



00381

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

12
2ej.

**FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE DNA,
EN UNA MUESTRA SELECCIONADA DE LA
POBLACION MEXICANA.**

TESIS

que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

PRESENTA:

M. en C. Q. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

COTUTOR:

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA
Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

a Pável y a Castalia Alenka

**con todo mi amor y agradecimiento por su comprensión y apoyo en el
tiempo dedicado a esta tesis**

**Con profundo agradecimiento al Dr. Fabio Salamanca Gómez
por el apoyo incondicional en la dirección de la presente tesis,**

**al Dr. Alejandro García Carrancá por su amistad, paciencia y
guía en el trabajo de laboratorio de Biología Molecular,**

**y al Dr. Jaime Berumen por sus opiniones acertadas y la
oportunidad de realizar parte del trabajo en el laboratorio de
Biología Molecular de la Escuela Médico Militar**

**a mis padres Rogelio y Amparo
por su amor y su confianza**

**a mis hermanas César, Celis, Rogelio C. Saúl,
Eva Catalina, Edna Antonia y Gina Estela, y a
sus respectivas familias por la fraternidad de siempre**

**a mis maestros,
por sus valiosas enseñanzas**

**a mis compañeros y amigos:
de la Unidad de Investigación
en Genética Humana, particularmente
a Carlos, Graciela, Luzma, Lucc,**

**del Instituto de Investigaciones Biomédicas,
a Lupita, Mayra, Miriam, Marco...**

**de la Escuela Médico Militar
a Leonora, Pilar, y especialmente a Erika.**

CONTENIDO	Pág
I. RESUMEN	5
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
III. ANTECEDENTES	
A. MARCADORES GENETICOS	7
a) CLASIFICACION	8
b) METODOS DE DETECCION	8
c) POLIMORFISMOS MOLECULARES	10
d) ESTUDIOS EN LA BIOMEDICINA	13
e) UTILIDAD EN GENETICA DE POBLACION	14
B. HEMOGLOBINAS	
a) ESTRUCTURA Y FUNCION	16
b) REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES BETA	19
c) HEMOGLOBINAS ANORMALES	21
d) ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES	22
e) HAPLOTIPOS DE DNA	24
f) PREVENCION DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS	28
g) TERAPIA GENICA	30
IV. OBJETIVOS	32
V. HIPOTESIS	33
VI. MATERIAL Y METODOS	
A) POBLACION ESTUDIADA	34
B) METODOLOGIA	34
VII. RESULTADOS	38
VIII. DISCUSION	58
IX. CONCLUSIONES	63
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Pág
1. CLASIFICACION DE LOS MARCADORES GENETICOS	9
2. MARCADORES GENETICOS EN LA BIOMEDICINA	13
3. FRECUENCIAS GENICAS DEL SISTEMA ABO Y Rh EN SEIS GRUPOS HUMANOS	14
4. ESTIMACION DE MEZCLA TRIHIBRIDA DE ESTUDIOS MEXICANOS PREVIOS, ORDENADOS POR CANTIDAD DE ANCESTROS INDIGENAS	15
5. HAPLOTIPOS CARACTERISTICOS EN GENES β^S , β^C , β^{TAL} Y β^A EN DIFERENTES POBLACIONES	27
6. LOCALIZACION DE LOS SITIOS POLIMORFICOS EN LOS GENES ESTUDIADOS Y FRAGMENTOS OBTENIDOS POR LOS METODOS DE SOUTHERN Y PCR	37
7. FRECUENCIA DE FENOTIPOS EN LA POBLACION ESTUDIADA	47
8. HAPLOTIPOS EN LAS FAMILIAS ESTUDIADAS	48
9. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS β -GLOBINICOS EN MEXICANOS	50
10. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS EN LOS CROMOSOMAS β^S Y β^A	52
11. FRECUENCIA DE CROMOSOMAS BANTU EN VARIAS POBLACIONES	60

1. Representación esquemática del cromosoma 12 con sitios de sondas y frecuencia de recombinación en cromosomas femeninos (F) y masculinos (M).	12
2. Esquemas de la molécula de la hemoglobina donde se observan los grupos hemo dentro de las cadenas α y β .	16
3. Representación esquemática de las familias alfa y beta globínicas en los cromosomas correspondientes.	17
4. Combinación de genes para formar las diferentes hemoglobinas normales	18
5. Expresión de los genes globínicos durante el desarrollo del individuo	18
6. Micrografía de eritrocitos en forma de hoz por Hb S .	24
7. Localización geográfica de los haplotipos β -globínicos típicos	26
8. Electroforesis de hemoglobinas	38
9. Mapa de restricción del plásmido pH β	39
9a. Caracterización del plásmido pH β	39
10. Mapa de restricción del plásmido JW 151	41
10a. Caracterización del plásmido JW 151	41
11. Electroforesis de DNA cortado con Hind III con marcadores de PM	42
11a. Autorradiografía de Southern mostrando el polimorfismo de los sitios Hind III ligados a los genes $G\gamma$ y $A\gamma$	43
12. Autorradiografía de Southern con el polimorfismo de los sitios Ava II,	44
13. Autorradiografía de Southern con el polimorfismo de los sitios Bam HI,	45
14. Autorradiografía de Southern mostrando el polimorfismo de los sitios Hpa I ligados al gen β	46
15. Amplificación por PCR de las regiones 5' y 3' del gen ψ β	47
16-17. Haplotipos de las Familias 1 - 2	53
18. - Haplotipos de la familia - 3	54
19-22. Haplotipos de las Familias 4 - 7	55
23-25. Haplotipos de las Familias 8-10	56
26-28. Haplotipos de las Familias 11-13	57
29. Recombinación de haplotipos	60

FREQUENCY OF DNA POLYMORPHISMS IN A SELECTED MEXICAN POPULATION WITH β^S MUTATION-
ABSTRACT

Five polymorphic restriction enzyme sites in the beta globin gene cluster (Hind III ^{G^A}, Hind III ^{A^G}, Ava II-B, Hpa I-B, Bam HI-B-globin gene) were investigated in 13 homozygotes patients for sickle cell anemia, two double heterozygotes: one ^{SC} and one ^{B^S/B^A} in 35 AS heterozygotes (23 parents and 12 siblings), one father ^{B^S/B^A} and three normal siblings, all from Veracruz State, and 17 normal Mexican unrelated subjects, using Southern blot technique. Fifteen haplotypes were identified in the 142 chromosomes. Four of them were the most frequent: two haplotypes (+ - + + +) (52.4 per cent) and (- - + - +) (19.0 per cent) were associated with ^{B^S} chromosomes and two (- - + + +) (38.2 per cent) and (- - - + +) (19.7 per cent) were linked with ^{B^A} chromosomes. The first one haplotype correspond to the Bantu or Senegal type. With Hinc II analysis after PCR amplification in both 5' and 3' regions of the pseudo-beta globin gene it is possible to distinguish between these African types, as in the former both restriction sites are absent. This analysis was done in 23 ^{B^S} and 10 ^{B^A} chromosomes. Bantu and Benin haplotypes have been found with high frequency in African populations. All ^{B^S} chromosomes disclosed the Bantu type while ^{B^A} were similar to Caucasian chromosomes. Bantu and Benin haplotypes have been found with high frequency in African populations indicating the great influence of African genes in the population of the Mexican coasts. In addition, nine of the 13 families were informatives for the analysis segregation. These results, the first one in the beta-globin gene cluster in Mexicans, have influence in the population and molecular genetic, and in the prevention of the hemoglobinopathies for genetic counseling and prenatal diagnosis.

2. RESUMEN

Se investigó la frecuencia de siete sitios de restricción de polimorfismos ligados en la familia de genes beta-globínicos (Hind III $G\gamma$ -, Hind III $A\gamma$ -, Ava II $inv-2\beta$ - y Hpa I y Bam HI β -globina, y Hinc II 5' y 3' $\psi\beta$ -globina), en 15 pacientes con anemia de células falciformes de los cuales 13 fueron homocigotos SS, uno doble heterocigoto SC y otro $\beta^0\text{Tal}$; en 35 heterocigotos AS (23 padres y 12 hermanos), un padre $A/\beta^0\text{Tal}$ y tres hermanos normales, pertenecientes a 13 familias nucleares del Estado de Veracruz, y en 17 individuos voluntarios sanos (AA) no relacionados.

Se encontraron 13 haplotipos diferentes en los 142 cromosomas estudiados por el método de Southern. Dos de ellos (+- +++) y (- - +-+) fueron los más frecuentes en los cromosomas β^S (52.4 y 19.0 por ciento respectivamente), y dos (- - +++) y (- - -++) se encontraron ligados a los cromosomas β^A (38.2 y 19.7 por ciento). Por amplificación con PCR del gen 5' y 3' $\psi\beta$ -globina y corte con la enzima Hinc II, se analizaron 23/33 (70 por ciento) de los haplotipos (+- +++) β^S los que mostraron ser de tipo Bantú; el segundo haplotipo es característico de la población africana de Benin, el tercer haplotipo se ha explicado por recombinación o entrecruzamiento y el cuarto sólo se encontró en cromosomas β^A . Estos últimos haplotipos son similares a los informados en poblaciones caucásicas y asiáticas. Los resultados indican la gran influencia de genes africanos en población con anemia de células falciformes, la recombinación génica y la presencia de genes caucásicos y asiáticos en la población mestiza mexicana.

También se realizó el análisis de segregación de los haplotipos, encontrando nueve familias informativas de las trece estudiadas. Los hallazgos de este trabajo, el primero realizado con metodología de biología molecular en la familia de genes β -globínicos en la población mexicana, tienen repercusión en el campo de la genética molecular y de la población, en el conocimiento de los haplotipos ligados a la mutación β^S y abren nuevos horizontes para la prevención de las hemoglobinopatías mediante el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal en nuestro país.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La población mexicana ha sido caracterizada utilizando diferentes marcadores glicoproteicos, como son los antígenos celulares eritrocíticos y leucocíticos (grupos sanguíneos y sistema HLA), enzimas eritrocitarias como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la fosfoglucomutasa (PGM), la fosfatasa ácida eritrocítica (FAE) y proteínas séricas como las haptoglobinas (Hp), el componente del grupo específico (Gc), las transferrinas (Tf), las albúminas (Alb), etc. (Lisker, 1981). Estos datos han permitido mostrar un panorama general de la proporción de genes (indígenas, caucásicos y negros) que conforman los diferentes grupos poblacionales del país, además de encontrar algunas características particulares (hemoglobinas México, Chiapas, etc.). Por otra parte, el estudio de los marcadores genéticos ha tenido gran importancia en la investigación en biomedicina para el diagnóstico y la prevención de padecimientos hereditarios (Lisker, 1981; Lisker et al., 1990; 1994; Peñalzo y Lisker, 1994; Peñalzo y Salamanca, 1994).

En los últimos años, el empleo de las enzimas de restricción ha permitido el establecimiento de polimorfismos directamente en la molécula del DNA, lo que ha revolucionado la localización o mapeo de los genes en los cromosomas, el diagnóstico y la prevención de los padecimientos genéticos, así como el análisis de los orígenes de una mutación en una población dada. Una de estas metodologías es el análisis de una serie de sitios polimórficos ligados en un mismo cromosoma, identificados con enzimas de restricción, próximos al gen estructural donde ocurrió la mutación, cuyo patrón específico recibe el nombre de "haplotipo" (Nagel y Ranney, 1990; Waincoat et al., 1986). Los haplotipos se han utilizado como marcadores genéticos para determinar si una mutación apareció una sola vez en una región dada (origen unicéntrico) o varias veces en diferentes lugares (multicéntrico) y para rastrear el origen de una mutación tal como la β^S en otras poblaciones (Mears et al., 1981; Pagnier et al., 1984; Chebloune et al., 1988; Nagel y Ranney, 1990).

Por otra parte, se calculó que para 1992 habría 76 millones de portadores de la anemia de células falciformes (Nagel y Ranney, 1990) cuya mayoría se encuentra en poblaciones africanas, y en aquellos lugares en donde ha habido migración de estos grupos como sucedió en nuestro país en la época de la Colonia. Este dato es importante, porque cada pareja de portadores tiene el 25 % de riesgo, en cada embarazo, de procrear un hijo afectado que sufrirá de anemia hemolítica grave. Por estas razones, es necesario realizar

estudios desde el punto de vista genético, epidemiológico, antropológico y médico, ya que es posible realizar medidas preventivas mediante la identificación de individuos heterocigotos, y además, contribuir a la caracterización de la población mexicana.

En la presente tesis consta de dos partes. En la primera se analizan el trabajo en sí con el planteamiento del problema, los antecedentes de los marcadores genéticos y de las hemoglobinas que fueron las bases de los objetivos y las hipótesis, los resultados y la discusión del trabajo, y en la segunda parte se presenta el artículo enviado y aceptado para su publicación en la revista American Journal of Human Biology.

III. ANTECEDENTES.

III. A. MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos son factores hereditarios, polimórficos, definidos como la presencia de dos o más variantes (alelos) de cualquier sistema de genes, donde el más raro de ellos no puede explicarse por mutaciones recurrentes, lo que significa que tiene una frecuencia mayor del uno por ciento en la población general. El estudio de los marcadores genéticos se inició con el descubrimiento de los grupos sanguíneos a principios de siglo (Landsteiner, 1901 ampliado por Race y Sanger, 1975) y continuó en la década de los 1950s con el hallazgo de las variantes electroforéticas de las proteínas séricas (Smithies y Walker, 1955; Giblett, 1969). Posteriormente se descubrieron los antígenos del sistema HLA en leucocitos (Payne, 1964; revisado por Bodmer, 1986) y recientemente, los fragmentos de restricción polimórficos de longitud variable (RFLPs) (Kan y Dozy, 1978; Botstein et al., 1980) y los nucleótidos repetidos en número variable (VNTRs), ambos analizados en la molécula del DNA (Nakamura et al., 1987).

Para que un factor hereditario sea considerado como marcador debe cumplir con tres requisitos indispensables: 1) que en su expresión intervenga poco o nada el medio ambiente, 2) que permanezca sin cambio en la vida de los individuos, y 3) que su modo de herencia sea mendeliano simple.

III. A. a. CLASIFICACION DE LOS MARCADORES GENETICOS

Los marcadores genéticos pueden clasificarse en: 1) Glicoproteicos y 2) de DNA (Tabla 1). Entre los primeros se encuentran: f) los antígenos eritrocíticos, como los grupos sanguíneos ABO, Rh, MN, Ss, Fy, P, etc; los intraeritrocíticos, como las variantes de la hemoglobina (A, S, C) y las enzimas, como la G6PD, PGM y FAE, entre otras; g) los leucocíticos, que comprenden los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad o Sistema HLA, y h) los séricos, en donde se encuentran las variantes electroforéticas de Hp, Tf, Aib, Gc y los alotipos Gm, Am y Km de las inmunoglobulinas, entre otros. Los marcadores de DNA son i) los RFLPs que pueden ser nucleares o mitocondriales y j) los VNTRs que son nucleares, se han empleado en estudios detallados de genes responsables de patología en el hombre. No se incluyen en la Tabla I los marcadores cromosómicos o citogenéticos que en su mayoría corresponden a variantes de la heterocromatina constitutiva (Salamanca, 1990a).

Los marcadores proteicos han sido bien caracterizados, y se conoce tanto su función como los genes que los codifican. Por ejemplo, el sistema ABO se encuentra codificado en el cromosoma 9q31.3-qter, el sistema Rh en el cromosoma 1p36.2-p34, la G-6-PD en el Xq28, el sistema HLA en el 6p21.3, la albúmina y la proteína Gc en el 4q12, la Tf en el 3q21, la FAE-1 en el 2p25; las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en 14q32.33, etc. (McKusick, 1990).

III. A. b. METODOS DE DETECCION DE LOS MARCADORES GENETICOS

Los métodos utilizados para la detección de los marcadores genéticos son de varios tipos. Algunos de los más comunes son: 1) los inmunológicos, como las reacciones de aglutinación antígeno-anticuerpo para identificar los grupos sanguíneos; las pruebas de citotoxicidad, para detectar los antígenos HLA clase I, el cultivo mixto de linfocitos, para identificar los antígenos HLA Clase II; 2) la electroforesis, en diferentes tipos de soporte (almidón, agarose, acrilamida) y sus variaciones, como el isoelectroenfoco (Righetti, 1983), en donde se identifican las variantes electroforéticas de enzimas eritrocíticas y proteínas séricas, 3) los métodos de Southern (1975) y 4) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos de DNA y evidenciar su polimorfismo por la

presencia o ausencia del sitio de corte de alguna enzima de restricción específica, o con sondas alelo-específicas o polimerasmos conformacionales de cadenas sencillas (Mullis et al., 1986; Mullis, 1990; Saiki et al., 1985; 1988; Erlich et al., 1989).

Tabla 1. CLASIFICACION DE LOS MARCADORES GENETICOS

1. GLICOPROTEICOS

I) Eritrocitos	Antígenos de membrana (Grupos sanguíneos) Hemoglobinas (A, S, C etc) Enzimas intracitoplásmicas (G-6-PD, PGM, FAE)*
II) Leucocitos	Antígenos de membrana (Sistema HLA)
III) Eéricas	Proteínas (A β , Hp, Tf, Gc)** Alotipos de las Ig (Gm, Am, Km)

2. DNA

I) Nucleares	RFLP*** VNTR****
II) Mitocondriales	RFLP

*G-6-PD = glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; PGM = fosfoglucomutasa; FAE = fosfatasa ácida eritrocítica;
**A β = albúmina; Hp = haptoglobina; Tf = transferrina; Gc = componente de grupo específico Gc;
RFLP = fragmentos de restricción polimórficos; *VNTR = repeticiones nucleotídicas en tándem en número variable.

III. A. c. POLIMORFISMOS MOLECULARES

El estudio de los polimorfismos en la molécula del DNA está estrechamente ligado al estudio de las endonucleasas o enzimas de restricción, cuyos antecedentes surgen con los trabajos de Arber y Dussoix (Arber y Dussoix, 1962; Dussoix y Arber, 1962), quienes estudiaron la relación entre los bacteriófagos y la resistencia de algunas cepas de bacterias a su infección. Ellos propusieron un modelo de *restricción* y *modificación* para explicar este fenómeno (observado originalmente por S. Luria diez años antes), en donde una "enzima de *restricción*" reconoce una secuencia específica de bases dentro del DNA y corta sus dos cadenas, y por otra parte, una "enzima de *modificación*" reconoce la misma secuencia de bases y la *modifica*, por lo que deja de ser sustrato para la enzima de restricción. La primera enzima de restricción fue aislada por Meselson y Yuan en 1968, proveniente de *Escherichia coli* con requerimientos de ATP y S-adenosil metionina que produce fragmentos de DNA al azar. Dos años después, Smith y Wilcox (1970) aislaron y caracterizaron la enzima de *Haemophilus influenzae* que da fragmentos específicos y requiere de iones Mg^{++} . En el mismo año Kelly y Smith encontraron la secuencia de nucleótidos que reconoce esta última enzima, y Danna y Nathans (1971), Nathans y Smith (1975), y Berg (1981) la emplearon para cortar DNA de SV40. A partir de esa fecha se han aislado centenas de tipos diferentes de endonucleasas, tanto bacterianas como fúngicas (Roberts, 1976), de las que se encuentran disponibles más de cien en el mercado. Algunas enzimas tienen la característica de cortar, dejando extremos rasurados, y otras, extremos cebosivos. Las enzimas de restricción se han clasificado en tres tipos o clases: las de tipo I reconocen sitios específicos de DNA, pero realizan cortes al azar, lejanos a los lugares de reconocimiento; las de clase II reconocen y cortan el DNA dentro del sitio específico, por lo que son las más utilizadas, sólo requieren iones magnesio y reconocen secuencias de 4 a 8 pares de bases y, finalmente, las de tipo III, que tienen características intermedias (Cherfas, 1984).

