

## Tesis de Posgrado

# Estudio del polimorfismo de los genes de interferón

Rozenblum, Ester

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rozenblum, Ester. (1992). Estudio del polimorfismo de los genes de interferón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2471\\_Rozenblum.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2471_Rozenblum.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rozenblum, Ester. "Estudio del polimorfismo de los genes de interferón". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2471\\_Rozenblum.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2471_Rozenblum.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Tema de tesis**

**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE INTERFERON**

**Autora**

**ESTER ROZENBLUM**

**Director de tesis**

**Dr. JOSE LA TORRE**

**Lugar de trabajo**

**LABORATORIO BIOSIDUS**

*Tesis  
2471  
y 2.*

**Tesis presentada para optar al título de Doctora  
en Ciencias Biológicas**

**AÑO 1992**

Para Alberto y Andrés con todo  
mi cariño

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José La Torre por la dirección de este trabajo, por su gran generosidad, su estímulo, ayuda y sus muy buenos consejos.

Quiero agradecer muy especialmente al Lic. Marcelo Arguelles por generosamente facilitarme su laboratorio, así como colaborar con todo lo necesario para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Marcelo Criscuolo y a todos los compañeros de BioSidus, por su colaboración, especialmente a Andrés Bercovich.

Al Dr. Norberto Judewitz por su estímulo constante, sus ideas, sus buenos consejos y su muy buen humor que hizo que la tarea de investigación sea aún más agradable.

A mis compañeras y amigas Daniela Centrón García y Silvia Piñeiro, por su constante estímulo, comprensión y ayuda, en todo momento.

Al Dr. Leonardo Satz por sus valiosos consejos y por el aporte de algunas muestras de pacientes leucémicos, que fueron utilizadas durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Irene Larripa, a la Dra. Lucía Barazzutti y al Dr. Pablo Rendo por el aporte de muestras de pacientes leucémicos, así como por el intercambio de información útil para el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Juan H. Hunziker, a la Dra. Lidia Poggio, al Dr. Carlos A. Naranjo, al Dr. Juan Vilardi y a la Dra. Beatriz Saidman por su confianza y apoyo.

A la Sra. María Esther Origioni quien con sus cuidados y atenciones hizo que trabajar en el laboratorio sea mucho más fácil.

A mi marido y mi hijo por su enorme paciencia, su cariño y apoyo en todo momento. A mi hermanas Sara, Susana y Pnina por su cariño y estímulo. A mis amigas Celina, Viviana, Clara, Adriana y Sara por tantos años de amistad y cariño.

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1.1
Características generales	1.1
Evolucion de los genes de interferón	1.2
Familia multigénica de Alpha-IFN y el gen Beta-1-IFN	1.6
Multiplicidad de interferones-Alpha	1.10
Multiplicidad de interferones-Beta	1.13
El gen Gamma-interferón	1.17
Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción	1.20
Localización de genes responsables de enfermedades humanas	1.25
Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y cancer	1.34
Leucemia y genes de interferón	1.39
Objetivo de la tesis	1.42

MATERIALES Y METODOS	2.1
Sondas moleculares	2.1
ADN humano	2.2
Extracción de ADN humano	2.2
Purificación de ADN humano	2.5
Digestión de ADN humano con endonucleasas de restricción	2.6
Electroforesis en gel de agarosa	2.7
Transferencia de geles	2.8
Formación de ADN recombinante: ligación	2.10
Transformación de Escherichia coli	2.10
Extracción de plásmidos	2.13
Purificación de ADN plasmídico	2.15
Digestión de ADN plasmídico con endonucleasas de restricción	2.15
Electroelución de fragmentos de ADN	2.16
Marcación radioactiva de sondas moleculares	2.17

Nick translation	2.17
Random primers	2.19
Hibridación molecular	2.19
Autorradiografía	2.22
<b>RESULTADOS</b>	<b>3.1</b>
Subclonación de ADN codificante para Alpha-2, Beta-1 y Gamma-IFN	3.1
Hibridación molecular	3.14
Hibridación de ADN de Alpha-2-IFN con con ADN humano	3.19
Hibridación de ADN de Beta-1-IFN con ADN humano	3.43
Hibridación de ADN de Gamma-IFN con ADN humano	3.68
Haplotipos	3.78
Desequilibrio gamético	3.90

DISCUSION	4.1
Tamaño de la muestra	4.1
Loci polimórficos	4.1
Segregación de los loci	4.5
RFLPs de los genes de interferón en otra población	4.5
Equilibrio de Hardy y Weinberg	4.7
Haplotipos y desequilibrio gamético	4.10
Contenido de información polimórfico (P.I.C.)	4.11
Polimorfismo a nivel génico y a nivel proteico	4.11
Reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.)	4.15
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	5.1

N.B.: En este trabajo se utilizan términos en idioma inglés que son de uso corriente y cuya traducción es difícil.



## INTRODUCCION

### EL SISTEMA INTERFERON

#### CARACTERISTICAS GENERALES:

Los interferones (IFNs) son proteínas presentes en todos los mamíferos y también en muchos vertebrados (Wilson et al. 1983). Hasta el presente se han aislado e identificado un gran número de secuencias de ADN correspondientes a varias especies además de los interferones humanos. Estas secuencias codificantes fueron clonadas y expresadas en bacterias y en otros huéspedes heterólogos.

Los interferones humanos poseen un amplio espectro de actividades biológicas (Pestka et al., 1987). Presentan actividad antiviral y antitumoral. Son además moléculas regulatorias naturales que juegan un rol muy importante en los procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo celular (Romeo et al. 1989).

Existen tres tipos diferentes de interferón: Alpha. Beta y Gamma IFN que se diferencian antigénicamente en ensayos de neutralización. No obstante Alpha-2 y Beta-1-IFN poseen un epítopo en común (Kontsek et al 1990) lo que indicaría que la distinción antigénica entre estos dos tipos de IFNs no es absoluta.

