*, 1983; 56:68-75.
52. Bérubé D, Séralini GE, Gagné R, Hammond GL. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet Cell Genet*, 1990; 54:65-67.
53. Mandel M, Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970; 53: 159-162.
54. Ahrentsen OD, Jensen HK, Johnsen SG. Sex-hormone-binding globulin deficiency. Letters to the editor. *Lancet* ii, August, 1982.
55. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103-119.
56. Messing J, Gronenborg B, Muller-Hill B, Hofschneider PH. Single-strand filamentous DNA phage as a carrier for in vitro recombined DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74:3642-3643.

57. Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*, 1983; 101:20.
58. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74:5463.
59. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*, 1981; 214:1205.
60. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

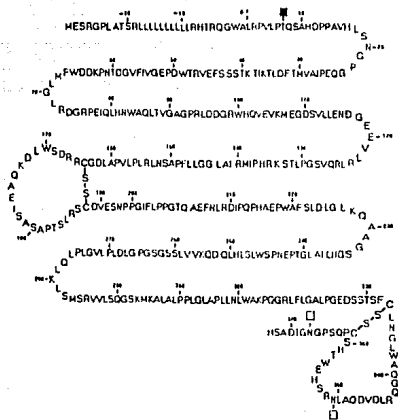


Figura 1: Estructura primaria del precursor de la SHBG. Los sitios de unión de las cadenas de oligosacáridos se encuentran señalados por cuadrados; el negro indica la cadena unida por un enlace glicosídico a la treonina, y los blancos, las cadenas unidas por un enlace glucosamina a la asparagina. El péptido señal está constituido por 29 aminoácidos al inicio de la figura.

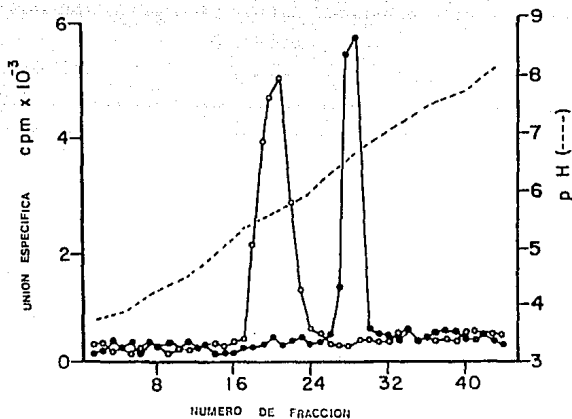


Figura 2: Perfil de unión del isoelectroenfoco en tubo de una muestra de suero tratada (●) y no tratada (○) con neuraminidasa, obtenido por medio de ensayo de un solo punto de los eluatos de los fragmentos de los gels. El primer pico corresponde a la SHBG nativa, y el segundo, a la SHBG desializada.

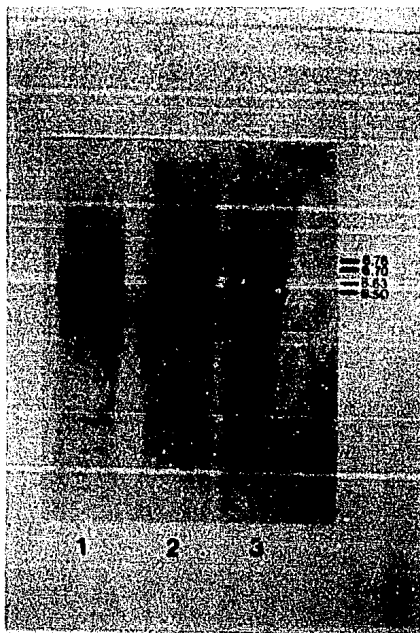


Figura 3: Patrones de bandas obtenidos en el isoelectroenfoque en gels de poliacrilamida en placa seguido de inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de muestras de suero desializadas. En la líneas 1 y 2 se muestra el patrón de bandas de la SHBG obtenido en el 95.45% de los casos, denominado fenotipo silvestre. En la línea 3 se muestra el fenotipo variante, encontrado en el 4.55% de los casos.