Con el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, ha sido posible analizar alteraciones en el genoma que pueden producir alguna patología hereditaria (Antonarakis et al., 1985; Gusella, 1986; Chhab et al., 1987). Una de las formas más comúnmente utilizadas es el empleo de enzimas de restricción, que reconocen y cortan sitios específicos del DNA, produciendo fragmentos de longitud variable denominados RFLP ("restriction fragment length polymorphism"). El polimorfismo es debido a mutaciones, adiciones o deleciones nucleotídicas en la secuencia de bases. Se ha observado que muchas de las

mutaciones son puntuales y "silenciosas", esto es, no repercuten en la bioquímica y/o fisiología del organismo y pertenecen al grupo de polimorfismos más frecuentes que han servido para mapear los cromosomas (Cooper y Clayton, 1988; White y Lalouel, 1988).

Los métodos que permiten la detección de alteraciones en el DNA son el de Southern, el de PCR con sus diferentes opciones y la secuenciación nucleotídica. El método de Southern se basa en el corte con enzimas de restricción, la separación de los fragmentos por electroforesis en geles de agarosa, la transferencia a un papel especial (membranas de nitrocelulosa o nylon) y la hibridación con sondas marcadas para identificar el gen a investigar. Las sondas son obtenidas de genotecas de DNA ó de cDNA. El método de PCR se basa en la simplificación de un segmento de DNA entre 10^7 y 10^{10} veces, y la evidencia de la presencia o ausencia de un sitio de restricción con una enzima específica y electroforesis con bromuro de etidio para observarse con luz UV o tinción con plata y compararlo con "escaleras" de peso molecular conocido. La secuenciación de un fragmento de DNA puede llevarse a cabo clonando el fragmento en plásmidos específicos o directamente del amplificado por PCR (Wu, 1978).

Desde el punto de vista práctico, es recomendable emplear los RFLPs para los estudios detallados, debido a que la frecuencia de polimorfismos es mucho mayor en el DNA que en las proteínas, debido a que la variación en la secuencia de bases nucleotídicas entre individuos es de una por cada 100 a 200 pb (Ropers, 1987) y comprenden tanto los exones como los intrones, las zonas aleladas y las repetitivas, en comparación con los marcadores proteicos, que sólo son el producto de la traducción de los exones.

Otros tipos de RFLPs son los producidos por las secuencias de nucleótidos repetidos frecuentes en minisatélites, altamente polimórficos, a los que se ha denominado "huellas digitales de DNA" (Jeffreys et al., 1985) y los VNTRs que se han encontrado asociados a padecimientos como el retinoblastoma (Sohar et al., 1992). Los RFLPs se presentan al azar en el genoma, y se han utilizado para hacer mapas de ligamiento en cromosomas humanos y encontrar alelos ligados a padecimientos (Antonarakis et al., 1985; Gusella, 1986). Algunos autores afirman que se pueden determinar los componentes genéticos, incluso en patología multifactorial (White et al., 1985). Con relación a los mapas de restricción, se ha observado que el mapa de un autosome típico es, en promedio, 1.9 veces más grande en las mujeres que en los hombres, lo que indica que hay por lo menos dos veces más eventos de recombinación en los oocitos que en los espermatozoides (Fig 1). El efecto no es uniforme en todos los cromosomas: se ha observado un incremento de

polimorfismos y recombinación en los extremos de los mismos. Esta metodología ha permitido conocer mejor la constitución del genoma humano, analizar su segregación por familias, compararlo con otros genomas a lo largo del proceso evolutivo y abrir la posibilidad para detectar con certeza cualquier alteración genética tanto en pacientes como en individuos portadores (Donnis-Keller et al., 1987).

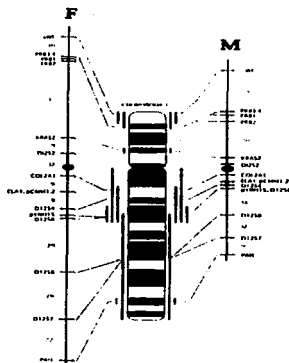


Fig 1. Representación esquemática del cromosoma 12 con los sitios de las sondas y la frecuencia de recombinación tanto en cromosomas femeninos (F) como masculinos (M) (White y Lalouel, 1988)

III. A. d. ESTUDIOS EN LA BIOMEDICINA

Los marcadores genéticos han tenido gran aplicación en la biomedicina. En un principio se utilizaron en las pruebas para transfusiones sanguíneas y en estudios de asociación con padecimientos, y posteriormente, en estudios antropológicos como la clasificación de los grupos humanos de acuerdo con la frecuencia de distintos marcadores. Actualmente se emplean en otras áreas del conocimiento, como la biología molecular, la genética molecular y la genética legal y forense (Tabla 2).

Tabla 2. MARCADORES GENETICOS EN LA BIOMEDICINA

AREA BIOLÓGICA	APLICACION EN
Genética general	Transfusiones sanguíneas Trasplante de órganos y tejidos Asociación y ligamiento de padecimientos hereditarios Establecimiento de riesgos relativos
Genética molecular	Mapa de cromosomas Detección de mutaciones Detección de no-disyunción materna o paterna Asesoramiento genético y diagnóstico prenatal
Genética de población	Selección y ventaja selectiva Migración Estudios antropológicos Microheterogeneidad Frecuencia de enfermedades Estudios de gemelos
Genética legal y forense	Estudios de paternidad Detección de criminales
Biología molecular	Estudios de evolución Origen unicéntrico o multicéntrico de mutaciones Rastreo de mutaciones en poblaciones

III. A. c. UTILIDAD DE LOS MARCADORES EN LA GENÉTICA DE POBLACION

Una importante aplicación de los marcadores genéticos ha sido la caracterización de poblaciones de acuerdo con la frecuencia de distintos polimorfismos. Esto es de notable interés, porque algunos investigadores clasificaron a los grupos humanos de acuerdo con el color de la piel y con algunos atributos subjetivos como el carácter, las costumbres, etc., lo que tuvo connotaciones racistas, no obstante que todos los seres humanos pertenecemos a la especie *Homo sapiens sapiens* (Stavrenhagen, 1992).

Actualmente, la mayoría de los investigadores acepta la definición del término "razas humanas", como: "poblaciones que difieren en la frecuencia relativa de algunos genes" (Dobzhansky, 1964), o como "grupos humanos entre los que el intercambio de genes ha estado restringido por algún tiempo, ya sea por cuestiones geográficas, religiosas, sociales o culturales" (Zavala y Lisler, 1979). En la Tabla 3 se presenta un ejemplo de frecuencias génicas de los sistemas ABO y Rh en diferentes grupos humanos.

Tabla 3. FRECUENCIAS GENICAS DEL SISTEMA ABO Y Rh EN SEIS GRUPOS HUMANOS

Alelos	FRECUENCIAS GENICAS					
	P	o	b	l	a	c
	Blanca	Asiática	Negra	Mestiza*	Costeña*	Indígena*
Sistema ABO						
A	.268	.171	.258	.130	.137	.034
B	.068	.144	.170	.049	.058	.013
O	.664	.684	.572	.821	.805	.953
Sistema Rh						
CDE	.006	.000	.002	.064	.045	.049
CDe	.398	.635	.122	.481	.486	.519
cDE	.123	.262	.094	.258	.261	.355
cDe	.048	.020	.436	.037	.062	.077
ode	.424	.083	.346	.159	.164	.000

¹ Felleisen y Lisler, 1994.

* Poblaciones mestizas.

El estudio de la frecuencia de los genes en las poblaciones se basa en la ley de Hardy-Weinberg. La ley prueba que, independientemente de qué tan raro sea el homocigoto para un gen, la proporción de heterocigotos es sorprendentemente elevada y que la frecuencia de los genes permanece inmutable a través del tiempo, siempre y cuando exista panmixia y los genes en cuestión no estén sometidos a la acción de fuerzas selectivas como la selección natural, mutación génica o deriva génica (Cavalli-Sforza y Bodnar, 1971).

Con las frecuencias génicas de los diferentes marcadores, es posible calcular la proporción de genes blancos, negros e indígenas en poblaciones mestizas como la nuestra. En la Tabla 4 se incluyen los valores correspondientes a estudios realizados en la población mexicana, y donde se citan los datos de dos distintos grupos de mestizos del Distrito Federal, estudiados por dos grupos de investigadores diferentes (ver Lisker et al., 1990).

Tabla 4. ESTIMACION DE LA MEZCLA TRIHIBRIDA DE ESTUDIOS PREVIOS MEXICANOS, ORDENADOS POR CANTIDAD DE ANCESTROS INDIGENAS*

Ciudad	Estado	n	Frecuencia génica		
			Negros	Indígenas	Blanco
Tlaxcala	Tlaxcala	138	.079	.762	.159
Saltillo (La Mata)	Coahuila	123	.152	.610	.238
Puebla	Puebla	393	.107	.563	.330
Ciudad de México		510	.029	.562	.409
Saltillo (Quemá)	Coahuila	104	.042	.556	.402
Panuco-Campeche		161	.217	.474	.309
El Carmen	Campeche	109	.284	.432	.284
Veracruz	Veracruz	148	.256	.394	.350
Saladero	Veracruz	119	.302	.386	.312
Tehuacan	Veracruz	109	.405	.307	.288
Ciudad de México		474	.014	.276	.708

* Lisker et al., 1990.

III. B. HEMOGLOBINAS

III. B. a. ESTRUCTURA Y FUNCION

Las hemoglobinas son un conjunto de proteínas complejas localizadas en el interior de los eritrocitos, cuya función principal es la de transportar el oxígeno a todas las células del organismo. Están constituidas por un grupo hemo (Protoporfina tipo IX y un átomo de hierro) que es constante en todas las hemoglobinas, y cuatro cadenas polipeptídicas: un par de la familia α , con 141 aminoácidos cada una y el otro par de la familia β , de 146 aminoácidos (Fig 2).



Fig 2. Esquema de la molécula de la hemoglobina mostrando los grupos Hemo dentro de las cadenas α y β .

La familia *alfa* está constituida por los genes *zeta* (ζ_2) y *alfa* (α_1 y α_2), localizados en el brazo corto del cromosoma 16, incluyendo varios pseudogenes (Fig 3). La familia *beta* que comprende los genes ϵ , $\zeta\gamma$, $\gamma\gamma$, δ y β (y el pseudogen beta localizado entre $\gamma\gamma$ y δ), se encuentra ubicada en el brazo corto del cromosoma 11, en una longitud aproximada de 60 Kb (Fig 3). Las diferencias entre las distintas hemoglobinas (normales y anormales) radica precisamente en los tipos de cadenas de globinas que las constituyen (Fig 4).

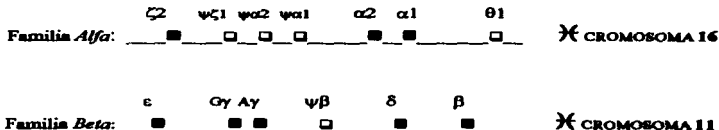


Fig. 3. Representación esquemática de las familias *alfa* y *beta* globínicas en los cromosomas correspondientes.

Las hemoglobinas normales pueden ser clasificadas de acuerdo con el período en el que se presentan durante el desarrollo del individuo en: **embrionarias** [Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$), Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) y Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$)], **fetal** ($\alpha_2 \gamma_2$) y del **adulto** [A ($\alpha_2 \beta_2$) y A2 ($\alpha_2 \delta_2$)]. Las globinas ζ y ϵ se sintetizan en el saco embrionario a partir del día 28 de gestación y permanecen hasta el final del primer trimestre de gestación; las globinas γ ($\zeta\gamma$ y $\gamma\gamma$) se sintetizan en el hígado, tienen su máxima expresión en el segundo trimestre del embarazo y decaen después del nacimiento del individuo, permaneciendo pequeñas concentraciones en el adulto, los genes α y β se expresan primero en hígado a partir del segundo trimestre de gestación y luego en médula ósea y permanecen durante la vida del individuo y el gen δ se expresa en médula ósea en bajas concentraciones poco después del nacimiento. En las figuras 4 y 5 se presenta un esquema de la formación de los distintos tipos de hemoglobina y la expresión de las diferentes cadenas globínicas en los distintos estadios de desarrollo humano.

⌘ CROMOSOMA 16

ζ_2 — ■
 $\psi\zeta_1$ — □
 $\psi\alpha_2$ — □
 $\psi\alpha_1$ — □
 α_2 — ■
 α_1 — ■
 θ_1 — □

HEMOGLOBINA

Gower I
 Portland
 Gower II
 Fetal
 A
 A 1

⌘ CROMOSOMA 11

■ — ϵ
 ■ — $\alpha\gamma$
 ■ — $\Delta\gamma$
 □ — $\psi\beta$
 ■ — δ
 ■ — β

Fig 4. Representación esquemática de la combinación de genes para formar las diferentes hemoglobinas.

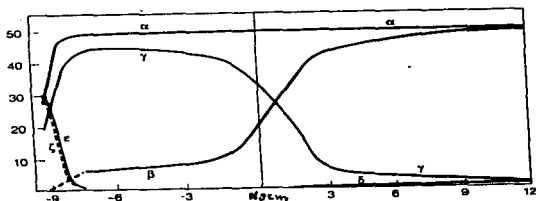


Fig 5. Los genes β -globínicos se expresan sucesivamente durante el desarrollo del individuo. La expresión ocurre en el sitio de eritropoyesis que corresponde al periodo de desarrollo, de la siguiente manera: el gen ϵ en el saco embrionario, los genes $\zeta\gamma$ y $\Delta\gamma$ en hígado fetal y los genes mayor (β) y menor (δ) en médula ósea del adulto. Nacm. (abscisas) = nacimiento.

III. B. b. REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES β -GLOBINICOS

El estudio de la expresión de la familia de genes β ha servido como un paradigma importante para entender la regulación de la transcripción, en tejidos específicos, durante el desarrollo del individuo. Se sabe que la familia de genes β -globínicos (α , α_2 , γ , δ y β) se expresan en el orden 5' \rightarrow 3' y requieren de elementos de control locales (*promotores* y *causentadores*) y distales (DCR o *elemento de control de locus*, LCR) (Dillon y Grosfeld, 1993).

Un *promotor* es la región inmediatamente anterior a cada sitio de inicio de la transcripción, el cual consiste de lugares de unión a factores que promueven la maquinaria básica de la transcripción del gen. El gen β -globina presenta un promotor típico constituido por una caja TATA en posición -30 (relativa al sitio Cap del mRNA), una caja CCAAT entre -70 y -90 y un motivo CACCC que se encuentra entre -95 y -120 (Dierks et al., 1983). Se ha demostrado que las mutaciones en los elementos TATA y CACCC reducen la expresión del gen β (Weatherall et al., 1989). Estos elementos también se encuentran en otros genes no eritroides. Se conocen varias proteínas que se unen a las regiones promotoras de este gen, importantes para ejercer la función. Estas son los factores de transcripción (TF) TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIIE, TFIIF y TFIIFH en la caja TATA; el factor de unión a la caja CCAAT (CBF), las proteínas CREB, Ets, LEF-1 y otras en la caja CCAAT.

Los *causentadores* se definieron en un principio como "fragmentos de DNA que pueden estimular en *cis* a un gen en el mismo plásmido, funcionan en ensayos transitorios y pueden ser creados por multimerización de sitios de unión a proteínas". Actualmente el término *causentador* se ha usado para cualquier fragmento de DNA que estimula la transcripción en casi cualquier ensayo. En los genes *beta*-globínicos se han descrito varios *causentadores*, como el segundo intrón del gen γ , y algunos cercanos al gen β , así como el segundo intrón y el tercer exón del gen β (Behringer et al., 1987; Antoniou et al., 1988). También se ha localizado un *causentador* 550-900 pb hacia 3' del gen β que incrementa aproximadamente diez veces la expresión del gen (Trudel y Constantini, 1987) y contiene sitios de unión a la proteína eritroide-específica Erif 1 (Wall et al., 1988). Se ha localizado otro *causentador* entre 400 y 1150 pb hacia 3' del sitio de poliadenilación de γ . Este sitio es sensible a DNase I, es tejido-específico y estimula 23 veces la transcripción del gen (Bodine y Ley, 1987). Ejemplo de proteínas que se unen a estos elementos son el

factor de transcripción Oct (OTF-1=PNFE-1), y los factores NF-E2, NF-E3, SP1, CDP, NF-E4.

El *elemento de control distal*, DCR o *elemento de control de locus*, LCR, fue identificado originalmente como una región de control hacia 5' de la familia de las β -globinas. Actualmente se sabe que también existen en otros genes como en el complejo mayor de histocompatibilidad, en el gen de la lisozima y en el gen CID2. Los LCRs son tejido-específicos, hipersensibles a DNasa I, no se unen a la cromatina en un ensayo de expresión transitorio ("transient expression assay") y son estables en el desarrollo. Un LCR puede ser definido por su función, como "elemento que confiere expresión en un transgen a nivel independiente de su sitio de integración en el genoma huésped (animal transgénico), pero dependiente del número de copias" (Grosveld et al., 1987; Engel, 1993).

El LCR de la familia de las β -globinas fue descubierto por Tuan y colaboradores (1985), quienes observaron cinco pequeños subdominios (cada uno de 300pb), distribuidos en cerca de 10 Kb localizado a 6, 11, 14.5 17.5 y 21 Kb antes del gen ϵ . El grupo de Grosveld (1987) propuso que se reconocieran sólo cuatro de ellos y actualmente se denominan HS-1, HS-2, HS-3 y HS-4. Se ha demostrado que el LCR β es un activador positivo dominante que puede actuar para formar complejos estables con cada uno de los genes de la familia β -globínica en los diferentes estadios del desarrollo humano, y también se ha postulado que "abre" la cromátide para dar inicio a la expresión de los genes (Evans et al., 1990).