Estas proteínas son inducibles, aunque existen algunas evidencias de que hay una pequeña síntesis constitutiva (Tovey et al., 1987; Duc-Goiran et al., 1985). Los virus, ARN de doble cadena, entre otras moléculas, inducen la síntesis de los Alpha y Beta-1-IFNs. Los Alpha-IFNs se denominan también IFNs leucocitarios y el Beta-1-IFN se denomina interferón fibroblástico, debido a las células en las que originalmente se los encontró, pues luego se los halló en otros tipos celulares también.

Estas proteínas salen de las células productoras y se unen a receptores de otras células, como paso inicial de su mecanismo de acción. Los Alpha-IFNs y el Beta-1-IFN comparten un mismo receptor, éste está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 21. Por su parte el Gamma-IFN se une a un receptor diferente, formado a su vez por dos componentes que se encuentran codificados por los cromosomas 6 y 21, cada uno de ellos. Existen

algunas evidencias de competencia entre los interferones Beta-1 y Gamma por el receptor para Gamma-IFN. (Pestka et al., 1987).

Los tres tipos de interferones presentan actividad inmunomodulatoria, aunque es el IFN-Gamma el que más participa de la respuesta inmune. Este IFN se produce en los linfocitos T, como respuesta a la inducción por antígenos o mitógenos.

En la especie humana los Alpha-IFN están codificados por una familia de genes que se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 9 en las bandas 9p13-p21, muy próximos al gen Beta 1-IFN que se halla en la banda 9p22. Es decir se ubica distalmente con respecto a los genes Alpha (Díaz et al. 1986; Díaz et al. 1990a); ninguno de ellos posee intrones.

El gen Beta-2-IFN, que se encuentra ubicado en el cromosoma 7 (Sehgal et al. 1986), posee 4 intrones y no presenta homología con el gen Beta-1; sólo comparten algunos epitopes. Su nombre actual es el de interleukina 6 (Van Snick, 1990). El gen Gamma-IFN se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 12 en la banda q24.1 (Trent et al., 1982), posee 3 intrones. No presenta casi homología con los otros interferones descriptos.

#### EVOLUCION DE LOS GENES DE INTERFERON:

Como ya se mencionó al comienzo los interferones están presentes en todos los mamíferos y en muchos vertebrados. No se han encontrado estos genes en los invertebrados.

La familia de genes Alpha-IFN presenta un número similar de bandas en la mayoría de los mamíferos estudiados (Wilson et al., 1983), lo que sugeriría una complejidad genética similar para todos ellos, es decir aproximadamente igual número de genes. En las otras clases de vertebrados sólo se detectó una señal débil cuando se hibridó ADN de Alpha-IFN humano con el ADN de aves y reptiles y no se observó señal al hibridar con peces y anfibios.

Wilson y colaboradores (1983) también hibridaron ADN del gen Beta-1-IFN humano con ADN de diferentes mamíferos, hallando en todos los casos un gen de copia única salvo en los miembros analizados de la familia Bovidae: *Bos taurus* (vaca) y *Antilope cervicapra* (antílope).

En esta dos especies se observó una familia de genes Beta-IFN, de complejidad similar a la familia de genes Alpha-IFN humana. Estos investigadores postularon la aparición de esta familia de genes (Beta-IFN), por duplicación génica, ocurrida en algún momento posterior a la radiación de los mamíferos, pues el resto de los mamíferos poseen un gen de copia única, y anterior a la divergencia entre vaca y antílope en los Artiodactyla.

A diferencia de los genes de Alpha-IFN, uno o más genes de Beta-IFN parecen estar presentes en todas las clases de vertebrados: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos.

Las familias de genes de IFN tenderían a estabilizarse en tamaño y organización a lo largo de los períodos evolutivos (Wilson et al., 1983).

Esto apoyaría la hipótesis de Taniguchi et al. (1980) quienes postularon que los genes de interferón derivarían de un gen ancestral existente antes de que surgieran los vertebrados, hace 500 a 1.000 millones de años, y en consecuencia presente en todos ellos.

Estos autores observaron la gran homología existente en las regiones codificadoras de los genes Alpha-IFN y del gen Beta-1-IFN humanos, tanto a nivel del ADN como a nivel de la proteína. Sugirieron entonces una duplicación a partir de un gen ancestral que dió origen a los genes Alpha y Beta-1-IFN. Posteriormente Alpha se duplicó para dar origen a la familia de genes Alpha-IFN. El hecho de que estos genes se encuentren agrupados en un mismo cromosoma y no posean intrones, favorece esta hipótesis.

Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de Alpha-IFN en peces y anfibios, las primeras clases de vertebrados aparecidas evolutivamente (Wilson et al., 1983). Esto contradeciría el postulado de Taniguchi et al. (1980) acerca de la existencia de estos genes en todos los vertebrados.

La comparación en una especie dada, de las homologías entre genes parálogos, es decir entre genes que se originaron por duplicación a partir de un gen ancestral, permite establecer una filogenia génica (Ayala, 1980).

Es así que Alpha y Beta-IFN fueron originalmente genes parálogos, pues habrían surgido por duplicación a partir de un gen ancestral (Taniguchi et al., 1980). Luego se habría duplicado repetidamente el gen Alpha, dando origen a la familia de genes Alpha-IFN, parálogos entre sí.

El análisis se complica aún más cuando se comparan genes pertenecientes a esta familia en diferentes especies, pues a veces es difícil distinguir secuencias ortólogas, es decir, procedentes de un gen ancestral común a ambas especies y que luego divergieron, de secuencias parálogas, originadas por duplicación a partir de un gen ancestral también. Por ejemplo Miyata et al. (1985) cuando comparan la tasa evolutiva para los sitios silenciosos (sinónimos) en la zona codificadora, en el gen Gamma-IFN humano y en el murino la encuentra muy alta,  $7,2 \times 10^{-9}$ , siendo la tasa promedio para los mamíferos mucho menor. Una de las explicaciones posibles para este fenómeno según estos investigadores es que se trate de genes parálogos y no ortólogos.