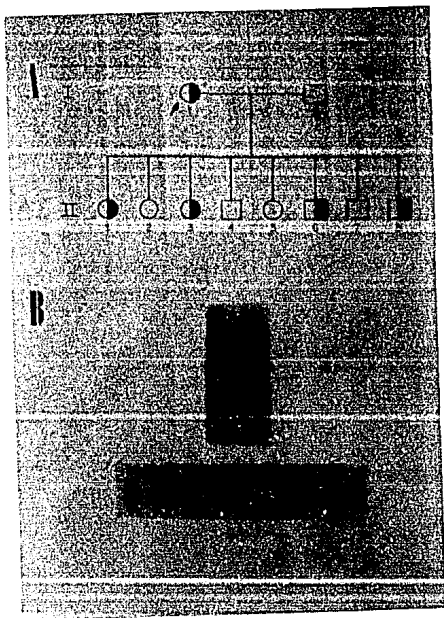


Figura 4: A) Esquema de la transmisión de los fenotipos silvestre y variante. Los círculos representan a las mujeres, y los cuadros a los hombres. El color blanco indica el fenotipo silvestre, y el blanco-negro, el fenotipo variante. B) Patrón de bandas obtenido en el isoelectroenfoco en placa y la inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de las muestras de suero desializadas. Las líneas superiores corresponden a los sueros de los padres y las inferiores a los de los hijos.

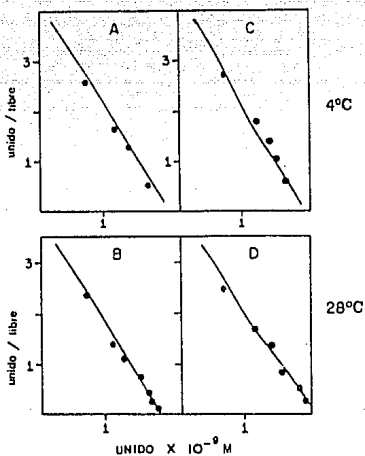


Figura 5: Gráficas de Scatchard obtenidas con muestras de suero que presentaron el fenotipo silvestre (A y B) y el fenotipo variante (C y D) de la SHBG, llevados a cabo a 4°C y a 28°C. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.

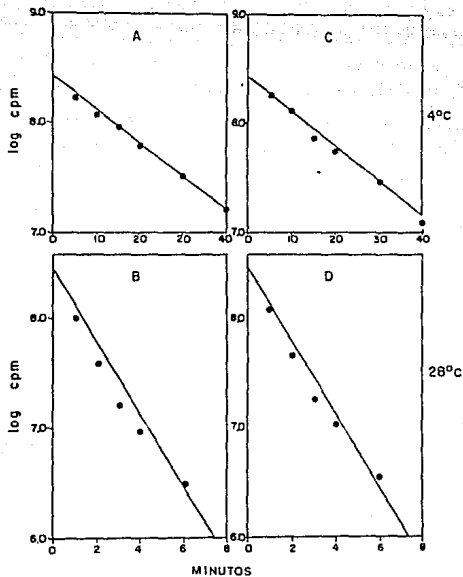


Figura 6: Representación gráfica de la velocidad de disociación del complejo SHBG-testosterona en muestras de suero con fenotipo silvestre (A y B) y con fenotipo variante (C y D), a 4°C y a 28°C. Cada punto representa el promedio obtenido de tres determinaciones.

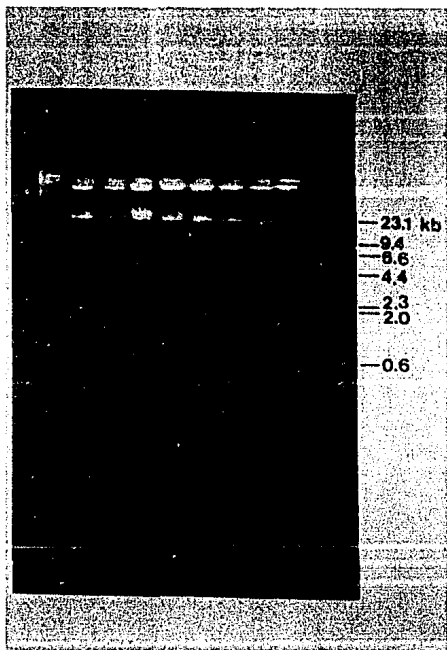


Figura 7: Análisis electroforético en agarosa 1% que muestra los ADN genómicos obtenidos a partir de sangre periférica de los sujetos normales y portadores de la variante.