El efecto de LCR en la transcripción involucra la interacción con proteínas nucleares específicas. Los estudios de "huellas digitales de proteínas" *in vitro* e *in vivo*, han permitido definir los sitios de interacción en los elementos centrales del LCR. De acuerdo con estos resultados, sólo tres motivos son constantes: GATA; AP1 y secuencias CACC(GGTG). La actividad, independiente de la posición de los elementos LCR, correlaciona mejor con la presencia de los motivos GATA y CACC, mientras que la actividad de *activador total* (al menos para HS-2), requiere del motivo AP-1. A los motivos GATA y AP-1 se unen los factores de transcripción GATA-1 y NF-E2 que son eritroide específicos, y c-Jun y c-Fos que no son tejido-específicos, mientras que los sitios CACC/GGTG son reconocidos por numerosas proteínas distribuidas ampliamente, incluyendo los factores Sp1 y "Tipo" Sp1. Las proteínas señaladas se unen a los tres motivos y son activadores transcripcionales reconocidos, involucrados en el control de la actividad promotora en células eritroides. Las propiedades únicas del LCR pueden reflejar

la yuxtaposición e interacción de factores conocidos más que la acción de un nuevo conjunto de reguladores génicos (Crossley y Orkin, 1993).

III. B. c. HEMOGLOBINAS ANORMALES

Las hemoglobinas anormales pueden ser debidas a alteraciones en el DNA, como deleciones, mutaciones de una o varias bases, o entrecruzamiento desigual de regiones específicas en la familia de genes que se traducen en pérdida de la expresión de los mismos o mal procesamiento del RNAm. Estas alteraciones pueden clasificarse de la siguiente manera:

- 1) Por expresión de un solo tipo de cadenas globínicas, como la hemoglobina Barts, que es un tetrámero de las cadenas γ (γ_4) y la hemoglobina H, que es un tetrámero de las cadenas β (β_4).
- 2) Por cambio de un aminoácido por otro en la estructura primaria de la molécula. Este es el tipo de alteración más frecuente, ya que se han descrito 643 tipos diferentes (McKusick, 1990). De acuerdo con la repercusión bioquímica y fisiológica, se pueden clasificar según el tipo de aminoácido sustituido y la posición que ocupa éste en la molécula en: f) que no haya cambio funcional ni bioquímico detectable porque no se altera la carga eléctrica de la molécula, H) que ocurra cambio en la carga eléctrica de la molécula y en su función, como por ejemplo la HbS y las hemoglobinas M, que mantienen al átomo de hierro en forma oxidada impidiendo el transporte parcial del oxígeno, y I) que el cambio origine inestabilidad en determinadas condiciones.
- 3) Otras, entre las que se encuentran la ausencia o disminución de la síntesis de las cadenas globínicas que producen desequilibrio en la relación de las cadenas α/β , produciendo alteraciones llamadas talasemias, y la modificación del cambio de HbF a HbA generando una persistencia hereditaria a la HbF.

De las más de 600 mutaciones en la molécula de la hemoglobina informadas en la literatura, tres se presentan en alta proporción en poblaciones humanas: S ($\beta^6 \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$), E ($\beta^{26} \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$) y C ($\beta^6 \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$). De ellas, los homocigotos de la hemoglobina S y los heterocigotos SC y S/ β talasemia cursan con anemia grave, en comparación con los

homocigotos de las mutaciones C y E, que cursan con anemia moderada. Por ello es de notable importancia el estudio de esta patología.

III. B. d. ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES

La anemia de células falciformes es un padecimiento autosómico recesivo, ocasionado por una mutación puntual (GTG \rightarrow GAG) del sexto codón de las cadenas beta globémicas. La primera información de esta alteración fue realizada por Herrick en 1910 al observar los eritrocitos en forma de hoz en un paciente negro con anemia grave. En 1949 Pauling, Itano, Singer y Wells demostraron que en los individuos portadores del padecimiento, la hemoglobina tiene una movilidad electroforética diferente a la normal (A) y la denominaron S (sickle). En el mismo año, Neel demostró que los pacientes con anemia grave y eritrocitos en forma de hoz eran homocigotos para un gen que produce una anomalía similar en ambos padres heterocigotos obligados; en el siguiente año, Harris demostró que la deformidad eritrocitaria es debida a la polimerización de la HbS en fibras elongadas. Las pruebas de la anomalía estructural fueron dadas por Ingram (1957), quien demostró que la hemoglobina S difiere de la A en el aminoácido valina, que sustituyó al glutámico en la sexta posición de las cadenas β . El cambio en la polaridad del aminoácido, da como resultado la unión normal del oxígeno en soluciones diluidas que en estado desoxigenado se polimeriza cuando la mutación está presente en estado homocigoto, produciendo fibras alargadas (Fig 6). La polimerización produce rigidez del glóbulo rojo (células en hoz) en lugar del eritrocito biconcavo y flexible, que le impide el libre flujo por los capilares. Esto da lugar a hemólisis crónicas y períodos vaso oclusivos, que pueden llevar a la necrosis tisular. Los pacientes tienen una grave anemia crónica, con valores entre 6 y 10 mg/dl de hemoglobina que generalmente es sobrellevada por los pacientes debido a procesos adaptativos que tienden a compensar el oxígeno periférico. Sin embargo, tienen otras complicaciones, como cálculos de bilirrubina, frecuentes dolores articulares y sobrecarga de hierro por transfusiones sanguíneas. Los órganos más afectados son el bazo, los huesos, los ojos, el corazón, los pulmones y los riñones. Generalmente en la niñez pierden el bazo, debido a infarto y resorción del mismo; esto tiene como consecuencia infecciones frecuentes que, en su conjunto, acortan la vida de los pacientes (Comings, 1972). La anemia de células falciformes fue el primer ejemplo de enfermedad en la que se describió su mecanismo molecular al demostrar que la mutación en el gen estructural causa un cambio en la secuencia de aminoácidos en la proteína resultante, lo que origina la anemia grave característica de la entidad.

Es de notable interés señalar que a pesar de que los homocigotos tienen una falla reproductiva por la patología antes descrita, los heterocigotos pasan generalmente como normales, y en aquellas parejas constituidas por heterocigotos, las dos terceras partes de los hijos, aparentemente sanos, son portadores. Esto es de gran importancia, pues es común la endogamia (y por lo tanto la consanguinidad) en poblaciones generalmente pequeñas y aisladas.

De los 72 millones de portadores (AS) calculados para 1992 en el mundo, principalmente en Africa y en aquellas regiones en donde ha habido inmigración de estos contingentes (Nagel y Ranney, 1990), una alta proporción se casan entre sí, generando un gran número de pacientes homocigotos. Este dato es motivo de estudios poblacionales con fines de asesoramiento genético y diagnóstico prenatal. Por otra parte, se ha observado que los portadores se encuentran en proporción mayor de lo esperado (20 por ciento en algunas regiones africanas) debido a que resisten mejor la infección por *Plasmodium falciparum* que es endémico en algunas zonas. Varios estudios (Luzzato et al., 1970; Friedman, 1978; Friedman et al., 1979; Nagel y Roth, 1989) han mostrado que la hemoglobina AS se polimeriza cuando el *Plasmodium* infecta los eritrocitos, lo que conduce a la muerte del parásito en tales células y esto trae como consecuencia una selección natural de los individuos heterocigotos en regiones endémicas (Allison, 1954). El descubrimiento de esta hemoglobinopatía ha sido importante para mostrar uno de los postulados de la evolución darwiniana, en el sentido de que una mutación puede ser beneficiosa y perjudicial a la vez, dependiendo de las circunstancias en las que se presente.

Como se mencionó en un principio, las mutaciones hemoglobínicas se identificaron originalmente por su diferente movilidad electroforética, y posteriormente, por la digestión e identificación de los aminoácidos constituyentes y por el cambio del punto isoeléctrico. Actualmente los métodos de biología molecular han permitido clonar y analizar a las alteraciones en los genes por medio del mapeo con enzimas de restricción y/o secuenciación, o por amplificación con PCR y sondas alelo-específicas o polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (Saiiki et al., 1985, 1988; Wu et al., 1989; Hatcher et al., 1992). En los siguientes apartados se analizarán brevemente estos puntos haciendo énfasis en el diagnóstico de estas alteraciones.



Fig 6. Micrografía de eritrocitos en forma de hoz por anemia de células falciformes y formación de cadenas de eritrocitos (Comings, 1972).

III. B. c. HAPLOTIPOS DE DNA

Los haplotipos son definidos como los "loci ligados en un mismo cromosoma" y por consiguiente, al referirnos a los polimorfismos de DNA evidenciados con enzimas de restricción, hablamos de los patrones [presencia (+) o ausencia (-)] de varios sitios polimórficos a lo largo de una familia de genes, como los de las beta globinas, en un mismo cromosoma. Estos haplotipos fueron empleados por primera vez por Antonarakis y cols. (1982) para describir las asociaciones con los defectos moleculares en la β -talasemia. Más tarde, Pagnier y cols. (1984) los emplearon para investigar el origen poblacional unicéntrico o multicéntrico del gen β^0 corroborados posteriormente por el grupo de Chebloune (1988). Además, han servido para estudiar la influencia de genes epistáticos (efectos de otros genes en la expresión fenotípica de un gen anormal, por ejemplo, los genes responsables de la síntesis de HbF, que pueden modificar algunos rasgos clínicos de la anemia de células falciformes) (Nagel y Ranney, 1990). En el caso de la familia β -globínica, la información de los haplotipos ha sido ampliamente utilizada en el "rastreo" del flujo génico de una mutación particular (Antonarakis et al., 1984; Hattori et al., 1986; Nagel y Ranney, 1990; Dimovski et al., 1991; Öner et al., 1992; Zago et al.,

1992; Flint et al., 1993) y en el origen y evolución de los grupos humanos (Wainscoat et al., 1986; Long et al., 1990). Además, el estudio de la segregación familiar de los haplotipos, es de utilidad en el asesoramiento genético y en el diagnóstico prenatal.

Dado que una mutación del gen beta globina está ligada necesariamente a un haplotipo particular dentro de los 60 Kb de DNA de la familia de genes, cada nueva mutación en el gen beta, tiene la oportunidad de estar asociada con un haplotipo diferente. Sin embargo, deben tomarse en cuenta tres consideraciones: 1) la mutación puede haber aparecido más de una ocasión, pero desaparecido por mecanismos tales como deriva génica o presión selectiva negativa, 2) la mutación pudo haber ocurrido más de una vez pero cada evento en el mismo haplotipo. (La posibilidad de estos dos casos depende de la tasa de mutación y de la frecuencia de los haplotipos ligados a la mutación en la población bajo estudio), y 3) la presencia de sitios de elevada recombinación dentro de la familia de genes (Nagel y Ranney, 1990). Este dato es importante porque existe un sitio de alta recombinación hacia 5' del gen β (Chakravarti et al., 1984), por lo que puede esperarse una gran divergencia en la porción 5' del haplotipo.

El primer informe de ligamiento entre un sitio polimórfico y el gen β^S fue hecho por Kan y Dozy (1978), quienes encontraron que el 60 por ciento de los genes β^S de pacientes con anemia de células falciformes y de origen africano estaba asociado al fragmento de 13 Kb y el 40 % restante se encontraba ligado al fragmento de 7.6 Kb. Estos hallazgos sugirieron que la mutación se realizó en dos eventos diferentes, y posteriormente se comprobó que estaban localizados en dos regiones distintas de Africa (Kan y Dozy, 1980). Por estudios más amplios, Mears y cols. (1981) comprobaron que no eran dos sino tres regiones separadas en Africa y más tarde, el grupo de Pagnier (1984), empleando 11 sitios de restricción en la familia β -globínica, aclaró definitivamente que la mutación surgió en tres regiones específicas y diferentes en Africa a las que llamó Senegal, Benin y CAR (Central Africa Republic), ahora llamada Bantú (Fig. 7). Poco tiempo después se informó de un nuevo haplotipo característico de Arabia e India denominado de la misma manera que su origen: Arabia-India (Wainscoat et al., 1985) y un haplotipo regional de un área estrecha de Africa habitada por el grupo Eton, llamado "Camerón" (Lapoumeroulie et al., 1989, 1992). De esta manera, se han caracterizado cinco haplotipos diferentes relacionados con el gen β^S , sugiriendo que el evento mutacional ocurrió igual número de veces en regiones circunscritas alrededor de las cuales declina su frecuencia. Se han observado variantes en una proporción no mayor del 10 por ciento, debido principalmente a la recombinación o a entrecruzamientos en el "punto caliente" localizado entre los genes $\psi\beta$ y β (Chakravarti et

al., 1984). Por otra parte, aunque no se han encontrado haplotipos diferentes en otras poblaciones caucásicas, asiáticas e indígenas americanas (Nagel y Fleming, 1992), no se descarta la posibilidad de nuevos haplotipos primitivos en algunas regiones de América, dada la alta incidencia de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* en algunas latitudes (Bruce-Chwatt, 1980).

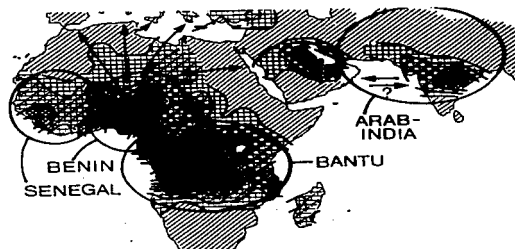


Fig 7. Localización geográfica de los haplotipos β -globínicos típicos (Nagel y Fleming, 1992).

Con respecto a los genes β^A , también se han caracterizado haplotipos típicos en poblaciones caucásicas, africanas y asiáticas (Tabla 5) los que han sido tomados en cuenta por algunos autores para hacer distancias génicas entre diferentes poblaciones (Wainscoat et al., 1986, Long et al., 1990).

Los haplotipos encontrados en β^C (6 GAG \rightarrow AAG) están ligados al Benin (Boehm et al., 1985, Labie y Nagel, 1987) y variantes de Bantú (Trabuchet et al., 1991), y los β -talasemia a los Bantú, en su mayoría (Antonarakis et al., 1984).

Tabla 5. HAPLOTIPOS CARACTERÍSTICOS EN CROMOSOMAS β^A , β^C , β^{Td} Y β^B EN DIFERENTES POBLACIONES

POBLACION	HAPLOTIPO										GEN
	5'	α	α_1	α_2	$\psi\beta$	δ	β	3'			
	Hc	Hd	Hd	Hc Hc		A	Hp	B*			
Africanas:											
BANTU	-	+	-	- -		+	+	+	β^B		
BENIN	-	-	-	- +		+	-	+	β^B		
SENEGAL	-	+	-	++		+	+	+	β^B		
CAMERUN	-	+	+	- +		+	+	-	β^B		
ARABIA-INDIA	+	+	-	++		+	+	-	β^B		
Caucásica	+	-	-	- -					β^A		
Asiática	-	+	-	++					β^A		
Africana	-	-	-	- +					β^A		
Africana	-	+	-	- +		+	-	+	β^C		
Caucásica	-	-	-	- -		+	-	+	β^{Td}		

* Hc - Hinc II; Hd - Hinc III; A - Avc II; Hp - Hpa I; B - Bam HI

III. B. f. PREVENCIÓN DE HEMOGLOBINOPATÍAS

El primer informe sobre el análisis de la hemoglobina con propósitos de diagnóstico prenatal para la prevención de hemoglobinopatías, se realizó en 1971 por Hollenberg y cols., quienes midieron la síntesis de hemoglobinas A en muestras de sangre periférica de fetos humanos de 9 a 18 semanas de gestación, por cromatografía de intercambio iónico, electroforesis y análisis triptico de péptidos. Más tarde el grupo de Kan (1972) detectó los diferentes tipos de cadenas globínicas sintetizadas en el primer trimestre de gestación, en fetos obtenidos por histerectomía. El método que emplearon fue la incubación de reticulocitos con leucina radioactiva, cromatografía en presencia de urea EM y electroforesis después de la digestión con tripsina, distinguiendo de esta manera la hemoglobina A de la S. Hobbins y Maloney (1974) desarrollaron un método para aspirar sangre fetal de un vaso sanguíneo en la placa coriónica placentaria bajo visualización directa, en mujeres con 15-20 semanas de gestación, método que se aprovechó para detectar algunas alteraciones hemoglobínicas como alfa talasemia (Taylor et al., 1974). En 1976, Kan y su grupo cultivaron fibroblastos de fluido amniótico y cuantificaron el número de genes α por hibridación con DNA radioactivo complementario a RNAm correspondiente, y confirmaron el diagnóstico de alfa talasemia en muestra de cordón umbilical. En el mismo año, Alter y cols. (1976) diagnosticaron 15 casos de hemoglobinopatías (11 talasemias y 4 HbS), usando fotoscopia en siete casos y aspiración placentaria en ocho. En estas muestras analizaron la síntesis de globinas incubando reticulocitos con ^3H -Leu y separando las cadenas por cromatografía. De esta manera se analizaron centenares de casos en el mundo con técnicas de alto riesgo en el manejo obstétrico y métodos laboriosos y tardíos que ponían en peligro la vida de la madre y del producto (revisado por Alter, 1990).

La asociación original entre la mutación β^S y un polimorfismo de DNA fue realizada por Kan y Dozy (1978a), con la enzima Hpa I, empleando el método de Southern. En lugar del fragmento normal de 7.6 Kb obtenido de DNA de células normales, se encontró un fragmento de 13.0 Kb en individuos de origen africano. El fragmento de 13 Kb estuvo asociado frecuentemente con β^S y no se encontró en caucásicos ni asiáticos, por lo que sugirieron por primera vez que este ligamiento podía emplearse en el diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes y en estudios antropológicos. En 1979, Jeffreys, simultáneamente con Tuan y cols, mapearon los genes α^G y α^Y -globínicos y encontraron dos sitios polimórficos con la enzima Hind III (7.8 y 7.1 Kb en el primero y 3.4 y 2.7 en el segundo). Estos sitios fueron aplicados en el diagnóstico prenatal de la β -talasemia (Little

et al., 1980) y de la hemoglobina S, que combinado con Hpa I (Phillips et al., 1980) dieron una mayor precisión al diagnóstico prenatal. También se localizó otro sitio polimórfico con la enzima Bam HI en el extremo 3' del gen beta (Kan y Dozy, 1980), obteniendo bandas de 1.8 y 9.3 Kb y una variante de 22.0 Kb. La banda de 9.3 Kb se encontró asociada en el 100 por ciento de 42 cromosomas estudiados con talasemia β^0 .