La tasa evolutiva  $v = K_a / (2t)$ , fue calculada considerando  $K_a$  como el índice de diferencias entre dos secuencias de ADN codificadoras (codogénicas) comparadas, es también llamado índice de sustitución de aminoácidos;  $t$  es el tiempo de divergencia entre estas dos secuencias. También calcularon la tasa evolutiva para las mutaciones silenciosas o sinónimas, aquellas que no modifican la secuencia aminoacídica de la proteína. Fue llamativamente alta la tasa de evolución en la zona 3 prima no codificadora de los genes Alpha (Miyata et al., 1985).

Ambas tasas evolutivas eran similares a las descriptas para los genes de las inmunoglobulinas. Es decir, los genes de interferón en la especie humana en particular y en los mamíferos en general parecen evolucionar rápidamente con una tasa de evolución comparable a la de los genes de las inmunoglobulinas (Miyata et al., 1985).

El origen de la familia de genes Alpha-IFN humanos es explicada de dos maneras diferentes.

Por un lado Miyata et al. (1985) siguiendo la teoría neutralista, proponen la existencia de un reloj molecular para los genes de interferon, es decir la acumulación de mutaciones silenciosas en las zonas codificadoras o bien mutaciones en secuencias de las zonas 5 prima y 3 prima no esenciales para la transcripción y traducción, a lo largo del tiempo geológico.

Es decir que existiría una relación lineal entre el tiempo de divergencia de dos secuencias que provienen de una ancestral y la acumulación de mutaciones en ambas secuencias.

Fue así que calcularon el origen de la familia de genes Alpha-IFN humanos a partir de un único antecesor hace 40 millones de años. Los resultados descritos por Wilson et al. (1983) ponen en duda esta fecha, pues como ya se dijo más arriba, la familia de genes Alpha está presente en todos los mamíferos, cuya radiación se estima que ocurrió hace 85 millones de años.

Por otra parte y en oposición a la hipótesis de un origen reciente para esta familia, Wilson et al. (1983) y Gillespie y Carter (1983), entre otros, proponen la existencia de evolución concertada para la familia de genes Alpha-IFN.

Es decir se habrían producido fenómenos de conversión génica o entrecruzamiento desigual pero homólogo, entre genes duplicados divergentes, o sea que ya habían acumulado mutaciones. Como consecuencia de estos fenómenos de recombinación genética, los genes de la familia tenderían a homogeneizarse, es decir a exhibir secuencias en común. Esto aumentaría artificialmente el grado de homología entre estas secuencias, y si no se toman en cuenta estos fenómenos de homogeneización, se concluiría que la divergencia entre estas secuencias fue relativamente reciente.

Este tipo de evolución, la evolución concertada fue propuesta para explicar la diversificación de otras familias multigénicas (Dover et al., 1982; Jeffreys, 1982).

Así es que la divergencia entre dos secuencias de ADN de una familia génica está determinada por el tiempo de la duplicación génica original, por la acumulación de mutaciones y por eventos de homogenización entre varias regiones de los genes duplicados (Wilson et al., 1983)

Con respecto al gen de IFN-Gamma (clase II), éste no presenta casi homología con los genes (clase I) Alpha y Beta-1-IFN (Gray et al., 1982; Gray y Goeddel, 1982).

No obstante se halló cierta homología entre ambas clases, cuando se alinearon sus secuencias aminoacídicas tomando en cuenta su estructura secundaria (De Grado et al., 1982; Epstein, 1982). Epstein (1982), encontró que esta homología se hallaba

agrupada en el tercer y cuarto exón, es decir en el extremo carboxiterminal y no en el aminoterminal.

De Grado et al. (1982) postularon un origen en común para Alpha, Beta-1 y Gamma-IFN, pues su estructura protéica secundaria y terciaria es muy similar.

Estos investigadores encontraron también una mayor homología protéica, agrupada en una zona, entre Gamma y Beta-1-IFN que entre Gamma y una secuencia consenso de Alpha-IFN. Sugirieron entonces que el gen Gamma-IFN se separó del gen Beta-1-IFN con posterioridad a la divergencia de Alpha y Beta-1-IFN a partir de la duplicación de un gen ancestral.

Luego de su separación del gen Beta-1-IFN, esta pequeña secuencia homóloga agrupada (Gamma-IFN) se habría traslocado al cromosoma 12 y se habría insertado en medio de otra secuencia que codificaría para otra proteína. Es por esto que el gen Gamma-IFN presentaría exones (3ro. y 4to.) que poseen cierta homología con los genes de clase I (Alpha y Beta-1-IFN) y exones (1ro. y 2do.) que no poseen homología.

Taya et al. (1982) también hallaron una mayor homología entre el gen Gamma-IFN y el gen Beta-1-IFN, al comparar secuencias consenso en las zonas promotoras de la transcripción así como en el extremo opuesto, en la zona cercana a la poliadenilación del ARN mensajero.

Sin embargo, toda la homología, arriba descripta, es muy limitada y podría ser el resultado de una evolución convergente (Miyata et al., 1985) y no de un origen en común con los otros genes de IFN.

Es decir la identidad de secuencias, es una condición necesaria, pero no suficiente para determinar un origen en común, o sea para determinar homologías.

#### FAMILIA MULTIGENICA DE ALPHA-IFN Y EL GEN BETA-1-IFN:

Desde los primeros trabajos publicados ubicando a los genes Alpha y Beta-IFN en el brazo corto del cromosoma 9 humano (Owerbach et al., 1981; Trent et al., 1982; Henry et al., 1984),

se ha avanzado mucho, para determinar el número y la estructura de estos genes. Es así que de 8 a 10 genes Alpha IFN descritos originalmente (Nagata et al. 1980a) se pasó a los aproximadamente 27 genes y pseudogenes que forman la familia de Alpha IFN, los cuales se encuentran agrupados formando varios grupos de ligamiento, muy próximos al gen Beta-IFN.