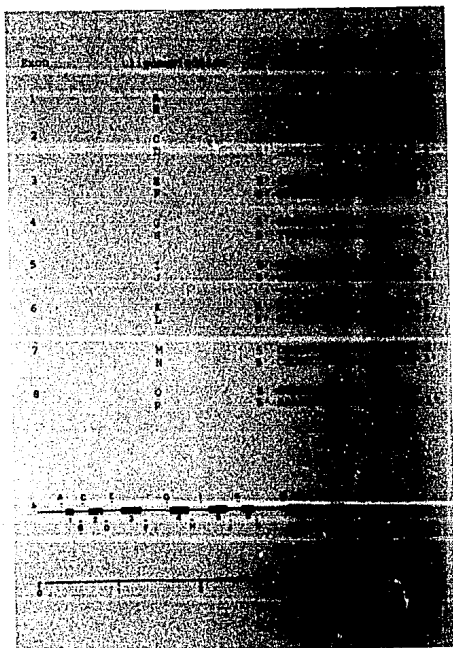


Figura 8: Secuencias y sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados. Estos sitios de hibridación delimitan las secuencias de cada exon del gen de la SHBG.

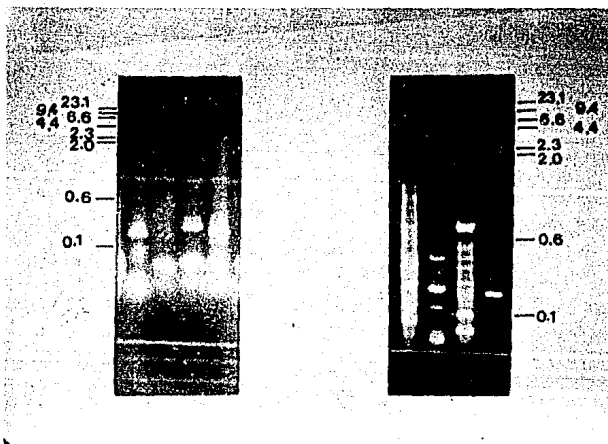


Figura 9: Análisis electroforético en agarosa al 1% de los exones estudiados. La movilidad electroforética corresponde al peso molecular esperado para cada uno de los fragmentos.

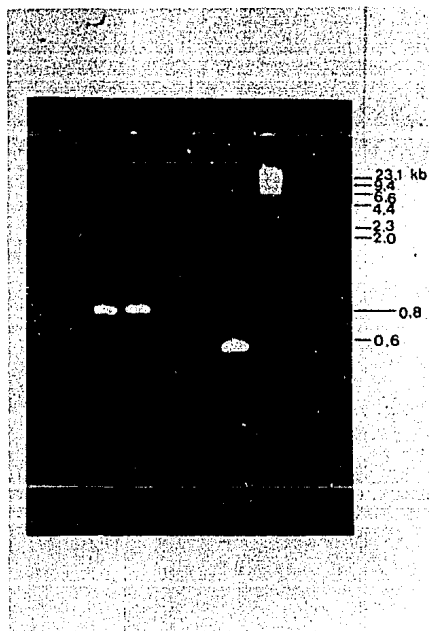


Figura 10: Análisis electroforético en agarosa 1% del producto de PCR del exon 2 delimitado por los oligonucleótidos 1A y 3F. El peso molecular del fragmento obtenido corresponde al esperado (806 pb).

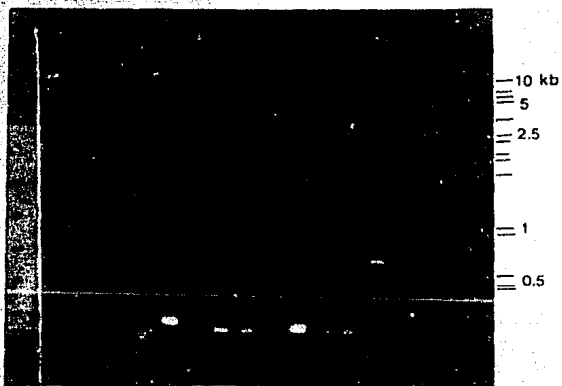


Figura 11: Análisis electroforético en agarosa al 1% de cada uno de los exones estudiados. La movilidad electroforética no presenta ninguna diferencia entre sujetos normales y portadores de la variante.