Otros sitios polimórficos detectados con enzimas de restricción, fueron: con Asu I que reconoce un sitio en IVB-2 β produciendo fragmentos de 0.8 y 1.0 Kb asociados en un 38 por ciento a cromosomas con β -talasemia (Driscoll et al., 1981) y con Dde I en una región localizada en el sexto codón del gen β -globina. Con esta última enzima se obtienen fragmentos de 175 y 201 pb en el gen normal y de 376 pb en presencia de la mutación β^S (Ceever, 1981). En 1982 tres grupos de investigadores (Chang y Kan, Orkin et al. y Wilson et al.), informaron que Mst II distingue entre el alelo normal y el β^S , produciendo fragmentos de 1.14 Kb en el primer caso y de 1.34 Kb en el segundo.

Por otra parte, en 1981 se informaron diferentes alteraciones en la secuencia del gen β en pacientes con β -talasemia (cambio de G \rightarrow A en la posición 21 hacia 5' del primer intrón, cambio en el sitio de corte y unión del primer intrón, cambio C \rightarrow T en el codón 39 y cambio en el sitio de corte y unión en el segundo intrón y delección de nucleótidos en el primer intrón), no detectadas por enzimas de restricción (Baird et al., Busslinger et al., Spritz et al., Westway y Williamson, 1981 y Orkin et al., 1982b).

Williamson (1981) propuso determinar el polimorfismo de las enzimas de restricción para el diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías, en células de vellosidades coriales que pueden obtenerse entre la 8ª y 14ª semana de gestación, para evitar los métodos invasivos directos al feto y riesgo a la madre. El método ha sido aceptado y es empleado para tales propósitos (Saiki et al., 1985; Kogan et al., 1987). Actualmente esta determinación se lleva a cabo en forma rápida y segura, amplificando un fragmento de DNA con el método de PCR (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988; Hatcher et al., 1992), y analizando la presencia o ausencia del sitio de corte con Mst II ó Dde I por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989), con nitrato de plata (Merrill et al., 1981) o con sondas alelo específicas radioactivas (Conner et al., 1983) o no radioactivas (Saiki et al., 1988).

III. B. g. TERAPIA GENICA

El conocimiento de las mutaciones a nivel molecular no sólo es necesario para la prevención de los padecimientos de índole genética, sino que constituye un avance significativo para el desarrollo de medidas terapéuticas mucho más adecuadas. Este campo conforma lo que se conoce como terapia génica.

El término terapia génica fue acuñado por Szybalka y Szybalki en 1962, y puede definirse como el tratamiento de padecimientos hereditarios por el suministro del producto del gen (como el de la diabetes mellitus o el de la hemofilia), por inserción o modificación de genes en forma transitoria (como la adición de mRNA) o definitiva (genes integrados al genoma) lo que involucra principios farmacoterapéuticos y genéticos bien estudiados (Wolff y Lederberg, 1994).

La terapia génica tiene sus fundamentos en varias investigaciones. En primer término, está el trabajo de Avery, MacLeod y McCarty (1944) quienes señalaron la posibilidad de inducir cambios específicos en organismos superiores modificando las características hereditarias. Más tarde, Zinder y Lederberg (1956) indicaron que el genoma viral puede ser una parte permanente en el genoma de bacterias, y de animales (Lederberg, 1956). Tatum (1966) mencionó que los virus pueden ser utilizados para transducir genes y predijo que podrían emplearse en la terapia génica. También anticipó que esta terapia puede ser indirecta o *ex vivo*, esto es, en células tomadas del paciente, tratadas y regresadas al mismo. En 1969 Sinsheimer especuló sobre los "cambios genéticos asignados" como terapia génica y Aposthian (1970) propuso emplear pseudovirus derivados de poliovirus viral de ratón en la terapia génica; este último autor mencionó que este tipo de terapia era surgida de la tradición farmacéutica, la cual, si se considera el propósito de un medicamento como el de restablecer la función normal de algunos procesos particulares del organismo, entonces el DNA podría ser considerado como "el último medicamento".

La aproximación de terapia génica que involucra la adición de genes o su modificación, es conceptualmente similar a la terapia de reemplazamiento de proteínas tales como la insulina o el factor VIII de la coagulación. La terapia transitoria es similar a la administración terapéutica de proteínas, y la terapia no transitoria o definitiva, es la curación del padecimiento por el funcionamiento de genes normales.

La terapia génica ha avanzado notablemente con las tecnologías del DNA recombinante.

Los métodos para transferir genes foráneos a células de mamíferos pueden ser clasificadas en cuatro grandes grupos: a) introducción directa del DNA clonado (Capecci, 1980; Zimmermann, 1982; Wu et al, 1981), b) uso de vectores virales (Mulligan, 1982; Rosenfeld et al., 1991), c) encapsulación con sistema de acarreador (Straubinger y Papadopoulos 1983; Steward et al., 1992) y d) uso de facilitadores tales como el fosfato de calcio (Graham y Van der Eb, 1973) o DEAE-dextran (Mc Cutchan y Pagano, 1968).

En relación con los padecimientos hematológicos, se han desarrollado métodos para el estudio de mutagénesis dirigidas en células "progenitoras" (stem cell), que pueden ser cultivadas y permanecen suficientemente no diferenciadas para colonizar los tejidos, incluyendo líneas germinales de animales de laboratorio, principalmente de ratones (Gosler et al., 1986; Robertson et al., 1986). Además, las mutaciones han sido introducidas por recombinación homóloga en procesos que resulten en el reemplazamiento de genes blanco (Hooper et al., 1987; Kushn et al., 1987). Una vez hecho el modelo del padecimiento humano en animales transgénicos (específicamente en el caso de las alteraciones en las globinas), se han empleado los elementos moduladores tales como los promotores, aumentadores y LCRs (como se vió en el capítulo III. B. b.), que permiten expresar el gen o genes transferidos en forma adecuada y exclusiva, esto es, los transcritos se expresarán sólo en los tejidos en donde se requiere su función fisiológica, en este caso en médula ósea para sintetizar las globinas necesarias.

La estructura y organización de elementos reguladores en eucariotes han mostrado ser flexibles en su combinación, y esto, aunado al conocimiento detallado de los procesos postranscripcionales de la expresión génica (traducción, estabilidad del mRNA y procesamiento del poli-A) (Brewer, 1994), permitirán realizar protocolos adecuados de terapia definitiva.

Actualmente, los avances biotecnológicos encaminados a la terapia génica han permitido aplicarlos en algunos padecimientos humanos (como ejemplo, el tratamiento de fibrosis quística con la proteína en aerosol o la adición de adenosin-desaminasa en deficientes de esta enzima), y a la fecha se han aprobado ya 50 protocolos de investigación en el hombre (Madrigal, 1994), por lo que el tratamiento de algunos padecimientos por este método es ya una realidad y no esta lejano el día en que se pueda lograr la curación de muchos padecimientos hereditarios.

IV. OBJETIVOS

- A) Analizar la frecuencia de sitios de restricción polimórficos en la familia de genes β -globínicos, en pacientes con β^S y sus familiares en primer grado, originarios del estado de Veracruz, y comparar los hallazgos con los encontrados en un grupo de individuos normales.**
- B) Estudiar la segregación de los haplotipos y otorgar asesoramiento genético a los pacientes y a sus familiares.**
- C) Establecer el origen de la migración africana como componente genético en nuestra población, particularmente de la costa Este del país.**
- D) Contribuir a la caracterización genética de la población mexicana.**

V. HIPOTESIS

- A) La frecuencia de haplotipos africanos ligados al gen β^S es significativamente mayor en pacientes con hemoglobin S que la encontrada en individuos de la población normal.**
- B) El estudio de la segregación de los haplotipos, permite el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal en familias que lo requieran.**
- C) La mayor contribución de la migración africana a la población del Golfo de México es de origen Bantú.**

VI. MATERIAL Y METODOS

VI. A. POBLACION ESTUDIADA

Se estudiaron 15 pacientes con anemia de células falciformes y a sus familiares en primer grado, pertenecientes a 13 familias nucleares (paciente, padres y hermanos). De acuerdo con las características clínicas y hematológicas, 13 pacientes fueron homocigotos SS y dos heterocigotos: uno SC y otro S/ β Tal⁺; 35 heterocigotos AS (23 padres y 12 hermanas), un padre A/ β Tal⁺ y 3 hermanos normales, originarios del Estado de Veracruz. Además, se estudiaron 17 estudiantes voluntarios, sanos.

VI. B. METODOLOGIA

Se determinó el tipo de hemoglobina por electroforesis en gel de almidón en amortiguador de tris-barbital pH 8.6 (T-B) (Comings, 1972), de la siguiente manera: se lavaron 0.5 ml de sangre total con solución salina por tres veces y se extrajeron los estrones con 50 μ l de CCl₄. Las muestras de hemoglobina se absorbieron en cuadros de papel filtro 3MM de 0.5 x 1 cm y se colocaron a un tercio de distancia de gels de almidón de 10x17x1 cm preparados con amortiguador T-B 1X. La electroforesis se corrió a 25 mA durante 6 hs a temperatura ambiente, en presencia de estándares. El amortiguador del cátodo se diluyó 1:7 y el del ánodo 1:5. (Fig 7).

Los plásmidos pHP que lleva el fragmento genómico de 4.4 Kb incluyendo al gen de la β -globina y JW151 que posee el fragmento de cDNA de 1.1 Kb del gen de la γ -globina, fueron donados amablemente por los Drs. Fernando Montiel de la Facultad de Química, UNAM y Haigh H. Kazazian Jr. de la Facultad de Medicina de la Universidad John Hopkins, Baltimore MD, EUA, respectivamente. Se transformaron bacterias competentes (*Escherichia coli* HB 101) para multiplicarlas y cosecharlas por mini preparaciones y mini preparaciones (Sambrook et al 1989). Se caracterizaron los plásmidos con Bam HI, Eco RI, Hind III, Pst I, Taq I y combinaciones, como se observa en la Figuras 8, 9A, 9 y 9A, obteniendo los fragmentos esperados. Se extrajeron los fragmentos de interés con "Gene clean" (Gibco BRL) y se marcaron con ³²P por el método de "random primer" (Gibco BRL) empleando un promedio de 1.5 x 10⁶ cpm/ml de mezcla de hibridación.

Los fragmentos de Hind III en los genes $\zeta\gamma$ -y $\lambda\gamma$ -globina se identificaron con cDNA de 1.1 Kb de JW 151, y los restantes del gen beta se identificaron con DNA genómico de 0.92, 1.65 Y 2.28 Kb de pH β , marcado con ^{32}P (Tabla 6).

El DNA se extrajo por el método de Poncz y cols. (1982), modificado de la siguiente manera: se separaron los glóbulos blancos de 10 ml de sangre mezclada con 50 μl de EDTA 0.5M. El paquete se lavó con solución de lisis de glóbulos rojos (Tris pH 8.0, 10 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 10 mM) y se incubó con 5 ml de solución de lisis de glóbulos blancos (Tris pH 7.6, 10 mM, EDTA pH 8.0, 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0.2 % y proteinasa K, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37°C, durante 16 hs con agitación constante a 200 rpm. A continuación se extrajo el DNA con fenol equilibrado (Tris 0.1M, EDTA 0.005M pH 8.0), fenol:cloroformo:isomilico (25:24:1) y finalmente con cloroformo: isomilico (24:1).

Se tomaron alícuotas de 15 μg de DNA y se cortaron con cada una de las enzimas de restricción, empleándose las siguientes concentraciones por μg de DNA (de acuerdo con ensayos previos): Ava II (New England BioLabs) 2U; Bam HI (Enzybiot) 6U; Hind III (New England BioLabs) 5U; Hpa I (Stratagene) 3U y (Sigma) 5U. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1.2% para Ava II, 1.0% para Hind III y 0.8% para Hpa I y Bam HI), 25 volts, 16-18 hs, con marcadores de PM (λ /Hind III) en los extremos. Se tomó una fotografía del gel (con luz UV, filtro naranja, una regla transparente a un costado y con película Kodak 667). Los gels se trataron dos veces con HCl 0.25 N 10 min y dos con NaOH 0.5M/NaCl 1.5M 20 min, y se transfirieron a membranas de nylon (Hybond N⁺, Amersham) con NaOH 0.4N por medio de vacío (Vacuo Gene, Pharmacia Fine Chemical) a 50 M/bar por 1 hora. Las membranas se enjuagaron con SSPE 5X, se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron 5 min en luz UV.

Los filtros se prehibridizaron 3-16 hs a 42°C con una mezcla de formamida 50%, SSPE 5X, Denhart 5X, SDS 0.5% y esperma de salmón sonicado 20 mg/ml. Las membranas se hibridizaron en la mezcla nueva con la sonda diluida a 1-2 $\times 10^6$ dpm/ml por 48 hs. Las membranas se lavaron a 54°C para las sondas β y a 60°C para la γ con SSPE 2X + SDS 0.1%, 10 min SSPE 1X + SDS 0.1 % 15 min, SSPE 0.1X + SDS 0.1 % 10 min y un último lavado con SSPE 2X + TA. Las membranas se envolvieron con "ega-pack" y se expusieron a placas sensibles a rayos X (O-MAT AR) con marcadores fluorescentes, en un cassette con placa intensificadora, a -70°C durante 3-7 días (Figuras 10 -11).

Los fragmentos 5' y 3' del gen $\psi\beta$ se amplificaron por el método de PCR de acuerdo con Sutton y cols. (1989), empleando un aparato termociclador Perkin Elmer 9600, y se cortaron con Hinc II (1 U/ μ l de amplificado). Los sitios de corte se identificaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio y marcadores de 1 Kb (Fig 12 y Tabla 6).

Los haplotipos se ordenaron de acuerdo con la presencia (+) ó ausencia (-) de las bandas según la Tabla 6 (Pagnier et al., 1984).

Tabla 6. LOCALIZACION DE LOS SITIOS POLIMORFICOS EN LOS GENES ESTUDIADOS, Y FRAGMENTOS OBTENIDOS POR LOS METODOS DE SOUTHERN Y PCR



Plásmido

◀ JW151 ▶

◀ pHP ▶

ENZIMA	METODO DE SOUTHERN (Kb)		
	γ^G	γ^A	β
Hind III (Hd) (-)	8.2	3.2	-
(+)	7.5, 6.8	2.6	-
Ava II (A) (-)	-	-	2.2
(+)	-	-	2.0
Hpa I (Hp) (-)	-	-	13.0
(+)	-	-	7.0, 7.6
Bam HI (B) (-)	-	-	22.0
(+)	-	-	9.3

METODO DE PCR (pb)

Primer	Frag. amplif. Hinc II (Hc)	
	(-)	(+)
$\psi\beta$ GAACAGAAAGTTGAGATAGAGA ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	701	361, 340
3' $\psi\beta$ TCTGCATTGACTCTGTTAGC GGACCCAACTGATATAACTA	592	297, 295

VI. RESULTADOS

La electrofóresis en geles de almidón con amortiguador de tris-barbital pH 8.6, permitió distinguir la hemoglobina normal (A) de la S y de la C. Como se observa en la figura 7, la hemoglobina A tiene un corrimiento más rápido que la S

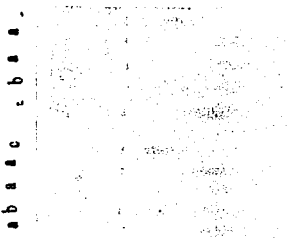


Fig. 8. Electrofóresis de hemoglobinas: a) normal AA, b) heterocigota AS y c) anormal SS.

El mapa de restricción del plásmido pHB se encuentra en la figura 9 y su caracterización en la 9a. Como se observa, el plásmido cortado con las diferentes enzimas de restricción presentó las bandas esperadas, que se corroboraron con los marcadores de peso molecular conocido. Como marcadores se emplearon los siguientes plásmidos: pC 406 cortado con Bam HI que produce una banda de 1 Kb, pUC19 cortado con Bgl I y Eco RI produce bandas de 1417 y 1269 pb, y pBR 322 cortado con Bgl I que da bandas de 2319, 1810 y 234 pb. Las bandas esperadas del plásmido pHB, por ejemplo, cortado con Pst I son de 4.4 y 4.36 Kb, o con Bam HI son: 3.6, 1.85, 1.62, 0.77, 0.70 y 0.10 Kb.

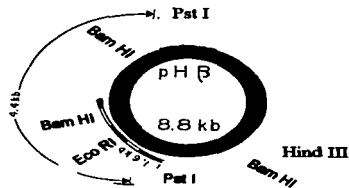


Figura 9. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pHB

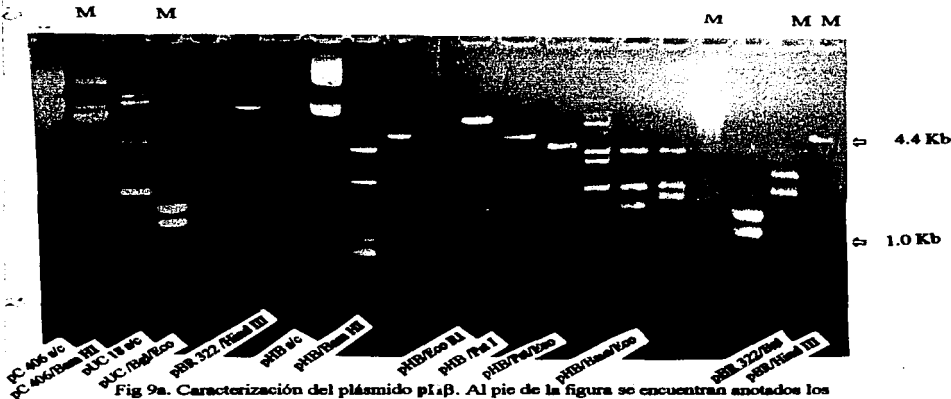


Fig 9a. Caracterización del plásmido pHB. Al pie de la figura se encuentran anotados los plásmidos cortados con las diferentes enzimas de restricción empleados como marcadores de peso molecular y las bandas del plásmido obtenidas con las distintas restricciones.

A continuación se presenta el mapa de los fragmentos del plásmido pHB usados como sondas: f) con Bam HI/Eco RI: 0.92 Kb, M) con Bam HI/Pst I: 1.67 Kb y III) con Hpa I/Pst I: 2.29 Kb ii)



Gen de la β -globulina humana clonada en pBR 322 y fragmentos utilizados como sondas

La figura 10 muestra el mapa de restricción del plásmido JW 151 y la figura 10a muestra su caracterización. Como se observa, los fragmentos obtenidos del plásmido cortado con diferentes enzimas de restricción, por ejemplo, con la Taq I (2.3, 1.1, 0.74 y 0.47 Kb), son los esperados. También se presenta la forma en que se recuperó la banda de 1.1 Kb que contiene el gen de la γ -globina que se empleó como sonda.