Habría aproximadamente 15 interferones Alpha activos (Henco et al., 1985). La familia de genes Alpha-IFN esta formada por 2 subfamilias (Capon et al. 1985; Feinstein et al. 1985; Henco et al. 1985): las subfamilias I y II.

La subfamilia I esta formada por aproximadamente 15 genes que poseen 85% o mas de homologia a nivel nucleotidico entre ellos. Codifican para un polipéptido maduro de 165 o 166 aminoácidos.

La subfamilia II esta formada por 6 o 7 genes que también poseen una alta homologia entre sí a nivel del ADN. Codifican para un polipéptido maduro de 172 aminoácidos.

Ambas subfamilias poseen un 70% de homologia a nivel nucleotídico y un 58% de homologia a nivel protéico, entre sí. Como se dijo más arriba, esta familia esta agrupada y los miembros de las dos subfamilias se intercalan entre si.

Los genes de ambas subfamilias se expresan coordinadamente como respuesta a una infección viral.

Resulta interesante destacar la presencia de ambas clases de Alpha-IFN en los bovinos (Capon et al. 1985) La subfamilia I de genes Alpha posee un número similar de miembros en ambas especies, mientras que la subfamilia II posee un mayor numero, entre 15 y 20, en los bovinos.

La subfamilia I de ambas especies, presenta más homología entre sí que con la otra subfamilia de la misma especie. Lo mismo ocurre con la subfamilia II. Es probable, entonces, que hayan ocurrido procesos de duplicación y homogenización dentro de cada subfamilia como por ejemplo entrecruzamiento desigual o algun tipo de conversión génica, como se mencionó anteriormente.

Estos fenómenos parecen apoyados por la presencia de (Henco et al., 1985):

Genes que parecen ser híbridos naturales de dos genes diferentes de Alpha-IFN. Por ejemplo IFN-Alpha-N parece ser un híbrido de IFN-Alpha-A,D y de IFN-Alpha-C,C-1 (Gren et al., 1984)

Genes con idéntica secuencia codificadora y distinta secuencia flanqueante. Por ejemplo IFN-Alpha-1 e IFN-Alpha-13 (Todokoro et al., 1984).

Pseudogenes. Uno de ellos posee un alelo funcional, Probablemente el hecho de ser una familia génica, con información redundante, tolere la aparición de formas alélicas y no alélicas, defectuosas (Bartholomew & Windass, 1989).

También se detectaron secuencias codificantes con sólo un nucleótido de diferencia, que resultaron ser genes y no alelos diferentes: Por ejemplo: IFN-Alpha A y IFN-Alpha 2 (Hotta et al., 1986; Hotta et al., 1988).

La determinación exacta del número de genes y grupos de ligamiento la familia Alpha-IFN humana aun no se ha completado y se sigue realizando en la actualidad.

Con respecto a la homología entre los miembros de estas dos clases de Alpha IFN y el gen Beta-1-IFN, se puede ilustrar así:

Los genes clase I de Alpha IFN humanos poseen más de un 85% de homología nucleotídica y de 77-94% de homología a nivel de aminoácidos, entre ellos.

Estos genes a su vez muestran un 29% aproximadamente de homología protéica con Beta-1-IFN. En la especie humana este gen es de copia única, aunque se encontró una duplicación en algunas familias (Ohlsson et al. 1985).

Por otra parte la homología es mayor, en zonas altamente conservadas de la región codificadora. Por ejemplo entre los aa 115 y 151:



Los IFN Alpha I comparten 30 de 37 residuos.

Los Alpha IFN I y el Beta IFN humanos comparten 17 de 37 aminoácidos, siendo la homología en esta zona del 46%, mayor que la homología total a nivel protéico (29%).

La primera secuencia descubierta perteneciente a la clase II, fue encontrada por azar cuando se estaba buscando secuencias homólogas al gen Beta IFN, es decir genes adicionales Beta (Capon et al., 1985).

Se hibridó una genoteca humana, con una zona codificadora del Beta IFN en condiciones de baja exigencia de homología (Capon et al. 1985). Así se recuperó una secuencia perteneciente al luego denominado Alpha 1. Luego, analizando esta secuencia

#### II

y otras homólogas de esta clase, la clase II, se encontró que poseían mayor homología con la clase I que con Beta IFN. Entre ambas clases hay 70% de homología a nivel nucleotídico y 58% a nivel aminoacídico; entre ambas clases y el gen Beta IFN hay un 48% de homología a nivel nucléico y aproximadamente 30% a nivel protéico.

Sólo hibrida una clase con la otra en condiciones de poca exigencia de homología, 70% o más de homología.

El gen Beta-1-IFN posee a su vez, un 48% de homología nucleotídica y un 29% de homología protéica con la subfamilia I.

La subfamilia de genes II presenta porcentajes similares de homología con el gen Beta-1-IFN.

Se ha descrito desequilibrio de ligamiento entre los genes Alpha y el gen Beta-1-IFN (Ohlsson et al., 1985). Esto parece ser lógico debido a la proximidad entre ambos tipos de genes (Díaz et al., 1986).

## MULTIPLICIDAD DE INTERFERONES-ALPHA:

La existencia de varias especies de IFN-Alpha en el hombre se confirmó cuando se realizó el clonado de más de 10 ADN complementarios (cADN) así como también de ADN genómicos, clones que se expresaron a nivel de proteínas en *Escherichia coli* (Nagata et al., 1980b). Por otra parte se purificaron a homogeneidad varias especies naturales de IFN-Alpha utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Revel, 1983). Estas diferentes especies de IFN-Alpha pueden ser sintetizadas por una misma célula, como se observa en cultivos de células leucémicas que derivan de una única célula, pues son una población clonal.