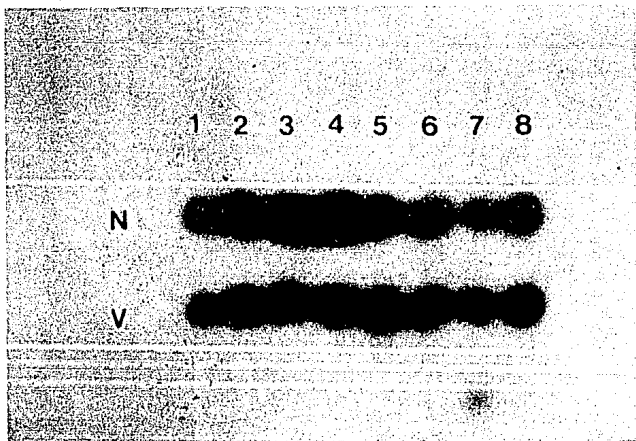


Figura 12: Hibridación de los ocho fragmentos amplificados del ADN de individuos normales y portadores de la variante al ADNc. Todos muestran complementariedad a la sonda utilizada y demuestran su identidad estructural en relación con las secuencias del gen de la SHBG.

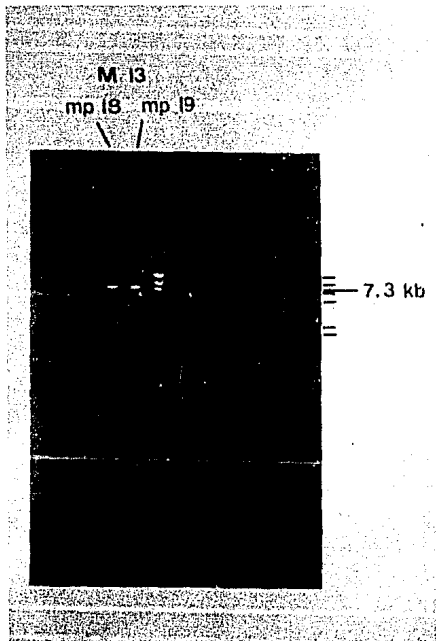


Figura 13: Análisis electroforético en agarosa al 1% de los vectores de clonación M13 mp18 y mp19 tratados con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP). El peso molecular es de 7253 pb.

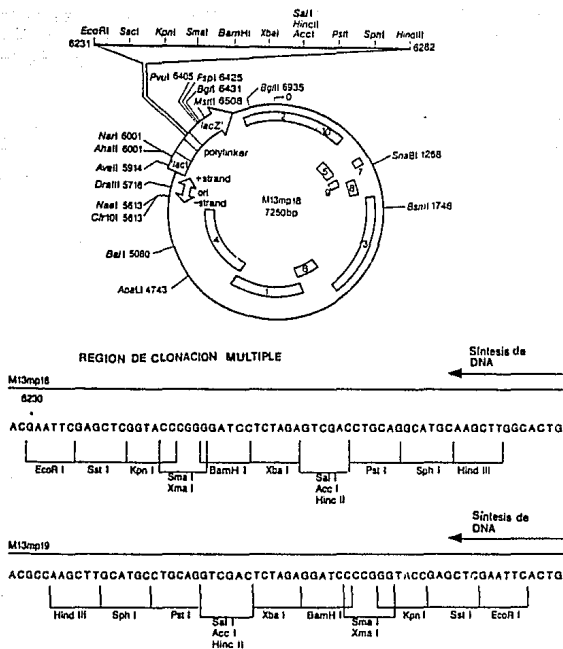


Figura 14: Mapa del vector de clonación M13 que muestra las regiones múltiples de clonación en mp18 y mp19.

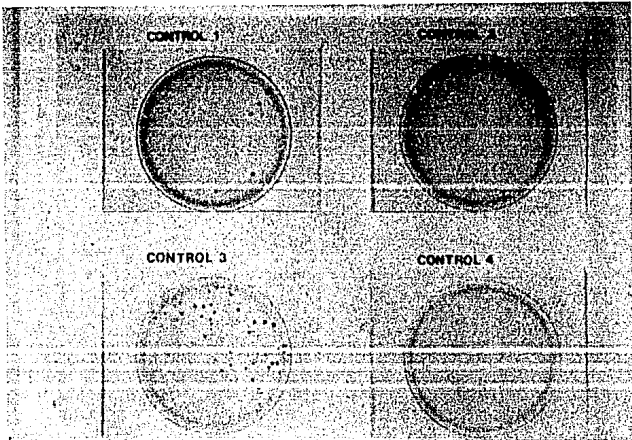


Figura 15: Experimentos testigo de la eficacia de transformación de E.coli dada por la coloración azul de las colonias. El testigo número 1 demuestra la eficacia de ligación; el número 2 la eficacia del tratamiento con BAP; el número 3 la eficacia de transformación y el número 4 el fondo del experimento por vector no digerido.