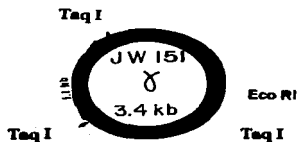


Figura 10. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO JW 151

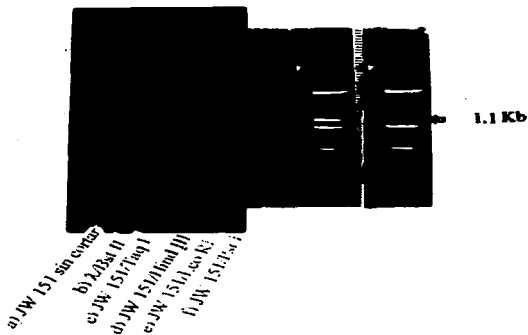


Figura 10a. Caracterización del plásmido JW 151. Al pie de la figura se anotan las enzimas empleadas para la caracterización.

En la figura 11 se presenta el resultado de la electroforesis de las muestras de DNA cortadas con Hind III, flanqueadas por los marcadores de peso molecular (λ /Hind III en Kb) y en la 11a se observa la autorradiografía de Southern mostrando el polimorfismo de los sitios Hind III ligados a los genes $G\gamma$ y $A\gamma$. Como se observa, las bandas de 8.4, 7.8 y 6.8 Kb corresponden al polimorfismo del gen $G\gamma$ y las bandas de 3.3 y 2.6 Kb al gen $A\gamma$, como se señala por las flechas.

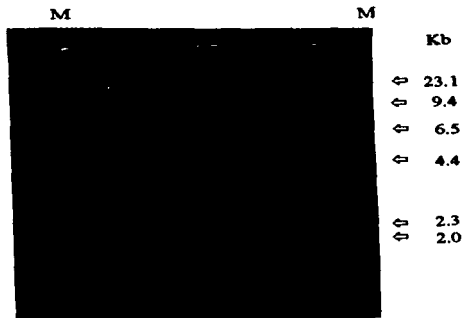


Fig. 11. Ejemplo de electroforesis de las muestras de DNA cortadas con Hind III, flanqueadas por los marcadores de peso molecular (λ /Hind III en Kb)

Muestras de pacientes y familiares

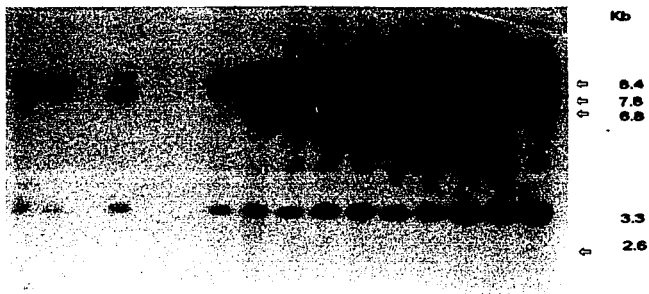


Fig 11a. Autorradiografía de Southern mostrando el polimorfismo de los sitios Hinf III ligados a los genes $G\gamma$ y $A\gamma$.

De la misma manera, en la figuras 12, 13 y 14 se presentan las autorradiografías de Southern con los polimorfismos de los sitios *Ava* II, *Bam* HI y *Hpa* I ligados al gen β . En ellas se observan los fragmentos de 2.2 y 2.0 Kb obtenidos de *Ava* II, los fragmentos de 22.0 y 9.3 Kb obtenidos de *Bam* HI y los fragmentos de 13.0, 7.6 y 7.0 Kb correspondientes a los de *Hpa* I.

Muestras de pacientes y familiares

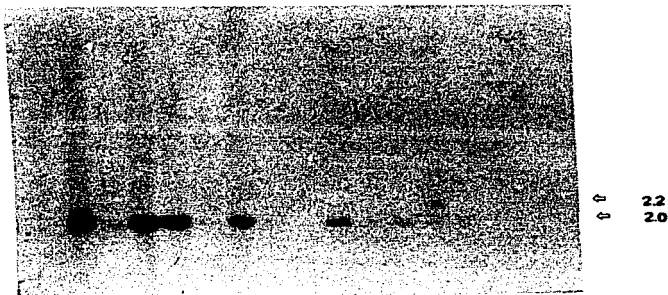


Fig 12. Autorradiografía de Southern con el polimorfismo de los sitios *Ava* II ligados al gen β .

Muestras de pacientes y familiares

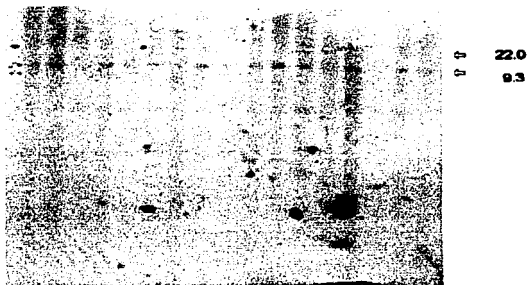


Fig 13. Autorradiografía de Southern con el polimorfismo de los sitios Bam HI ligados al gen β .

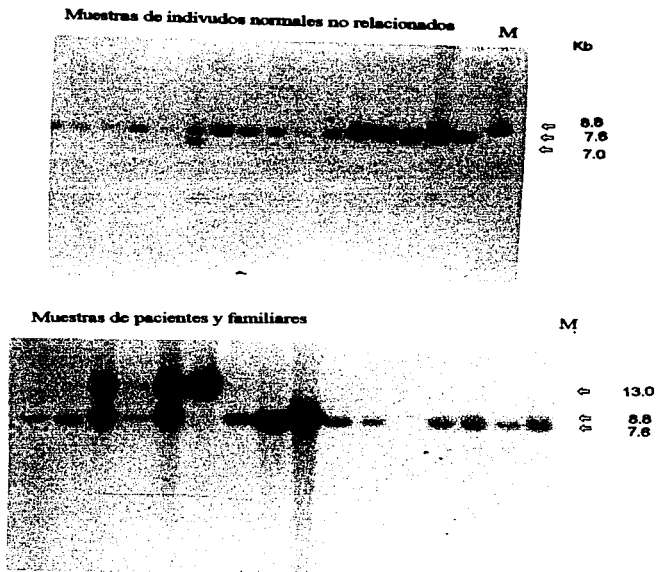


Fig 14. Autorradiografía de Southern mostrando el polimorfismo de los sitios Hpa I, ligados al gen β . M = marcador de 8.8 Kb (pHB/Hind III)

En la figura 15 se presentan los resultados de la amplificación por PCR de los sitios 5' y 3' del gen pseudobeta globina, con las bandas esperadas. Las muestras se incubaron con la enzima Hinc II que al no producir ningún corte, permanecieron del mismo tamaño.

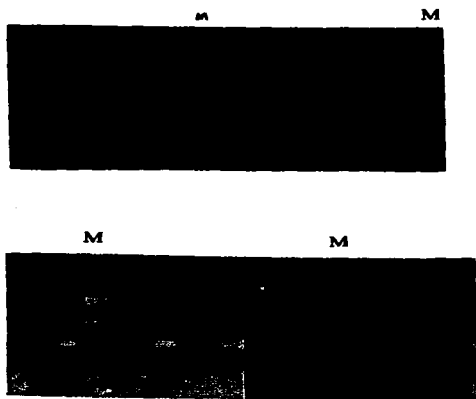


Fig 15. Amplificación por PCR de las regiones 5' y 3' del gen $\psi\beta$ -globina y corte con Hinc II. M= Marcador de 1 Kb

Se estudiaron un total de 142 cromosomas: 63 β^E , 1 β^C , 2 β^{TAl} y 76 β^A por el método de Southern. Se observaron 24 fenotipos diferentes. Los siete primeros fueron los más frecuentes: los números 1-3 en los pacientes, los números 5-7 en los normales no relacionados y los números 3-5 en los heterocigotos (Tabla 7).

Tabla 7. FRECUENCIA DE FENOTIPOS EN LA POBLACION ESTUDIADA

	FENOTIPOS					Pacientes SS	Padres AS	Hermanos		N-R* AA
	Hd	Hd	Asn	Hpa	Bam			AS	AA	
1	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	3	0	3	0	0
2	-/-	-/-	+/+	+/-	+/+	2	3	0	0	0
3	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	2	2	1	0	0
4	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	1	7	1	0	1
5	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	0	3	2	0	2
6	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	0	2	2	1	4
7	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	0	0	0	0	6
8	+/-	-/-	+/+	+/+	+/-	0	2	1	0	0
9	+/+	-/-	+/-	+/+	+/+	1	1	0	0	0
10	+/+	+/+	+/-	+/-	+/+	1	1	0	0	0
11	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	0	1	0	1	0
12	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	0	1	0	1	0
13	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	1	0	0	0	0
14	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	1	0	0	0	0
15	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	1	0	0	0	0
16	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	1	0	0	0	0
17	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-	1	0	0	0	0
18	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	0	1	0	0	0
19	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	0	0	1	0	0
20	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	0	0	0	0	1
21	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	0	0	0	0	1
22	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	0	0	0	0	1
23	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	0	0	0	0	1
24	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	0	0	0	0	1
Total						15	24	12	3	17

*N-R = no relacionados sanos.

Los fenotipos se separaron en genotipos empezando por los homocigotos, correlacionando con los padres. En las familias en donde sólo se encuentra la madre, se tomó en cuenta los haplotipos más frecuentes en otras poblaciones. Los resultados se presentan en la Tabla 8 y en las figuras 16-27.

Tabla 8. HAPLOTIPOS EN LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

Fam 1 P - M (2) $g^a(+ + + +)(- - + +)g^b$ CI (13) $g^a(+ + + +)(- - + +)g^b$ HM (1) $g^a(+ + + +)(- - + +)g^b$	Fam 2 P (13) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$ M (9) $g^a(- - + +)(+ - + +)g^b$ CI (3) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$ HM (4) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$
Fam 3 P (5) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ M (10) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$ CI (8) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ HM (11) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$ HM (14) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$	Fam 4 P - M (7) $g^a(- - + +)(+ - + +)g^b$ CI (6) $g^a(+ - + +)(+ - + +)g^b$ CI (12) $g^a(+ - + +)(+ - + +)g^b$
Fam 5 P (16) $g^a(+ + + +)(+ - - - + +)g^b$ M (17) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ CI (18) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$ HM (19) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$	Fam 6 P - M (24) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$ CI (22) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ CI (23) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$
Fam 7 M (27) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ CI (23) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$ HM (26) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$	Fam 8 P (28) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ M (30) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ CI (31) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$ HM (29) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ HM (30) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ HM (31) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$
Fam 9 P (32) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ M (33) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ CI (34) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$	Fam 10 P (38) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ M (39) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ CI (41) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ HM (40) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$
Fam 11 P (42) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ M (43) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ CI (45) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$ HM (44) $g^a(- - + +)(- - + +)g^b$	FAM 12 P (46) $g^a(+ - + +)(- - + +)g^b$ M (47) $g^a(- - + +)(+ - + +)g^b$ CI (48) $g^a(+ - + +)(+ - + +)g^b$ HM (49) $g^a(+ - + +)(+ - + +)g^b$ HM (50) $g^a(+ - + +)(+ - + +)g^b$ HM (51) $g^a(- - + +)(+ - + +)g^b$
Fam 13 P (53) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ M (52) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$ CI (53) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$ HM (54) $g^a(+ - + +)(+ - - - + +)g^b$	P (37) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$

P (35) $g^a(- - + +)(+ - - - + +)g^b$

• Recombinación

•• Mutación de novo

Como se observa en la Tabla 8, el haplotipo (+ - + +) se presentó tres veces en forma homocigota y siete en heterocigota en pacientes β^H ; tres veces en forma homocigota y seis en heterocigota en los hermanos AS y 16 veces en forma heterocigota en los padres. El haplotipo (- - + -) se presentó una vez en forma homocigota y cuatro veces en heterocigota en los pacientes, seis veces en forma heterocigota en padres y tres en hermanos.

Con respecto al haplotipo (- - + +), se presentó cinco veces en forma homocigota y nueve veces heterocigota en individuos normales, una vez homocigota y otra en heterocigota en padres y hermanos normales, una vez homocigota y dos veces en forma heterocigota en hermanos AS, y tres veces en forma heterocigota en pacientes.

Por análisis segregacional, se encontró un total de 13 haplotipos diferentes (Tabla 9).

En resumen, los haplotipos más frecuentes en los cromosomas β^H fueron (+ - + +) en el 52.4 % y (- - + -) en el 19.0 %, y en los cromosomas β^A : (- - + +) en el 38.2 % y (- - + +) en el 19.7 % (Tabla 10).

Tabla 9. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS β -GLOBÍNICOS EN MEXICANOS

# ¹ HAPLOTIPO (<i>abcde</i>) ²	PACIENTES		PADRES		HERMANOS		NORMALES	
	β^B	β^A	β^B	β^A	β^B	β^A	β^A	
3 (+ - + + +)	13	13	3		7	4	0	3
11 (- - + + +)	3	4	10		0	2	2	15
19 (- - + - +)	4	4	2		4	0	1	0
4 (- - - + +)	0	0	3		0	1	0	11
18 (- - + + -)	3	1	3		1	3	1	0
7 (+ - - + +)	1	0	0		0	1	1	0
15 (+ - + - +)	1	0	0		0	0	0	0
23 (+ + + - +)	1	0	0		0	0	0	0
31 (+ - + + -)	1	0	0		0	1	0	0
14 (+ + - + +)	0	0	2		0	0	1	1
2 (+ + + + +)	0	0	1		0	0	0	1
ND1(+ + - - +)	1	1	0		0	0	0	0
ND2(- + + + +)	0	0	0		0	0	0	3
β^C (+ - + + +)	1	0	0		0	0	0	0
β^{Tot} (- - + - +)	1	1	0		0	0	0	0
Total	30	24	24		12	12	6	34

¹ Números Automático et al (1984) ² a), b) Hinc III; c) Δ III; d) Hinc I; e) Hinc III. ND - No descrito

Tabla 10. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS EN LOS CROMOSOMAS β^B y β^A

#1	HAPLOTIPO Endonucleasas (abcde) ²	C R O M O S O M A [*] β^B		C R O M O S O M A [*] β^A	
		n	%	n	%
3/20	(+ - + + +)	33	52.4	10	13.2
11/12	(- - + + +)	7	11.1	29	38.2
19	(- - - + +)	12	19.0	3	3.9
4/9/25	(- - - - +)	0	0	15	19.7
18/24	(- - - + -)	5	7.9	7	9.2
Otros		6	9.5	12	15.8
Total		63	99.9	76	100.0

¹ Número clasificación Antonarakis et al (1984)

² Ver leyenda Tabla 9

* $\chi^2_{(3)} = 102.5, p < 0.005$

El haplotipo del cromosoma β^C fue (+ - + + +) y de los cromosomas β^{Ta} (- - + - +). También se observaron dos haplotipos no descritos con anterioridad: (+ + - - +) y (- + + + +) (Tabla 9).

En dos familias se encontraron eventos genéticos de interés: en una de ellas, el paciente presentó mutación *de novo* y en la otra, uno de los hermanos mostró recombinación génica (Fams. 8 y 10; Figs 20 Y 22).

Las diferencias entre las frecuencias β^B y β^A fueron estadísticamente significativas ($p < 0.005$) (Tabla 10). El análisis segregacional permitió encontrar 9 familias informativas de las trece estudiadas (Tabla 8).

Los haplotipos en las familias estudiadas se observan en las siguientes figuras. Los padres y hermanos heterocigotos están representados por \square, \circ ; los afectados por \blacksquare, \bullet , y los normales por \square, \circ . La primera línea de resultados corresponde al sitio Hind III del gen $G\gamma$, la segunda al sitio Hind III $A\gamma$ y las tres últimas a los sitios Ava II, Hpa I y Bam HI del gen β , respectivamente. Algunas familias están constituidas sólo por la madre y los hijos. También se presentan los resultados de dos padres portadores (35 y 37) que no corresponden a las familias estudiadas.

Fig 16.

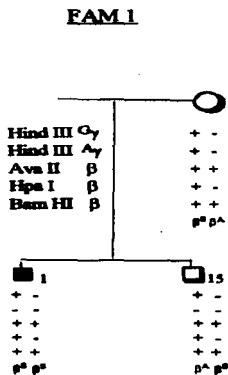


Fig 17.

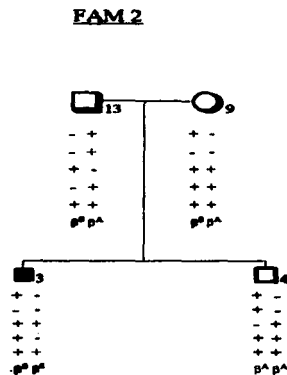
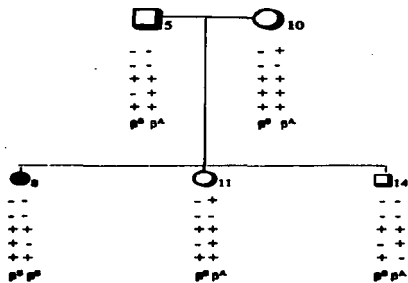


Fig 18.

FAM 3



CLAVES

- $\blacksquare \bullet$ AFECTADOS
- $\square \circ$ PORTADORES
- $\square \circ$ SANOS

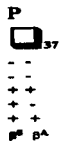


Fig 19.

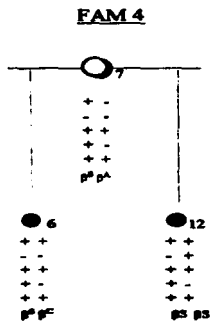


Fig 20.

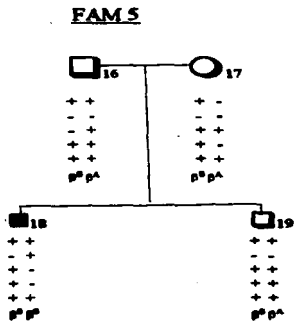


Fig 21.

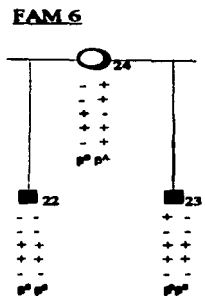


Fig 22.

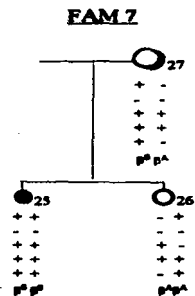


Fig 23.

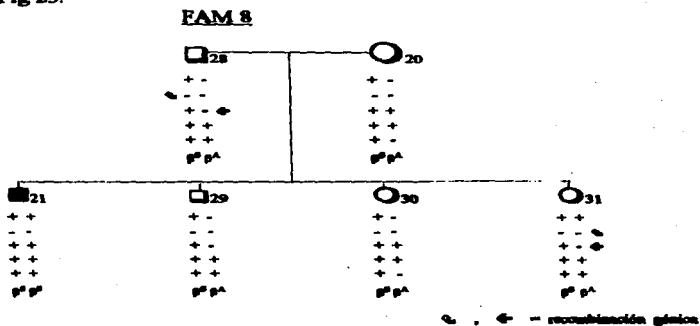


Fig 24.