Los IFN-Alpha poseen un 80% o más de homología, a nivel de sus aminoácidos y un 90% de homología a nivel nucleotídico. Un único cADN puede corresponder a más de un polipéptido debido al hecho de que algunas proteínas naturales purificadas (IFNs) sólo varían en el extremo 3' carboxiterminal, teniendo menos aminoácidos. Estos interferones poseen casi todos, 166 residuos, correspondientes a la proteína madura, precedidos por un péptido señal de 23 residuos en el pre-IFN-Alpha.

Cuando se realizan corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida-SDS (condiciones desnaturalizantes) se observa que las especies naturales de IFN-Alpha varían entre 17.000 y 22.000 y hasta alguna de 26.000 de peso molecular, . La mayoría de estas proteínas no están glicosiladas (Rubinstein et al. 1981; Revel, 1983).

Hiscott y colaboradores (1984) estudiaron la expresión diferencial de los genes de interferón humanos. Utilizando diferentes inductores y diferentes tipos celulares. Los inductores fueron: el Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV, un paramixovirus), el Virus Mengo (un picornavirus), el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV, un rhabdovirus); los diferentes tipos celulares eran: células Namalwa (linfoblastoideas), células HeLa (células tumorales de cuello de útero), fibroblastos, leucocitos (linfocitos y monocitos) de sangre periférica.

Estos investigadores cuantificaron ARN mensajeros (mARN) de Alpha y Beta-1-IFN. La proporción de ambos mensajeros variaba mucho con el tipo celular. La especie predominante en fibroblastos y células HeLa inducidas fue el Beta-IFN; leucocitos de sangre periférica así como células linfoblastoideas contenían ambos tipos de transcritos.

Con respecto al IFN de tipo Alpha, en todos los tipos celulares estudiados los transcriptos predominantes eran IFN-Alpha-1, IFN-Alpha-2 y IFN-Alpha-4, mientras que los IFN-Alpha-5, IFN-Alpha-7, IFN-Alpha-8 e IFN-Alpha-14 estaban presentes en niveles 5-20 veces menores.

Por otra parte los niveles de los diferentes mRNA de Alpha-IFN también variaban mucho con el tipo celular y no parecían ser afectados por diferencias en el tipo de inducción.

Así en leucocitos inducidos con virus Sendai la proporción de mRNA IFN-Alpha-1 a Alpha-2 era de 1,7 mientras que en las células Namalwa (linfoblastoideas) inducidas de igual manera la proporción era de 0,4.

La producción de IFN medida en ensayos de actividad biológica como reducción del efecto citopático, no resultó ser proporcional a la cantidad de mRNA de IFN presentes, por ejemplo en leucocitos se detectó un nivel alto de transcriptos para Beta-1-IFN mientras que a nivel protéico casi no se registró IFN.

Goren et al., (1986 a) observaron que monocitos y linfocitos producían una mezcla diferente de subtipos Alpha-IFN. Cuando ambos tipos celulares eran inducidos de igual manera, los monocitos producían un IFN-Alpha de alto peso molecular, 26.000, similar al IFN-Alpha-8, en cambio los linfocitos producían IFN-Alpha-1 e IFN-Alpha-2.

Es decir el tipo celular es el que determina qué genes de interferón se expresarán.

Uno de los colaboradores de Goren, Rubinstein (1987) reflexionó acerca de la existencia de múltiples subtipos de IFN-Alpha llegando a la conclusión que la regulación génica es diferente en los miembros de esta familia, dependiendo del tipo de inductor y de otros parámetros que podrían reflejar la severidad de la infección viral. Por otra parte todos estos subtipos presentarían la misma actividad biológica aunque con diferente potencia (Rubinstein, 1987).

Además de la síntesis inducida de los distintos interferones, se describió también la síntesis constitutiva de estas proteínas en bazo, hígado y riñón extraídos de dadores para su transplante (Tovey et al., 1987).

Estos investigadores detectaron ARN mensajero sólo de Alpha-1-IFN y de Alpha-2-IFN en un número muy pequeño de copias en relación a las que se producen luego de una infección viral. El bajo número de copias junto con el patrón de transcripción diferente al de leucocitos de sangre periférica infectados por virus, indicarían que ésta síntesis sería constitutiva y no producto de virus no detectados o algún otro factor de crecimiento (Tovey et al., 1987).

Duc-Goiran et al. (1985) previamente hallaron IFN-Alpha y IFN-Beta en sangre de placenta humana alrededor de la 37 semana de embarazo. Estos interferones presentaban pesos moleculares mas altos que los hallados en general, entre 15 y 80 kilodaltons. Serían constitutivos, pues se hallaron en una alta frecuencia, 29 de 37 muestras, lo que descartaría una infección accidental viral, sumado al hecho de que normalmente no se detectan virus ni bacterias en ninguna de las muestras de líquido amniótico. Además si bien se informó acerca de la presencia de viriones del tipo de retrovirus, éstos normalmente no inducen la síntesis de interferón.

Por otra parte se detecta IFN de tipo Alpha desde la semana 16 de embarazo en adelante. Tal vez estos interferones intervengan en la tolerancia inmune, es decir en la protección del feto de la reacción inmune de rechazo por parte de la madre (Duc-Goiran et al., 1985).

Se han descripto IFNs raros, poco comunes, considerados de tipo Alpha-IFN.

Preble et al. (1982) descubren un IFN tipo Alpha, pero ácido-lábil, característica que no comparten el resto de los IFNs Alpha, en el suero de pacientes que sufrían lupus sistémico eritrematoso, que es una enfermedad autoinmune.

Se detectó también, la presencia de un IFN de tipo Alpha, ácido-lábil en células mononucleares de sangre periférica, cuando éstas eran estimuladas por otras células infectadas con HIV (Capobianchi et al., 1988). Este IFN era aparentemente producido por linfocitos B.

También se halló un IFN-Alpha ácido-lábil en el suero de pacientes que sufrían del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, una enfermedad del sistema inmune provocada por el mismo virus (HIV). En pacientes de esta enfermedad se hallaron

también linfocitos T que expresaban IFN-Gamma en su superficie en un número significativamente mayor que el hallado en individuos normales (Caruso et al. 1990).