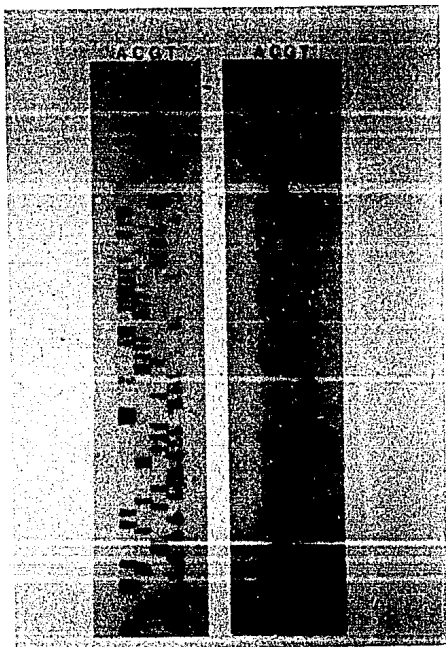


Figura 16: Secuencia del vector de clonación M13 obtenida por el método de Sanger^{58,59}

Genotipo	Fenotipos observados		Fenotipos esperados*		X ²	P
	No.	%	No.	%		
hSHBG-1,1	105	95.45	105.05	95.50	0.000023	
hSHBG-1,2	5	4.55	4.88	4.44	0.00272	
hSHBG-2,2	0	0	0.056	0.051	0.0567	>0.8<0.9
	110	100	110	100	0.05944	

* De acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg (frecuencia esperada de hSHBG-1,1 = p²; frecuencia esperada de hSHBG-1,2 = 2pq; frecuencia esperada de hSHBG-2,2 = q²).

Tabla 1: Frecuencias génicas observadas y esperadas para los fenotipos encontrados en la población.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Pureza 260 nm/280 nm
99	156	1.7
100	131	1.8
103	145	1.7
104	129	1.8
105	245	1.6
107	103	1.7
108	71	2.3
109	20	1.8

Tabla 2: Concentración y grado de pureza de los ADN obtenidos a partir de sangre periférica de los diferentes sujetos estudiados.

exon	oligonucleótido	cadena	CG	AT	Temperatura °C
1	A	3' - 5'	13	7	66
	B	5' - 3'	13	7	66
2	C	3' - 5'	9	11	58
	D	5' - 3'	13	7	66
3	E	3' - 5'	12	8	64
	F	5' - 3'	10	10	60
4	G	3' - 5'	13	7	66
	H	5' - 3'	12	8	64
5	I	3' - 5'	14	7	70
	J	5' - 3'	15	5	70
6	K	3' - 5'	8	12	56
	L	5' - 3'	12	8	64
7	M	3' - 5'	12	8	64
	N	5' - 3'	11	9	62
8	O	3' - 5'	4	16	48
	P	5' - 3'	10	10	60

Tabla 3: Características de los oligonucleótidos complementarios a ambas cadenas del ADN. Se muestra la proporción de bases púricas y pirimídicas presentes en cada oligonucleótido, además de las temperaturas de hibridización.

Exon	Oligonucleótido	Pb	Etapa 1 Desnaturalización 3 minutos	Etapa 2 Hibridación 4 minutos	Etapa 3 Síntesis 5 minutos
1	A-B	246	95°C	63°C	72°C
2	B-E	806		58°C	
3	E-F	310		63°C	
4	G-H	275		62°C	
5	I-J	277		66°C	
6	K-L	266		60°C	
7	M-N	336		63°C	
8	O-P	254		58°C	

Tabla 4: Condiciones ideales de amplificación para cada uno de los ocho exones del gen que codifica para la SHBG.

Exon	pb	PM
1	246	162 360
2	806	531 960
3	230	151 800
4	275	181 500
5	277	182 820
6	266	175 560
7	336	221 760
8	254	167 640

Tabla 5: Peso molecular y tamaño esperado para cada exon.

Exon	ng/ligación
1	0.65
2	2.00
3	0.60
4	0.73
5	0.73
6	0.70
7	0.89
8	0.67

Tabla 6: Concentraciones necesarias de cada inserto de acuerdo a su peso molecular, para la reacción de ligación al vector M13.