FAM 9

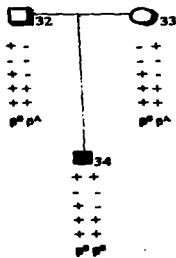


Fig 25.

FAM 10

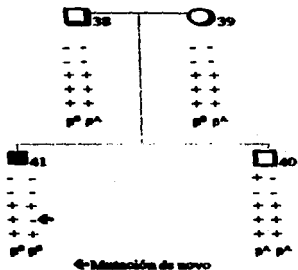


Fig 26.

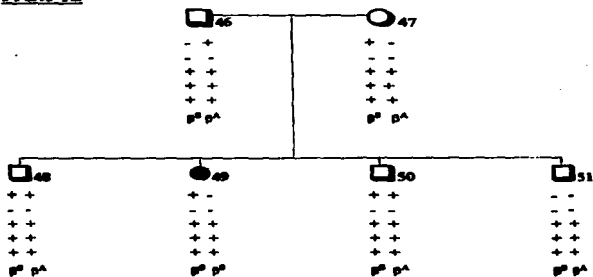
FAM 12

Fig 27.

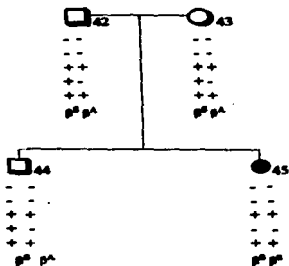
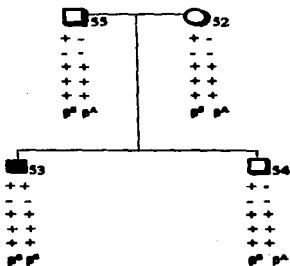
FAM 11

Fig 28.

FAM 13

VIII. DISCUSION

Con respecto a los marcadores genéticos, lo primero que llama la atención, es la mayor información y precisión de los datos obtenidos directamente del DNA (RFLPs, haplotipos) en comparación con los glicoproteicos. Un ejemplo es la detección de mutaciones en algunos padecimientos, la segregación de marcadores, el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal que se deriva de ellos. La presente tesis demuestra la utilidad de los RFLPs en la anemia de células falciformes tanto en los términos descritos como en el rastreo de los orígenes de esta mutación. Este padecimiento tiene una prevalencia de 18-20 por ciento, en algunas regiones de nuestro país (Liakar, 1981), por lo que se realizaron estudios detallados en aquellas poblaciones en las que se tuvo conocimiento de la presencia de genes africanos, como en la costa Este del país y será necesario realizarlo en aquellos lugares del interior de la república (por ejemplo Hidalgo y Zacatecas) en donde se sabe que llegaron grupos de población negra a trabajar en los centros mineros (Salamanca, 1990b).

En México el uso de técnicas para determinar los polimorfismos de DNA es cada vez más frecuente y tiene aplicaciones inmediatas en el campo de la genética humana, particularmente en la genética médica. Algunos ejemplos de ello son el diagnóstico de las distrofias musculares de Duchenne y de Becker y la identificación de mujeres portadoras del gen anormal (Coral et al., 1993), la investigación de las mutaciones de los genes ras y P53 en líneas celulares de cánceres humanos (Toledo, 1994), el análisis de las mutaciones del gen de la fenilalanina hidroxilasa (Nicolini et al., 1994) y en el campo de la medicina forense, para la identificación de individuos (Berumen, 1993).

El método de Southern empleado en el presente trabajo, es de gran utilidad para el reconocimiento de este tipo de polimorfismo. Para llevarlo a cabo con éxito es necesario una minuciosa estandarización, (condiciones óptimas en cada uno de sus pasos), una adecuada cantidad de enzimas de restricción (3-6 U enzima/ μ g de DNA) y los insumos indispensables (membranas especiales, radioactividad, "cassettes" para las autorradiografías, reactivos para su revelado, etc.), por lo que requiere de una cuidadosa atención y suficientes recursos económicos. Estas consideraciones se revisan de interés, sobre todo para quienes se inician en el manejo de las técnicas de la biología molecular. Este método es factible de realizarse en nuestro medio y pueden obtenerse buenos resultados, como se demuestra en el presente trabajo con una familia de genes no abordada previamente en el país.

El método de PCR constituye una alternativa para realizar los estudios de RFLPs, y ofrece ventajas sobre el de Southern tales como su rapidez, simplificación y economía incluyendo la manipulación de cantidades 100 veces menores de DNA.

Los resultados obtenidos por el método de Southern en la presente tesis, se organizaron primero como fenotipos (Tabla 7). Llana la atención que en la literatura revisada, los resultados no aparecen en la misma forma, probablemente debido a un análisis menos puntual de los mismos. Con la información de los fenotipos, se procedió a integrar los haplotipos, empezando por los resultados de los homocigotos y tomando en cuenta la segregación en los progenitores. En aquellas familias en las que no fue posible estudiar al padre, se tomaron en cuenta los haplotipos más frecuentes en otras poblaciones (Tabla 8).

De los 24 fenotipos diferentes en los 71 individuos estudiados, siete fueron los más frecuentes y comprendieron el 67.6 por ciento del total de la muestra (Tabla 7). Esta es una evidencia de asociación no al azar de los sitios polimórficos analizados, que se ve claramente reflejada en los haplotipos, ya que en únicamente cinco de ellos se concentra el 90 por ciento de la muestra. Debe tomarse en consideración la existencia de 32 distintos haplotipos posibles, dado que cada uno de los sitios puede ser (+) ó (-) en los cinco sitios de restricción (2⁵) (Tabla 9).

Hubo 33 haplotipos 3/20 (Tabla 10). El haplotipo 3 es el tipo Senegal, mientras que el 20 es llamado tipo Benú. Con estos datos, nuestro interés nos condujo a diferenciar entre ambos haplotipos, lo que puede lograrse con la enzima de restricción Hinc II en los sitios 5' y 3' del gen $\psi\beta$, dado que el tipo Senegal es positivo en ambos y el Benú es negativo (Tabla 5).

En el 70 por ciento de los treinta y tres haplotipos 3/20 fue posible emplear esta estrategia, después de amplificar por el método de PCR. Se encontró que todos fueron de tipo Benú y es probable que los otros 10 haplotipos también lo sean ya que fueron tomados de la misma región. Este hallazgo es muy importante, porque los haplotipos Benú y Benin, ligados a la mutación β^S en la muestra estudiada, son característicos de poblaciones africanas. Esto indica una gran influencia genética africana en los habitantes mexicanos de la costa del Golfo. A este respecto cabe mencionar que existe sólo un estudio en pacientes no negros con anemia de células falciformes (Rogers et al 1989). En este trabajo sólo cinco pacientes fueron de origen mexicano y en seis de los diez cromosomas, el tipo

encontrado fue Bantú. Existen pocos estudios como el nuestro realizados en otras poblaciones latinoamericanas que también hayan recibido influencia de genes africanos. Zago y cols. (1992) encontraron que el 66.2 por ciento de negros brasileños tenía el haplotipo 3, lo que está de acuerdo con la migración Bantú originada de Nigeria/Camerún durante la época Colonial de Brasil (Nagel, 1984). Los hallazgos aquí encontrados y los del grupo de Zago (1992) son diferentes de los observados en africano-americanos y jamaicanos (Antonarakis et al., 1984), en georgianos (Hatori et al., 1986) y en otros africano-americanos y caucásicos (Dimovski et al., 1991; Oser et al., 1992). En estos últimos grupos el haplotipo 19 fue predominante, mientras que el haplotipo 20 mostró baja frecuencia (Tabla 11).

Tabla 11. FRECUENCIA DE CROMOSOMAS BANTU EN VARIAS POBLACIONES

Población	Cromosomas β^B (n)	Haplotipos Bantú (%)	Referencia
Negros americanos	76	22.4	Antonarakis et al., (1984)
Negros jamaicanos	94	16.0	"
Negros brasileños	74	66.2	Zago et al., (1992)
Negros americanos	371	19.1	Oser et al., (1992)
Negros canadienses	61	11.5	"
Negros surinameses	77	29.9	"
Negros tanzaneses	111	98.2	"
Negros angoleños	16	87.5	"
Negros nigerianos	623	0.003	"
No negros americanos	10	60.0	Rogers et al., (1989)
Mestizos mexicanos	63	52.4	Presente estudio

Los haplotipos 19 y 20 están ligados al cromosoma β^B , en tanto que el haplotipo 11/12 es el más frecuente en cromosomas β^A y el haplotipo 9/25 está presente sólo en los β^A . En este estudio se analizaron 10 cromosomas β^A con haplotipo 11/12 usando la enzima Hinc II, después de la amplificación de los fragmentos 5' y 3' del gen $\psi\beta$, y se encontró que los

sitios de reconocimiento no estaban presentes. Estos hallazgos están de acuerdo con lo informado en la población caucásica y asiática (Waiscoat et al., 1986; Long et al., 1990; Dimovski et al., 1991; Omer et al., 1992).

Para establecer el ligamiento de los haplotipos con los cromosomas β^B se compararon las frecuencias de éstos con las encontradas en los cromosomas β^A . La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$, Tabla 10). Este hallazgo corrobora el ligamiento de los haplotipos 19 y 20 con el gen β^B .

En la presente tesis, se encontraron dos nuevos haplotipos (ND1 y ND2) (Tabla 10) no descritos previamente (Antonarakis et al., 1984). Su origen puede ser explicado en ND1 por una nueva mutación del haplotipo 2 en el sitio Ava II y Hpa I ó por entrecruzamiento entre los haplotipos 14 con 15 ó 23; y en el caso de ND2, por una nueva mutación en el sitio Hind III Δ_y del haplotipo 11 o por entrecruzamiento entre el haplotipo 2 y cualquiera de los haplotipos 4, 11, ó 19 (Fig. 29).

Figura 29. FORMACION DE HAPLOTIPOS ND1 Y ND2

Haplotipo Núm.	Hind III Δ_y	Hind III Δ_y
ND 1	++	--+
2	++	+++
14	++	-++
15	+ -	+ - +
23	++	+ - +
ND 2	- +	+++
2	+ +	+++
4	- -	- ++
11	- -	+++
19	- -	+ ++

Es interesante señalar que en el presente estudio se encontraron dos pacientes con cromosomas β^{Tst} y uno con β^C , que estaban gravemente afectados. El cromosoma β^{Tst} es frecuente en la región mediterránea y el β^C es de origen africano. Los haplotipos encontrados en nuestro estudio son similares a los informados en otros trabajos (Kazazian et al., 1984; Dimovski et al., 1991; Trabuchet et al., 1991), lo que indica un origen común en estas mutaciones.

Por otra parte, a pesar de no haber encontrado diferencias significativas entre el número de hermanos heterocigotos y normales (12 vs 3), llama la atención la alta frecuencia de heterocigotos, que está relacionada con la presencia de *Plasmodium falciparum* (Bruce-Chwatt, 1980). Como ya se señaló, los heterocigotos tienen ventaja selectiva en estas condiciones, por su resistencia a la infección del parásito.

La presencia de tipo Bantú en nuestra población es importante porque se ha demostrado que los distintos haplotipos β^S están relacionados con la severidad clínica de la anemia de células falciformes. De esta manera, los tipos Arabia-India y Senegal están asociados con fenotipos clínicos benignos, el Benin es intermedio y el Bantú es el más agresivo. Estos hallazgos parecen deberse, en parte, a una producción mayor del gen $G\gamma$, ligada con los cambios C \rightarrow T en la posición -158 y por lo tanto, con mayor producción de hemoglobina fetal en los primeros tipos y no así en el último (Nagal et al., 1985; Kulczik et al., 1986; Labie et al., 1985, 1987; Wainscoat et al., 1985). Este dato no sólo es importante desde el punto de vista clínico, sino también por las repercusiones psicosociales y económicas en aquellas poblaciones que portan el haplotipo Bantú en los países en vías de desarrollo, dada la gravedad del padecimiento y por los altos recursos que a ello se destinan.

El presente trabajo es el primer estudio en la familia de genes beta-globínicos realizado con técnicas de genética molecular en la población mexicana. Los resultados aquí descritos y analizados tienen repercusión en el campo de la genética de poblaciones, en el conocimiento de los haplotipos ligados a la mutación β^S y abren un ambicioso panorama para su aplicación en la prevención de las hemoglobinopatías mediante el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal. Además, podrían tener una aplicación en los estudios sobre terapia génica, que en un futuro próximo se utilizarán para erradicar este tipo de padecimientos.

IX. CONCLUSIONES

Se analizó la frecuencia de siete sitios de restricción polimórficos en la familia de genes beta-globínicos de pacientes con anemia de células falciformes y sus familiares en primer grado, originarios de Veracruz, y en individuos normales no relacionados empleando metodología de Southern y amplificación con PCR.

Se encontró ligamiento entre los cromosomas β^B y los haplotipos Benú y Benin, lo que demuestra la presencia de genes de origen africano en nuestra población.

Los haplotipos (- - - + +) y (- - + + +) son característicos de genes caucásicos y asiáticos ligados al cromosoma β^A .

Los haplotipos β^C y β^{Tad} corresponden a los informados en poblaciones Africanas y Mediterráneas.

Se describen haplotipos no informados con anterioridad, los que se explican por eventos de recombinación o mutaciones *de novo*.

Se demuestra la utilidad del estudio de la segregación de los haplotipos en la identificación de los genes de la familia de las beta-globinas y su aplicación en el asesoramiento genético y en el diagnóstico prenatal.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aher BP, Modall BC, Fairweather D, Hobbins JC, Mahoney MJ, Frigoletto FD, Sherman AS & Nathan DG: Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. A review of 15 cases. *N Engl J Med* 1976;295:1437-1443.
- Aher BP: Antenatal diagnosis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;612:237-250
- Allison AC: Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 1954;1:290-293
- Antonarakis SE, Boehm CD, Giardina PJ & Kazazian Jr HH: Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:137-141.
- Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Thissen CE, Dover GJ & Kazazian HH Jr: Origin of the β^S -globin gene in Blacks: The contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:853-856.
- Antonarakis SE, Kazazian HH & Orkin SH: DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* 1985;69:1-14.
- Antoniou M, deBoer E, Habets & Grosveld F: The human beta-globin gene contains multiple regulatory regions: Identification of one promoter and two downstream elements. *EMBO J* 1988;7:377-384.
- Aposhian HV: The use of DNA for gene therapy -the need, experimental approach, and implications. *Perp Biol Med* 1970;14:987-1008.
- Arber W & Dussoix D: Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* I: Host controlled modification of bacteriophage λ . *J Mol Biol* 1962;5:18-36
- Avery OT, MacLeod CM & McCarty M: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 1944;79:137-158.
- Baird M, Driscoll C, Schreiner H, Sciarretta GV, Sansone G, Niazi G, Ramirez F & Bank A: A nucleotide change at a splice junction in the human β -globin gene is associated with β^0 -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci* 1981;78:4218-1821.
- Behringer RR, Hammer RE, Brister RL, Palminter RD & Townes TM: Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7056-60.
- Berg P: Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science* 1981;213:296-303
- Berumen J: El análisis del ácido desoxirribucleico -ADN- en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo* 1993;XIX(111):34-41.

- Bodine DM & Ley TJ: An enhancer element lies 3' to the human γ globin-gene. *EMBO J*, 1987;6:2997-3004.
- Bodmer WF: HLA today. *Hum Immunol* 1986;17: 490-503.
- Boehm CD, Antonarakis SE & Kazazian HH Jr: Evidence supporting a single origin of the β^C globin gene in Blacks. *Am J Hum Genet* 1985;37:771-777.
- Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RM: Construction of a genetic linkage map in man using fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980;32:314-331.
- Brewer G: Post-transcriptional considerations of gene expression: translation, mRNA stability, and poly(A) processing. En: *Gene therapeutics. Methods and Applications of direct gene transfer*. Wolff JA, ed. Birkhäuser, Boston. 1994 pp 40-59.
- Bruce-Chwatt LJ: *Essential Malariaology*. London. William Heinemann Medical Books Ltd., 1980 pp 284-287.
- Buslinger M, Moschonas N & Flavell RA: β^+ Thalassemia: Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. *Cell* 1981;27:289-298
- Cavalli-Sforza LL & Bodmer WF: *The genetics of Human Populations*. Freeman, San Francisco. 1971, pp 148-154.
- Capechi MR: High efficiency transfection by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980;22:479-488.
- Chakravarti A, Bustow KH, Antonarakis SE, Weber PG, Boehm CD & Kazazian HH: Nonuniform recombination within the human β -globin gene cluster. *Am J Hum Genet* 1984; 36:1239-1258.
- Chang JC & Kan YW: A sensitive new prenatal test for sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 1982;307:30-32.
- Chebloune Y, Pagnier J, Trabuchet G, Faure C, Verdier G, Labie D & Nigon V: Structural analysis of the 5' flanking region of the β -globin gene in African sickle cell anemia patients: Further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:4431-4435.
- Chehab FF, Doherty M, Cai S, Kan YW, Cooper S & Rubin EM: Detection of sickle cell anemia and thalassemias. *Nature* 1987;329:293-294.
- Chorfas J: *Introducción a la Ingeniería genética*. Alianza. Madrid. 1984. pp 44-79.
- Comings DE: Sickle cell disease and related disorders. In: *Hematology*. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ & Rundles RW, Editores. Mc Graw-Hill Book Co. New York, 1972 pp 413-434.
- Conner BJ, Reyes A, Morin C, Itakura K, Teplitz RL & Wallace RB: Detection of

- sickle cell β^S -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:278-282.
- Cooper DN & Clayton FC: DNA polymorphism and the study of disease associations. *Hum Genet* 1988;78:299-312.
- Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñalzo L, Kofman S, Salamanca F & Montefiez C: Analysis of dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res* 1993;24:1-6.
- Crossley M & Orkin SH: Regulation of the β -globin locus. *Curr Biol* 1993;3:232-237.
- Danna K & Nathans D: Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Nat Acad Sci* 1971;68:2912-2917
- Dierks P, van Ooyen A, Cochran MD, Dobkin C, Reiser J & Weissmann C: Three regions upstream from the Cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit beta-globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell* 1983;32:695-706.
- Dillon N & Grosfeld F: Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *TIG* 1993;9:134-137.
- Dimovski AJ, Omar C, Agarwal S, Gu YC, Gu H, Kutler F, Lancos KD & Huisman THJ: Certain mutations observed in the 5' sequences of the γ^G - and γ^A - globin genes of β^S chromosomes are specific for chromosomes with major haplotypes. *Acta Haematol*, 1991;85:79-87.
- Dobzhansky T: Heredity and the nature of man. Harcut, Brace & World. New York, 1964.
- Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES, Botstein D, Akots G, Rediker KS, Gravius T, Brown VA, Rising MB, Parker C, Powers JA, Watt DE, Kaufman ER, Bricker A, Phipps P, Muller-Kahle H, Fulton TR, Ng S, Schumm JW, Braxton JC, Knowlton RG, Barker DF, Crooks SM, Lincoln SE, Daly MJ & Abrahamson J: A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 1987;51:319-337.
- Driscoll MC, Baird M & Bank A: A new polymorphism in the human β -globin gene useful in antenatal diagnosis. *J Clin Invest* 1981;68:915-919.
- Dusaix D & Arber W: Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage λ . *J Mol Biol* 1962;5:37-45.
- Engel JD: Developmental regulation of human β -globin gene transcription: a switch of

royalties? TIG 1993;9:304-309.