Cuando se indujo la síntesis de ADN con un mitógeno y un promotor de tumores en leucocitos mononucleares de sangre humana periférica, como era de esperar el principal IFN producido fue el Gamma-IFN. Junto con él y en menor cantidad se produjo un IFN de otro tipo, distinto tanto por sus propiedades antigénicas como por sus propiedades fisicoquímicas de los otros tipos de IFN descritos (Alpha, Beta y Gamma) (Wilkinson & Morris, 1986).

El comportamiento más extraño de este IFN fue que sólo inducía una respuesta antiviral en células trisómicas para el cromosoma 21, las cuales, se sabe, son más sensibles a los interferones que otras células, debido a que producen un mayor número de receptores para Alpha y Beta-1-IFN, pues tienen el gen que codifica para la síntesis de este receptor en triple dosis.

Dianzani y colaboradores (1986), describieron con posterioridad, un nuevo tipo de IFN humano, producido a partir de sangre periférica de dadores sanos, que no era neutralizado con anticuerpos contra Alpha, Beta o Gamma IFN y de un peso molecular de aproximadamente 7.000 daltons. Esta proteína denominada por ellos: "proteína similar a IFN" (IFN like protein, ILP), sería diferente a la descrita por Wilkinson y Morris (1986), entre otras características por su peso molecular y por su mecanismo de inducción.

Resumiendo, a la diversidad presente en los individuos sanos hay que agregarle la existente en una variedad de enfermedades, especialmente en las autoinmunes.

## MULTIPLICIDAD DE INTERFERONES-BETA

El gen Beta-1-IFN se encuentra ubicado en el cromosoma 9 cerca del agrupamiento de genes Alpha-IFN (Trent et al., 1982; Díaz et al., 1986).

Los leucocitos infectados por virus producen ambos tipos de interferón, Alpha y Beta-IFN. Los fibroblastos así como otros tipos celulares sólidos, al ser infectados por virus, producen

principalmente Beta-IFN, aunque también producen Alpha-IFN en pequeña cantidad (Revel, 1983).

Sin embargo, cuando se inducen células fibroblásticas con ARN de doble cadena, como por ejemplo poly (rI).(rC), sólo se sintetiza Beta-IFN. La mayoría (90 %) de este interferón es el Beta-1-IFN y el resto (10 %) parecen ser otras formas de Beta-IFN (Revel, 1983).

Una de esas formas o especies de interferón es el IFN-Beta-2 (Weissenbach et al., 1980). En ensayos de neutralización este interferón es neutralizado tanto por anticuerpos policlonales como monoclonales, contra el IFN-Beta-1 purificado. Lo mismo ocurre cuando se realiza el ensayo de neutralización entre anticuerpos contra IFN-Beta-2 y el IFN-Beta-1. Es decir se produce una neutralización cruzada (Sehgal, 1982).

No obstante, no se produce una inmunoprecipitación cruzada con estos anticuerpos lo que confirma la diferencia antigénica entre estas dos proteínas (Revel, 1983).

Esto último se ve reforzado por el hecho de que los dos ARN mensajeros, a partir de los cuales se traducen ambas proteínas (IFN-Beta-1 e IFN-Beta-2) no presentan casi homología. No hibridan entre sí, (cuando se usa como sonda molecular sus ADN complementarios), aun en condiciones de poca exigencia de homología (Sehgal, 1982).

Es decir ambos son interferones Beta, por ser inducida su síntesis, en los fibroblastos, por los mismos inductores, por su actividad antiviral y por ser neutralizados del mismo modo. Pero se diferencian por su secuencia aminoacídica y por lo tanto nucleotídica, teniendo sólo algunos epitopes en común, lo que explicaría la ausencia de inmunoprecipitación cruzada arriba mencionada.

Si bien el IFN-Beta-1 y el IFN-Beta-2 son inducidos por ARN de doble cadena, se observó una inducción diferencial de ambos interferones cuando se inducía su síntesis con cicloheximida y actinomicina D. En estas condiciones sólo se producía el Beta-2-IFN en pequeña cantidad y no se producía el Beta-1-IFN (Revel, 1983) lo que llevó a pensar que ambos interferones cumplirían tal vez, funciones diferentes.

Desde ese entonces hasta ahora, se avanzó mucho en la investigación del IFN-Beta-2. Es así que diferentes grupos de investigación que desarrollaban distintas líneas de trabajo, no relacionadas entre sí, llegaron a la conclusión de que todos ellos estaban analizando la misma molécula: el IFN-Beta-2 (Van Snick, 1990). Es decir todos habían clonado y purificado la misma proteína, que parecía tener múltiples efectos, siendo muy pleiotrópica.

La nomenclatura de esta molécula ahora llamada IL-6 o sea interleuquina 6 era (Van Snick, 1990):

IFN-Beta-2	26 K	BSF-2	PCT-GF	IL-HP1
HPGF	HSF	CDF	IL-6	

26 K      Es la proteína de 26 kd sintetizada a partir del ARN mensajero de 1,3 kbases de Beta-2-IFN.

BSF-2      Es el factor de estimulación de los linfocitos B, que induce la producción de inmunoglobulinas en ellos.

PCT-GF      Es es el factor de crecimiento de plasmacitomas purificados a partir de sobrenadantes de cultivos de macrófagos en ratones.

HPGF      Es el factor de crecimiento de hibridomas o plasmacitomas, humano. Cumple la misma función y presenta homología a nivel del ADN, con el PCT-GF de ratón.

IL-HP1      Es el factor de crecimiento de hibridoma, purificado a partir de ciertas líneas celulares T, en ratones.

HSF      Es el factor estimulador de los hepatocitos, producido por monocitos.

CDF      Es el factor de diferenciación de las células T citotóxicas.

El hallazgo de que una sola molécula era responsable de todas estas funciones, es decir que poseía un efecto pleiotrópico, simplificó mucho la nomenclatura usada (Van Snick, 1990).

El IFN-Beta-2, es decir la IL-6, es producido por una gran variedad de células: fibroblastos, células endoteliales, monocitos o macrófagos, líneas de células T y diferentes líneas celulares tumorales entre otras.

Cumple en ellas diferentes funciones, como lo ilustra la nomenclatura arriba presentada.

Las infecciones, daños a los tejidos, tumores malignos y una diversidad de desordenes inmunológicos desencadenan una reacción del organismo que se denomina: respuesta de la fase aguda (Van Snick, 1990). Estos tejidos dañados, producen la liberación de IL-6. Esta actúa como:

- Factor de diferenciación y de crecimiento de los linfocitos T y de células precursoras hematopoyéticas.
- Induce la liberación de la hormona adrenocorticotrópica por parte de la glándula pituitaria.
- Estimula la síntesis de proteína de la fase aguda en el hígado
- Estimula también la producción de anticuerpos.

La IL-6 sólo en ciertas circunstancias actúa como interferón, (por ejemplo como antiviral), no siendo ésta su única función.

May et al., (1988) propusieron como hipótesis que la interleuquina-6 sufriría modificaciones posteriores a su traducción que determinarían diferentes conformaciones moleculares. Sólo algunas de estas conformaciones funcionarían como interferón. Esto explicaría las contradicciones registradas en la bibliografía, acerca de la actividad antiviral del IFN-Beta-2, pues no siempre fue posible detectarla.

La IL-6 se une a un receptor específico en la superficie celular, al igual que los interferones. Este receptor es diferente del receptor para Alpha y Beta-1-IFN y del receptor para Gamma-IFN (Yamasaki et al., 1988).



Como era de esperar, los receptores para IL-6 se encuentran en un gran número de células diferentes.

El gen de la IL-6 se encuentra en el cromosoma 7 humano (Sehgal et al., 1986), como ya había sido descrito para Beta-IFN-2, en la banda 7p21 (Van Snick, 1990). No se encuentra por lo tanto, ligado al gen de Beta-1-IFN, el cual se encuentra en el cromosoma 9.

Posee 4 intrones, 3 sitios de iniciación de la transcripción y 3 secuencias promotoras del tipo TATA. Esto podría explicar el hallazgo de múltiples mecanismos de regulación de este gen (Van Snick, 1990).

Además del IFN-Beta-2 se han descrito otros interferones de tipo Beta, IFN-Beta-3, 4 y 5. (Slate et al., 1981; Sehgal, 1982; Revel, 1983).

Los genes de estos interferones estarían ubicados en los cromosomas 2 (May et al., 1985; Sagar et al., 1985) y 5 (Revel, 1983). Presentan homología a nivel nucleotídico y similitudes conformacionales a nivel protéico. Si bien poseen actividad antiviral, es probable que intervengan al igual que el IFN-Beta-2 en otros procesos fisiológicos como la diferenciación celular.

#### EL GEN GAMMA INTERFERON:

Como se dijo anteriormente, este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 12 (Trent et al., 1982; Naylor et al., 1983). Es decir no está ligado a los genes Alpha y Beta-1-IFN, que se encuentran en el cromosoma 9 (Trent et al., 1982).

El gen de Gamma-IFN, o sea el del IFN clase II, es un gen de copia única que posee 3 intrones (Gray & Goeddel, 1982) a diferencia de los genes de Alpha y Beta-1-IFN, o sea los de clase I, que no poseen intrones.

Los cuatro exones, es decir la secuencia que se expresa en el ARN mensajero, codifican para un polipéptido de 166 aminoácidos, siendo muchos de estos básicos. Esto podría explicar la inestabilidad que posee el IFM-Gamma en soluciones de pH ácido (Revel, 1983).

Los 20 primeros aminoácidos, altamente hidrofóbicos, en el extremo aminoterminal, forman el péptido señal de anclaje a la membrana celular; los 146 aminoácidos restantes forman la proteína madura que se secreta al exterior de la célula (Gray & Goeddel, 1982). Esto último sucede también con los interferones de clase I, los que también poseen un péptido señal.

No obstante, existe poca homología entre ambas clases de interferones. Al comparar Gamma con 7 u 8 Alpha-IFNs diferentes se observó que la homología se encontraba restringida a dos zonas: la zona de clivaje del péptido señal, con 5 aminoácidos en común y una zona más distante, hacia el extremo carboxílico, con 4 aminoácidos seguidos en común (Gray et al., 1982).

Epstein (1982) describió una mayor homología si se tomaban en cuenta aminoácidos aislados en la misma posición o en una posición muy cercana. Estos residuos estarían ubicados en la mitad carboxílica de la proteína, en zonas importantes para la conformación espacial protéica.

Según De Grado et al. (1982) esta conformación secundaria y terciaria es similar en los tres tipos de interferón, Alpha, Beta y Gamma.

No obstante, a diferencia de los Alpha-IFNs, la estructura terciaria de Gamma-IFN no depende de la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Pestka et al. 1987).

La zona 5 prima, promotora de la transcripción, que posee una gran homología cuando se comparan Alpha y Beta-1-IFN (clase I), no presenta homología con la zona promotora del gen Gamma-IFN (clase II). Esto parece ser coherente con el hecho de que son diferentes los inductores que activan a los genes de clase I y de clase II (Gray & Goeddel, 1982).

Al igual que los Alpha-IFNs, el Gamma-IFN natural posee heterogeneidad en el extremo carboxilo, coexistiendo proteínas con la misma secuencia, pero de diferente largo. Es decir, aparecen formas truncadas en el extremo carboxilo, tal vez productos de digestión proteolítica durante o luego de la secreción del Gamma-IFN (Rinderknecht et al., 1984; Pestka et al., 1987).

Parece haber más de una proteína Gamma-IFN, con diferentes pesos moleculares 15.500-17.000, 20.000 y 25.000. Estas diferencias en el peso, parecen deberse a un diferente grado de glicosilación, o sea unión a azúcares, de una única especie proteica de Gamma-IFN (Pestka et al., 1987).