- Erich HA, Gibbs R & Kazazian HH: Polymerase Chain Reaction. *Curr Commn Mol Biol. Cold Sprig Harbor Lab Press.* 1989, pp 1-148.
- Evans T, Felsenfeld G & Reitman M: Control of globin gene transcription. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6:95-124.
- Flint J, Harding RM, Clegg JB & Boyce AJ: Why are some genetic diseases common. *Hum Genet* 1993; 91:91-117.
- Friedman MJ: Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:1994-1997.
- Friedman MJ: Oxidant damage to the malaria parasite in the sickled cell. *Nature* 1979;280:245-247.
- Geever RF, Wilson LB, Nallaseth FS, Milner PF, Bitter M & Wilson JT: Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization (prenatal diagnosis). *Proc Natl Acad Sci* 1981;78:5081-5085.
- Giblett E: *Genetic Markers in Human Blood*. Oxford, Blackwell. Sci. Pub. 1969. pp1-547.
- Goslar A, Dostschman T, Korn R, Serfling E & Kemler R: Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:9065-9069.
- Graham FL & Van der Eb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973;52:456-467.
- Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR & Kollias G: Position independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* 1987;51:975-985.
- Gusella JF: DNA polymorphism and human disease. *Ann Rev Biochem*, 1986;55:831-854.
- Hatcher SLS, Trang QT, Robb KM, Teplitz RL & Carlson JR: Prenatal diagnosis by enzymatic amplification and restriction endonuclease digestion for detection of hemoglobins A, S and C. *Mol Cell Probes* 1992;6:343-348.
- Hattori Y, Kutlar F, Kutlar A, McKie VC & Huisman THJ: Haplotypes of β^S chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. *Hemoglobin* 1986;10:623-642.
- Herrick JB: Peculiar elongated and sickle-shaped red corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 1910;6:517.
- Hobbins JC & Maloney N: In utero diagnosis of hemoglobinopathies. Technic for obtaining fetal blood. *N Engl J Med* 1974;290:1065-1067.

- Hollenberg MD, Kaback MM & Kazazian Jr HH: Adult hemoglobin synthesis by reticulocytes from human fetus at midtrimester. *Science* 1971;174:698-702.
- Hooper M, Hardy K, Hainside A, Hunter S & Monk M: HPRT-deficient (Lesh-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 1987;326:292-295.
- Ingram VM: Gene mutations in human hemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 1957;180:326-329.
- Jeffreys AJ: DNA sequence variants in the $\alpha\gamma$ -, $\beta\gamma$ -, δ - and β -globin genes of man. *Cell* 1979;18:1-10.
- Jeffreys AJ, Wilson V & Thein SL: Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.
- Junien C & van Heyningen V: Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 11. *Cytogenet cell Genet* 1991;58:459-554.
- Kan YW, Dozy AM, Alter BP, Frigoletto FD & Nathan DG: Detection of the sickle gene in the human fetus: potential for intrauterine diagnosis of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1972;287:1-5.
- Kan YW, Golbus MS & Dozy AM: Prenatal diagnosis of α -thalassemia. Clinical application of molecular hybridization. *N Engl J Med* 1976;295:1165-1167.
- Kan YW & Dozy AM: Antenatal diagnosis of sickle cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. *Lancet* 1978a;ii:910-912.
- Kan YW & Dozy AM: Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human β -globin structural gene relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci* 1978b;75:5631-5635.
- Kan YW & Dozy AM: Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science* 1980;209:388-391.
- Kazazian HH Jr., Orkin SH & Markham AF: Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific β -thalassemia mutations in Mediterraneans. *Nature* 1984;310:152-156.
- Kazazian HH Jr, Dowling CE, Waber PG, Huang S & Lo WHY: The spectrum of β -thalassemia genes in China and southeast Asia. *Blood* 1986;68:964-966.
- Kelly TJ Jr & Smith HO: A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. II. Base sequence of the recognition site. *J Mol Biol* 1970;51:393-409.
- Kogan SC, Doherty M & Gitschier J: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New Engl J Med* 1987;317:985-990.
- Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ & Evans MJ: A potential animal model for

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Leah-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 1987;326:295-298.

Kulozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJF, Fahusi AG, Haqae SK, Hilali AM, Kate S, Ranasinghe WAEP & Weatherall DJ: Geographical Survey of β^S -globin gene haplotypes: Evidence for an Independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 1986;39:239-244.

Labie D & Nagel RL: Genetic Heterogeneity of sickle mutations. *Acta Haematol* 1987;78:184-185.

Labie D, Pagnier J, Lepoumroulie C, Dunda-Belhodja O, Chardin P, Beldjord C, Wajzman H, Fabry ME & Nagel RL: Common haplotype dependency of high α_2 -globin gene expression and high HbF levels in β -thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:2111-2114.

Labie D, Dunda BO, Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A & Nagel RL: The -158 site 5' to the α_2 gene and α_2 expression. *Blood* 1985;66:1463-1465.

Lepoumroulie C, Dunda O, Trabuchet G, Mony-Lobé M, Labie D, Elion J & Krishnamoorthy R: A novel sickle cell gene of yet another origin in Africa: the Cameroon type (abstract, A225). *Blood* 1989;54:63 a.

Lepoumroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobé M, Bodo JM, Carnevale D, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R: A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 1992;89:333-337.

Landsteiner K: Über agglutinationserscheinungen beim Normalen Menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1901;14:1132-1135.

Lederberg J: Genetic transduction. *Am Sci* 1956;44:264-280

Lisker R: Estructura genética de la población mexicana. *Salvat. México*. 1981, pp 1-118.

Lisker R, Ramirez E, Perez-Bricio R, Granados J & Babinsky V: Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.

Little PFR, Flavell RA, Kooter JM, Annison G & Williamson G: Structure of the human fetal globin gene locus. *Nature* 1979;278:227-231.

Little PFR, Annison G, Darling S, Williamson R, Camba L & Modell S: Model for antenatal diagnosis of β -thalassemia and others disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms. *Nature* 1980;285:144-147.

Long JC, Chakravarti A, Boehm CD, Antonarakis S & Kazazian HH: Phylogeny of human β -globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am J Phys Anthropol* 1990;81:113-130.

Luzzatto L, Nwachukwu-Jarrot ES & Roddy S: Increased sickling of parasitoid

- erythrocytes as mechanisms of resistance against malaria in sickle cell trait. *Lancet* 1970;1:319-324.
- Madrigal A: Terapia génica en humanos. 1er. Congreso Nacional de Biología Molecular en Medicina. Guadalajara, Jal., agosto 31, 1994.
- McCutchan JH & Pagano JS: Enhancement of the infectivity of Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid with diethyl-aminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* 1968;41:351-356.
- McKusik V: Mendelian Inheritance in man. John Hopkins University Press. Baltimore. 1990 pp liiii-xcviii.
- Mears J, Lachman HM, Cabannes R, Arnognizn KPE, Labie D & Nagel R: Sickle gene. Its origin and diffusion from west Africa. *J Clin Invest* 1981;68:606-610.
- Merrill CR, Godman D, Sedman A & Ebert MH: *Science* 1981;211:1437-1438.
- Meselson M & Yuan R: DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 1968;217:1110-1114.
- Mulligan RC: Development of new mammalian transducing vectors. En: Eukaryotic viral vectors. Gluzman Y, ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, pp 133-137.
- Mullis K, Faloons F, Scharf S, Saiki G, Horn G & Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986;51:263-273.
- Mullis KB: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:43-46.
- Nagel RL: The origin of the hemoglobin β^S gene: Clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quart J Biol* 1984;2:53-62.
- Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Boudin V & Labie D: Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. *N Engl J Med* 1985;312:880-884.
- Nagel RL & Fleming AF: Genetic epidemiology of the β^S gene. *Baillière's Clin Haematol* 1992;5:331-365.
- Nagel RL & Ranney HM: Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. *Semin Haematol* 1990;27:342-359.
- Nagel RL & Roth EF: Malaria and Red Cell Genetic Defects. *Blood* 1989;74:1213-1221
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Krumlin E & White R: Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 1987;235:1616-

- Nathans D & Smith HO: Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann Rev Biochem* 1975;46:273-293.
- Neel JV: The inheritance of sickle cell anemia. *Science* 1949;110:64.
- Nicolini HS, Camarona BM, Bilbao G, Pérez B, Ugarte M, Fuentes CC, Marino MF, Velazquez A, Derviat L & Vela M: Molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Mexican phenylketonuric patients. *Arch Med Res* (en prensa).
- Oner C, Dimovaki A, Olivieri AF, Schirilo G, Codrington JF, Fattoum S, Adesile AD, Oner R, Yöregir GT, Altay Ç, Gurgey A, Gupta RB, Jogsewar VB, Gu L-H, Lanclos KD & Huismen THU: β^S haplotypes in various world populations. *Hum Genet* 1992;89:99-104.
- Orkin SH, Kazazian HH Jr Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Weber PG & Giardinia JV: Linkage of β -thalassaemia mutations and β globin polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature* 1982a;296:627-631.
- Orkin SH, Little PFR, Kazazian HH Jr & Boehm MS: Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis. Application to prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 1982b;307:32-36.
- Pagnier J, Meurs G, Dunda-Bolkhodja O, Schaeffer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL & Labie D: Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:1771-1773.
- Pauling L, Itano HA, Singer SJ & Wells IC: Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949;110:543.
- Payne R: A new leucocyte isoenzyme system in man. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1964;29:285-295.
- Peñalzoza R, García-Carrancá A, Coras T, Alvarez C, Berumen J, Zavala C & Salamanca F: Frequency of haplotypes of β -globin gene in a selected Mexican sample. *Am J Hum Biol* 1994 (En prensa).
- Peñalzoza R & Lisker R: Polimorfismos genéticos. Importancia Antropológica y Biomédica. en *Genética Clínica*. Guízar-Vázquez JJ, ed. El Manual Moderno 2da Ed. México. 1994 pp189-206.
- Peñalzoza R & Salamanca F: Los marcadores genéticos y sus aplicaciones en biomedicina. *Rev Mex Patol Clin* 1994;41:5-9.
- Phillips JA, Panny SR, Kazazian HH Jr, Boehm CD, Scott AF & Smith KD: Prenatal diagnosis of sickle cell anemia by restriction endonuclease analysis: Hind III

- polymorphisms in γ -globin genes extend test applicability. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77:2853-2856.
- Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E & Surrey S: Construction of human libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin* 1982;6:27-36.
- Race RR & Sanger R: Blood groups in man. Oxford, Blackwell Sci. Pub. 1975, pp 1-296.
- Righetti PG: Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Amsterdam, Elsevier. 1983.
- Roberts RJ: Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem* 1976;4:123-164.
- Robertson EJ, Bradley A, Kuehn M & Evans M: Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 1986;323:445-447.
- Rogers ZR, Powars DR, Kinney TR, Williams WD & Schroeder WA: Nonblack patients with sickle cell diseases have African β^S gene cluster haplotypes. *Clin Invest* 1989; 261:2991-2994.
- Ropers HH: Use of DNA probes for diagnosis and prevention of inherited disorders. *Eur J Clin Invest* 1987;17:475-487.
- Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yonshyama K, Fukuyama M, Stier LE, Paakkö PK, Gilardi P, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Jallet S, Pavirani A, Lecoq J-P & Crystal RG: Adenovirus-mediated transfer of a recombinant $\alpha 1$ -antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* 1991;252:431-434.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
- Saiki R, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH & Erlich HA: Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassaemia with enzymatically amplified DNA and non radioactive allelic-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988;319:537-541.
- Salamanca F: Citogenética Humana. México. Ed. Médica Panamericana. 1990a. p 43.
- Salamanca F: Aspectos genéticos de la población en la Colonia. En: Historia general de la medicina en México. Tomo II, Medicina Novohispana S. XVI. Academia Nacional de Medicina, UNAM, México D.F. 1990b pp 46-57.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

- Scharf SJ, Bowlock AM, McClure G, Klitz W, Yandell DW & Ertlich HA:
Amplification and Characterization of the retinoblastoma gene VNTR by PCR.
Am J Hum Genet 1992;50:371-381.
- Sinshelmer RL: The prospect for designed genetic change. *Am Sci* 1969;57:134-142.
- Smith HO & Wilcox KW: A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I.
Purification and general properties. *J Mol Biol* 1970;51:379-391.
- Smithies O & Walker NF: Genetic control of some serum proteins in normal humans.
Nature 1955;176:1265-70.
- Southern EM: Detection of specific sequences among DNA separated by gel
electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:506-517.
- Spritz RA, Jagadeeswaran P, Choudary PV, Biro PA, Elder JT, de Riel JK, Manley JL,
Geffer ML, Forget BG & Weissman SM: Base substitution in an intervening
sequence of a β^+ thalassemia human globin gene. *Proc Natl Acad Sci*
1981;78:2455-2459.
- Sutton M, Bouhassira EE & Nagel RL: Polymerase chain reaction amplification applied
to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*
1989;32:66-69.
- Stavenhagen R: Antropología y racismo: un debate inconcluso. *Antropológicas*
1992;4:5-8.
- Stewart MJ, Plautz GE, Del Buono L, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel EG, &
Nabel GJ: Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: Safety and
acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 1992;3:267-275.
- Straubinger RM & Papahadjopoulos D: Liposomes as carriers for intracellular delivery
of nucleic acids. *Math Enzym* 1983;101:512-527.
- Szybalaka EH & Szybalaki W: Genetic of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable
transformation of a biochemical trait. *Proc Nat Acad Sci* 1962;48:2026-2034.
- Tatum EL: Molecular biology, nucleic acids and the future of medicine. *Parapet Biol*
Med 1966;10:19-32.
- Taylor JM: Genetic lesion in homozygous α thalassemia (hydrops fetalis). *Nature*
1974;251:392-393.
- Toledo M: Frecuencia de polimorfismos de P53 en pacientes con cáncer epitelial. Tesis
de Maestría en Investigación Biomédica. Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM, 1994, sept 5.
- Trabuchet O, Elicon J, Dunda O, Lapoumaroulie C, Ducrocq R, Nafidi S, Zohoun I,
Chavestre A, Carnevale P, Nagel RL, Krishnamoorthy R & Labie D:
Nucleotide sequence evidence of uniceatric origin of β^C mutation in Africa.

- Hum Genet 1991;87:597-601.
- Trudel M & Constantini F: A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta-globin gene. *Genes Dev* 1987;1:954-961.
- Tuan D, Biro PA, de Riel JK, Lazarus H & Forget BG: Restriction endonuclease mapping and of the human γ globin gene loci. *Nu Ac Res* 1979;6:2519-2544.
- Tuan D, Solomon W, Li Q & London IM: The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:6384-6388.
- Wainscoat JS, Thein SL, Higgs DR, Bell J, Weatherall DJ, Al Awamy B & Sergeant GR: A genetic marker for elevated levels of haemoglobin F in homozygous sickle cell disease? *Br J Haematol* 1985;60:261-268.
- Wainscoat JS, Hill AVS, Boyce AL, Flint J, Hernandez M, Thein SL, Old JM, Lynch JR, Falusi AG, Weatherall DJ & Clegg JB: Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 1986; 319:491-493.
- Wall L, deBoer E & Grosfeld F: The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* 1988;2:1089-1100.
- Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR & Wood WG: The hemoglobinopathies. In *The metabolic basis of inherited disease*, ed. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, New York; McGraw-Hill, 6th ed. 1989 pp 2281-2339.
- Westway D & Williamson R: An intron nucleotide sequence variant in a cloned β^+ thalassemia globin gene. *Nucl Acid Res* 1981;9:1777-1797.
- White R, Leppert D, Bishop T, Barker D, Berkowitz J, Brown C, Callahan P, Holm T & Jerominaki L: Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* 1985; 313:101-110.
- White R & Lalouel J-M: Chromosome mapping with DNA markers. *Sci Am* 1988;258:40-48.
- Wilson JT, Milner PF, Summer ME, Nallaseth FS, Fadel HE, Reindollar RH, McDonough PG & Wilson LB: Use of restriction endonucleases for mapping the allele for β^0 -globin. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:3628-3631.
- Williamson R: Direct gene analysis of chorionic villi a possible technique for first trimester antenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Lancet* 1981;ii:1125-1127
- Wolff JA & Lederberg J: A history of gene transfer and therapy. In: *Gene therapeutics. Methods and applications of direct gene transfer*. Birkhäuser, Boston, 1994 pp 3-25.

- Wu CH, Wilson JM & Wu GY: Targeting genes-delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements *in vivo*. *J Biol Chem* 1989;264:16985-16987.
- Wu DY, Ugozoli L, Pal BK & Wallace: Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2757-2760.
- Wu R: DNA sequence analysis. *Ann Rev Biochem*, 1978;47:607-634.
- Zago MA, Figueroa MS & Ogo SH: Bantu β^S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol* 1992; 88: 295-298.
- Zavala C & Lisker R: El concepto biológico de Raza. *Rev Invest Clin* 1979;31:335-340.
- Zimmermann U: Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochem Biophys Acta* 1982;694:227-277.
- Zinder ND & Lederberg J: Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bact* 1952;64:679-699.

American Journal of Human Biology

The Official
Journal of the
Human Biology Council

EDITOR

Dr. Robert M. Malina
Department of Kinesiology
& Health Education
University of Texas
Austin, TX 78712-1287
Tel. (512) 471-6582
Fax (512) 471-4526

May 26, 1994

Dr. Rosenda Penalosa
Apdo. Postal 12-951
Mexico, 03020, D.F.
MEXICO

Re: "Frequency of Haplotypes in Beta Globin Gene
Cluster in a Selected Sample of the Mexican
Population"
(ms# M93095-R)

Dear Dr. Penalosa:

I am pleased that your manuscript is acceptable for
publication. The reviewers have noted several minor
points which need your attention in one more
revision. I believe that attention to these points
will significantly strengthen the manuscript.

I look forward to receipt of your revision in
duplicate. Please let me know how you addressed the
reviewers' concerns or suggestions. I will then take
care of the final editorial details and send the
manuscript to the publisher. With best wishes,

Yours sincerely,



Robert M. Malina
Editor-in-Chief



WILEY-LISS

**FREQUENCY OF HAPLOTYPES IN BETA GLOBIN GENE
CLUSTER IN A SELECTED SAMPLE OF THE MEXICAN
POPULATION.**

Rosenda Peñalosa¹, Alejandro García-Carrancó², Teresa Cerro³, Carlos Alvarez⁴, Jaime Berumen⁵, Carlos Zavala¹ and Fabio Salamanca¹.

¹Unit of Investigation in Human Genetic, National Medical Center, IMSS, Mexico City;

²Instituto de Investigaciones Biotécnicas, UNAM, Mexico City;

³Hospital General de Zona #14 IMSS, Veracruz Ver;

⁴Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, IMSS, Mexico City;

⁵Escuela Médico Militar, Mexico City.

Number of text pages 9, plus references 3, and tables 4.

Abbreviated title: Haplotypes of Beta globin gene in Mexicans.

Correspondence: Dr Rosenda Peñalosa, Apdo Postal 12-951,

México, 03020, D.F.

Fax 761-0952

Key words: DNA polymorphisms, Population genetics, Restriction enzymes, Sickle cell anemia.

ABSTRACT:

Five polymorphic restriction enzyme sites in the beta globin gene cluster (Hind III $\text{C}\gamma$, Hind III $\text{A}\gamma$, Ava II $\text{INV-2}\beta$ - and Hpa I and Bam HI 3' β -globin gene) were investigated in 13 homozygotes patients for sickle cell anemia, two double heterozygotes: one SC and one $\text{S}/\beta^{\text{Thal}}$; in 35 AS heterozygotes (23 parents and 12 siblings), one father $\text{A}/\beta^{\text{Thal}}$ and three normal siblings, all from Veracruz State, and in 17 normal Mexican unrelated subjects, using Southern blot technique. Fifteen haplotypes were identified in the 142 chromosomes. Five of them were the most frequent: two haplotypes (+ - + + +) (52.4 per cent) and (- - + - +) (19.0 per cent) were associated with β^{S} chromosomes; two haplotypes (- - + + +) (38.2 per cent) and (- - - + +)(19.7 per cent) were linked with β^{A} chromosomes and the fifth one (- - + + -) was present in both types of chromosomes. The haplotype (+ - + + +) correspond to the Bantu or Senegal type. With Hinc II analysis after PCR amplification in both 5' and 3' regions of the $\psi\beta$ globin gene it is possible to distinguish between these African types, as in the former both restriction sites are absent. This analysis was done in 23 β^{S} and 10 β^{A} chromosomes. Bantu and Benin haplotypes have been found with high frequency in African populations. All β^{S} chromosomes disclosed the Bantu type while β^{A} were similar to Caucasian chromosomes. Bantu and Benin haplotypes have been found with high frequency in African population, indicating the great influence of African genes in the population of the Mexican coasts. In addition, two previously unidentified haplotypes were found: (+ + - - +) and (- + + + +), that can be explained by crossing over events and/or by new mutations.

Protein markers (erythrocyte and leukocyte antigens, and other proteins) have been used to characterize the Mexican population (Liaker, 1981). Statistical analysis of the frequencies of these markers, allows to differentiate Urban Mestizos from Indians and from inhabitants of the coasts (Liaker et al 1990). The admixture of three main groups: Indians, Spaniards and Africans conforms the existing population in the country. Also, the study of protein markers has permitted the discovery of some particularities of the Mexican groups, such as: hemoglobin (Hb) Mexico, Hb Chispas, Albumin Mexico and other uncommon proteins (Liaker, 1981).

On the other hand, analysis of DNA polymorphisms can be used to detect a wide variety of genetic disorders and contribute to prenatal diagnosis of those entities (Gusella, 1986). Besides, is a powerful tool for the study of the origin and evolution of structural gene mutations, such as those affecting the β -globin chain (Nagel and Fleming, 1992).

Homozygotes for the β^S gene have a serious illness characterized by chronic anemia, joint aches and frequent infections among other alterations that decrease lifespan (Comings, 1972). However, AS heterozygotes have a selective advantage in endemic zones, where falciparum malaria is a mayor cause of morbidity and mortality (Allison 1954). Sickle cell anemia is a common disease in African population and in zones where African migration occurred, such as the coasts of Mexico. Restriction endonuclease analysis of the human β -globin gene and its neighboring regions has been employed in the study of its normal and abnormal fine structure (Pagnier et al., 1983, 1984; Kullosik et al., 1986; Nagel & Fleming, 1992; Laspounelloulie et al., 1989). Using different endonucleases, distinct DNA fragments can be identified.

In order to find out the frequency of these globin cluster polymorphic sites in the Mexican population, samples of HbS homozygous, HbAS heterozygous and normal HbA people were studied with five restriction enzymes.

Material and Methods

Peripheral blood samples were obtained from 15 sickle cell patients, born in Veracruz a state of the Gulf of Mexico (thirteen homozygotes SS, one double heterozygote SC and one double heterozygote S/ β^{Thal}), from 35 heterozygotes AS (23 parents and 12 siblings), from one heterozygous father A/ β^{Thal} and from three normal siblings all of them coming from 13 families. Also, 17 unrelated normal Mexicans individuals were studied. Informed written consent was obtained in all cases.

The hemoglobin type was determined by gel electrophoresis (Comings, 1972). DNA was extracted using the method described by Poncz et al (1982). Ten μg of DNA were digested with each one of the following restriction endonucleases: Hind III (New England Bio Labs), Ava II (New England Bio Labs), Hpa I (New England Bio Labs and Sigma chem Co.) and Bam HI (New England Bio Labs and Enzybiot Labs). The fragments were analyzed by the Southern blot method (1975) according to Kan and Dozy modification (1978). PCR amplification followed by restriction of the product with Hinc II enzyme (New England Bio Labs) was employed in the analysis of 5' and 3' regions of the $\psi\beta$ -gene (Sutton et al., 1989).

Plasmid p βS with 4.4 Kb Pst I genomic fragment which contains the β -globin gene, was kindly donated by Dr. Fernando Montiel (Facultad de Químicas, UNAM, Mexico City), and plasmid JW 151, with a 1.1 Kb Taq I cDNA β -globin gene, was supplied by Dr. Haigh Kazazian Jr. (The John Hopkins University, Baltimore, M.D). The locus, enzyme and fragment sizes obtained with each endonucleases are summarized on Table 1.

Haplotypes were classified following Pagnier et al., (1984) in accordance with the expected DNA fragment: a polymorphic site was present (+) or absent (-) (Fig 1).

The frequencies of haplotypes between β^{S} and β^{A} chromosomes were compared using a Chi square test.

Results

Sixty three of the 142 chromosomes were β^S , one β^C , two β^{Thal} and 76 had the β^A gene.

Thirteen different haplotypes were found in all samples (Table 1). Their numbers correspond to the classification proposed by Antonarakis et al. (1984). The haplotype of chromosome C was 3/20 and the chromosomes β^{Thal} were 19. Also two unusual haplotypes (+ + - - +) and (- + + + +) were found.

PCR amplification of the 5' and 3' region from the $\psi\beta$ -globin gene was performed in 23 β^S (+ - + + +) and 10 β^A (- - - + +) chromosomes. Restriction analysis of the products with Hinc II showed that all chromosomes were negative for the restriction sites.

Five haplotypes made up 90.4 per cent of the sample (Table 3). Haplotypes 20 and 19 were common in β^S chromosomes while haplotypes 11/12 and 4/9/25 prevailed in β^A chromosomes (Table 3). A highly significant difference ($p < 0.005$) was found between β^S and β^A chromosomes.

Discussion

There was evidence of non random association of the DNA polymorphic sites studied: more than 90 percent of the sample showed only five haplotypes of the 32 possible options (+ or - in five restriction sites).

As can be seen on Table 3, there were thirty three 3/20 haplotypes. Haplotype 3 is Senegal type, while 20 is called Bantu type. By using Hinc II restriction enzymes in 5' and 3' pseudo-beta gene, it is possible to differentiate both types, as the former is positive and the other one is negative for the restriction sites (Pagnier et al., 1984).

In 69.7 per cent of the thirty three 3/20 β^S chromosomes (Table 4), it was possible to use Hinc II in both sites of pseudo-beta gene, after PCR amplification. All of them were found to the Bantu type. Both, Bantu (+ - + + +) and Benin (- - - + +) haplotypes have been found with high frequency in African population, including the inhabitants of the Mexican coasts.

The above mentioned results are similar to those in non black patients with sickle cell disease studied by Rogers et al., (1989) (five patients were Mexicans and six β^S chromosomes had Bantu type). Besides, Zago et al., (1992) in Brazilian Blacks, found 66.2 per cent with Bantu haplotype. These findings are in accordance with the origins of Africans brought to the New World (Nagel, 1984).

Haplotype 20 and 19 were associated with β^S chromosomes while 11/12 was more frequent in β^A chromosome. In β^A (- - - + +) chromosomes using Hinc II enzyme the recognition sites were absent. These findings are in accordance with the results of Waincoat et al., (1986), Dimovski et al., (1991) and Öner et al., (1992).

A highly significant difference ($p < 0.005$), was found when the frequencies of β^S and β^A chromosomes were compared, corroborating a strong association of β^S gene with haplotypes 20 and 19.

Two new haplotypes (ND1, ND2) not described by Antonarakis et al (1984), were found in the present study (Table 2). Their origin could be explained in ND1 haplotype by a new mutation in site Ava II or Hpa I, or by crossingover between haplotypes 14, and 15 or 23 in case of ND1 haplotype, and in ND2 haplotype by new mutation in site Hind III G_{γ} - or

Λ_y -gene or by crossingover between the haplotype 2 and anyone of the haplotype 4, 11, or 19.

The findings of this study were also different from African American and Jamaican populations (Antonarakis et al., 1984), from Georgia population (Hattori et al., 1986), and from other African-American and Caucasian populations (Dimovaki et al., 1991; Öner et al., 1992); in those groups, haplotype 19 was predominant, while haplotype 20 showed the lowest frequencies (Table 4).

It is interesting to note that β^{Thal} and β^C chromosomes were similar to those described in other populations (Kazazian et al., 1984; Trabuchet et al., 1991; Dimovsky et al., 1991), suggesting a common origin of these mutations.

In another hand, in spite of non statistically significant differences between the frequency of heterozygotes and normal homozygotes (12 vs 3) attention must be called about the higher frequency of heterozygotes since it is known to be associated to infestation by *Plasmodium falciparum* and malaria is endemic in the latitudes where the present study was performed (Bruce-Chwatt, 1980).

This is the first study of the β -gene cluster performed in the Mexican population using restriction enzymes and the results herein described are useful in population genetics and the prevention of the hemoglobinopathies, as they can be applied for genetic counseling purposes and prenatal diagnosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Autors are grateful to Drs Fernando Montiel (Facultad de Química, UNAM, Mexico City) and Haigh Kazazian Jr. (The John Hopkins University, Baltimore, MD) for their kindly donation of pR3 and JW 151 plasmids.

This work was partially supported by CONACYD (to FS and to AGC), by The Miguel Alemán Fundation (to AGC) and by PADEP (to RP).

Literature cited

- Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theiseu CE, Dove GJ, Kazazian HH Jr. (1984) Origin of the β^B -globin gene in blacks: The contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 81:853-856.
- Allison AC (1954) Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 1:290-293.
- Bruce-Chwatt LJ (1980) *Essential Malariaology*. London William Hainemann Medical Books Ltd., pp284-287.
- Comings DE (1972) Sickle cell disease and related disorders. In Williams WJ, Beutler E, Erbelev AJ, Runder W (eds.): *Hematology*. New York. McGraw-Hill Book, pp 417-419.
- Dizdovick AJ, Omer C, Agarwal S, Gu Y-C, Gu L-H, Kutler F, Lancelos KD, Huisman THJ (1991) Certain mutations observed in the 5' sequences of the α^A - and α^G -globin genes of β^B chromosomes are specific for chromosomes with major haplotypes. *Acta Haematol* 85:79-87.
- Gusella JF (1986) DNA polymorphism and human disease. *Ann Rev Biochem* 55:831-854.
- Hattori Y, Kutler F, Kutler A, McKie VC, Huisman THJ (1986) Haplotypes of β^B chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. *Hemoglobin* 10:623-642.
- Ingram VM (1957) Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180:326-329.
- Kan YW, Dozy AM (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 75:5631-5635.
- Kazazian HH Jr, Orkin SH, Markham AF, Chapman CR, Youssoufian H, Weber PG (1984) Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific β -thalassaemia mutations in Mediterraneans. *Nature* 310:152-156
- Kulczik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essau GJF, Falusi AG, Haque SK, Hilali AM, Kate S, Ramasinghe WAEP, Weatherall DJ (1986) Geographical survey of β^B globin gene haplotypes: Evidence for an independent Asian origin of sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 39:239-244.
- Lapoumédoule C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Monty-Lobé M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R (1992) A novel sickle cell

- mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 89:333-337.
- Lisker R (1981) *Estructura genética de la población mexicana*. México. Salvat.
- Lisker R, Ramirez E, Perez-Briceno R, Granados J, Babinaky V (1990) Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 62:791-801.
- Nagel RL, Fleming AF (1992) Genetic epidemiology of β^S gene. *Baillière's Clin Haematol* 5:331-365.
- Öner C, Dimovaki A, Olivieri NF, Schirilo G, Codrington JF, Fattoum S, Adesile AD, Öner R, Yüregir GT, Altay Ç, Gurgay A, Gupta RB, Jogessar VB, Kitunda MN, Loukopoulos D, Tamagnini GP, Ribeiro MLS, Kuslar F, Ou L-H, Lenclos KD, Huisman THJ (1992) β^S Haplotypes in various world populations. *Hum Genet* 89:99-104.
- Pagnier J, Labie D, Lachman HM, Dunda-Belkhdja O, Kaptus-Nocbe I, Zohoun I, Nagel RL, Mears JG (1983) Distribution and evolution of hemoglobin and globin loci. New York. Elsevier.
- Pagnier J, Mears G, Dunda-Belkhdja O, Schaffer-Rego KE, Beldford CH, Nagel RL, Labie D (1984) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 81:1771-1773.
- Poncz M, Solowiejczyk D, Sharpel B, Mary Y, Schwartz E, Surrey S (1982) Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin* 6:27-36.
- Rogers ZR, Powers DR, Kinney TR, Williams WD, Schroeder WA (1989) Nonblack patients with sickle cell disease have African β^S gene cluster haplotypes. *J Am Med Assoc* 261:2991-2994.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments prepared by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 48:503-517.
- Sutton M, Bouhasaira EE, Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 32:66-69.
- Trabuchet G, Elion J, Dunda O, Lapoumeroulie C, Duorcoq R, Nadjifi S, Zohoun I, Chaventre A, Carnevale P, Nagel RL, Krishnamoorthy R, Labie D (1991) Nucleotide sequence evidence of uniceentric origin of the β^C mutation in Africa. *Hum Genet* 87:597-601.
- Wainscoat JS, Hill AVS, Boyce AL, Flint J, Hernandez M, Thein SL, Old JM, Lynch JR, Falusi AG, Weatherall DJ, Clegg JB (1986) Evolutionary relationships of

human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 319:491-493.

Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH (1992) Bantu β^S Cluster haplotypes predominates among Brazilian Blacks. *Am J Phys Anthropol* 88:295-298

Table 1. LOCATION OF THE POLYMORPHIC RESTRICTION SITES IN THE β -GLOBIN GENE CLUSTER AND FRAGMENT SIZES (Kb) WITH EACH STUDIED ENDONUCLEASE USING THE SOUTHERN BLOT METHOD.

Enzyme	G_γ	A_γ	β
Hind III (Hd)	8.2 6.8, 7.5	3.2 2.6	- -
Ava II (A)	- -	- -	2.0 2.2
Hpa I (Hp)	- -	- -	7.0, 7.6 13.0
Bam HI (B)	- -	- -	9.3 22.0

Table 2. β -GLOBIN GENE CLUSTER HAPLOTYPES FREQUENCY

# ¹ Endonuclease	Haplotype	Patients		Parents		Siblings		Siblings	Normal
	(a b c d c) ²	β^S	β^A	β^S	β^A	β^S	β^A	β^A	
	n	n	n	n	n	n	n	n	
20	(+ - + + +)	13	3	13	4	7	0	3	
19	(- - + - +)	4	2	4	0	4	1	0	
11	(- - + + +)	3	10	4	2	0	2	15	
4	(- - - + +)	0	3	0	1	0	0	11	
18	(- - + + -)	3	3	1	3	1	1	0	
7	(+ - - + +)	1	0	0	1	0	1	0	
15	(+ - + - +)	1	0	0	0	0	0	0	
23	(+ + + - +)	1	0	0	0	0	0	0	
31	(+ - + + -)	1	0	0	1	0	0	0	
14	(+ + - + +)	0	2	0	0	0	1	1	
2	(+ + + + +)	0	1	0	0	0	0	1	
ND1	(+ + - - +)	1	0	1	0	0	0	0	
ND2	(- + + + +)	0	0	0	0	0	0	3	
β^C	(+ - + + +)	1	0	0	0	0	0	0	
β^{Thal}	(- - + - +)	1	0	1	0	0	0	0	
Total		30	24	24	12	12	6	34	

¹ Numbers correspond to Antonarakis et al classification (1984).

² Enzymes: a = Hind III, G_{γ} -; b = Hind III, A_{γ} -; c = Ava II, INV-2 β -; d = Hpa I, 3' β - and c = Bam III, 3' β -gene.

ND - Not described.

Table 3. HAPLOTYPE FREQUENCY IN THE β^S AND β^A CHROMOSOMES

#1	Haplotype Endonuclease (a b c d e) ²	C h r o m o s o m e *			
		β^S		β^A	
		n	%	n	%
20	(+ - + + +)	33	52.4	10	13.2
11/12	(- - + + +)	7	11.1	29	38.2
19	(- - + - +)	12	19.0	3	3.9
4/9/25	(- - - + +)	0	0	15	19.7
18/24	(- - + + -)	5	7.9	7	9.2
Others		6	9.5	12	15.8
Total		63	99.9	76	100.0

¹ Symbols correspond to Antonarakis et al classification (1984).

² See Table 2 legend.

* Without β^C and β^{Thal} chromosomes

$\chi^2_{(5)} = 102.5, p < 0.0005.$

Table 4. FREQUENCY OF BANTU CHROMOSOMES IN SEVERAL POPULATIONS.

Population	β^S Chromosomes (n)	Bantu haplotype (%)	Reference
American Blacks	76	22.4	Antonarakis et al (1984)
Jamaican Blacks	94	16.0	"
Mexican Nonblacks	10	60.0	Rogers et al (1989)
Brazilian Blacks	74	66.2	Zago et al (1992)
American Blacks	371	19.1	Oner et al (1992)
Canadian Blacks	61	11.5	"
Surinamese Blacks	77	29.9	"
Kenyan Blacks	111	98.2	"
Tanzanian Blacks	41	100.0	"
Angolan Blacks	16	87.5	"
Nigerian Blacks	623	0.003	"
Mexican Mestizos	63	52.4	Present study