Por ejemplo, Rinderknecht et al. (1984), describieron la presencia de dos especies activas de IFN-Gamma de 20.000 y 25.000 daltons cada una de ellas, en ADN de sangre periférica. Ambas especies tenían idéntica secuencia aminoacídica, pero distinto número de moléculas oligosacáridas unidas a ellas y por eso era diferente su peso molecular.

El IFN-Gamma recombinante también exhibe diferentes grados de glicosilación, así como un procesamiento proteolítico, es decir la digestión del Gamma-IFN recombinante en dos zonas específicas de la molécula proteica (Curling et al., 1990). También aquí aparecen proteínas truncadas en el extremo carboxílico.

Los oligosacáridos arriba mencionados, no serían necesarios para la actividad antiviral o antiproliferativa de del IFN-Gamma, como lo manifiesta el hecho de que el IFN-Gamma recombinante producido por *Escherichia coli* y que no se encuentra unido a azúcares es igualmente activo. Sin embargo el IFN-Gamma unido a oligosacáridos podría ser más estable y menos susceptible a la degradación proteolítica (Rinderknecht et al., 1984) aumentando entonces, su vida media.

El Beta-1-IFN también se encuentra unido a carbohidratos, no así la mayoría de los Alpha-IFNs.

En condiciones fisiológicas el Gamma-IFN se encuentra como dímero con peso molecular de 40.000 a 60.000. No obstante la unidad funcional, medida en ensayos de actividad biológica antiviral, parece ser un tetrámero, a diferencia de los Alpha-IFNs cuya unidad funcional sería un monómero y de Beta-1-IFN, cuya unidad funcional parece ser un dímero (Pestka et al., 1983).

La actividad específica del IFN-Gamma, medida en ensayos  
7  
antivirales resultó ser de  $1-25 \times 10^7$  unidades por miligramo de proteína, mientras que la actividad específica de los Alpha-IFNs  
8 8  
era de  $2-4 \times 10^8$  y la de Beta-1-IFN de  $2-5 \times 10^8$  unidades por

miligramo de proteína (Pestka et al., 1987). Esto puede tener relación con un diferente mecanismo de acción molecular (Revel, 1983).

Veamos ahora algunos conceptos sobre polimorfismo del ADN, en particular sobre polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.

#### POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN:

El polimorfismo fue clásicamente definido como la existencia en una población de dos o más variantes genéticas (cromosómicas o alélicas), es decir de dos o más formas diferentes heredables, tal que la forma más frecuente no excediese el 95 o el 99%, de acuerdo al criterio que se eligiese.

Dobzhansky (1980) propuso cuales serían los mecanismos genéticos responsables del origen y mantenimiento de los polimorfismos:

- Un polimorfismo puede ser equilibrado de modo que las variantes se mantengan con frecuencias de equilibrio más o menos estables, bajo presión de selección.
- Un polimorfismo transitorio puede manifestarse como una etapa intermedia entre el origen de una variante útil surgida por mutación y su fijación en la población (con una frecuencia mayor a 95 o 99%) también en este caso debido a la selección natural.
- Por último las variantes genéticas pueden ser neutras, es decir no presentan ninguna ventaja adaptativa superior. o inferior para los individuos portadores. Este parece ser el caso de la gran mayoría de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) descriptos.

Es así que las variantes polimórficas arriba mencionadas (RFLPs) se encuentran comúnmente a una distancia de 2-20 kilobases (kb) de la secuencia que presenta homología con la sonda molecular utilizada, en zonas no codificadoras. Es decir

estos alelos polimórficos no se expresan a nivel del ARN mensajero o a nivel de la proteína. No sufrirían presión de selección y por lo tanto se acumularían las mutaciones, en los mismos, a lo largo del tiempo (Wright, 1986).

Ahora, veamos que son los RFLP:

Si el ADN de una determinada especie, por ejemplo la humana, se digiere con una enzima de restricción, se corre en electroforesis en un gel, se transfiere a una membrana y se hibrida a una sonda molecular marcada, se observa un determinado patrón de bandas.

La variabilidad existente en las poblaciones puede manifestarse en la pérdida o en la aparición de sitios nuevos de reconocimiento para la enzima en cuestión, pudiendo alterarse entonces el patrón de bandas observado.

Se observa entonces un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), el cual se describe para una combinación dada de enzima de restricción-sonda molecular de hibridación. Cada fragmento o banda está limitado por dos sitios de restricción. Si hubiera sitios internos y la digestión fuera completa, el fragmento se subdividiría a su vez en más fragmentos.

Sólo se detectarían aquellas sustituciones que modificando el sitio de reconocimiento (secuencia de 4 o 6 nucleótidos generalmente) de una enzima de restricción, modifiquen el patrón de bandas observable.

Aproximadamente 1 base de cada 250-500 difiere entre 2 cromosomas cualesquiera en una población (Gusella, 1986). Estos polimorfismos a nivel de la secuencia del ADN se deben principalmente a sustituciones nucleotídicas únicas.

Una de las utilidades, del polimorfismo genético, es que permite al investigador distinguir entre las dos copias u alelos de un locus en el genoma humano (Gusella, 1986).

De acuerdo con Skolnick & White (1982) hay 2 tipos esenciales de polimorfismo:

- Polimorfismo de sustitución de pares de bases:  
Se debe a la sustitución de un par de bases o pequeñas deleciones o inserciones de secuencias, que alteren el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción.
  
- Polimorfismo de reordenamientos cromosómicos:  
Se origina a partir de reordenamientos cromosómicos tales como grandes deleciones o grandes inserciones de secuencias que alteren el patrón de bandas o fragmentos, sin alterar el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción.

Las inserciones de secuencias que no contengan sitios de restricción de la enzima en cuestión, aumentarán la longitud del fragmento de restricción (banda). Las inserciones que contengan sitios de restricción disminuirán, aunque no necesariamente, la longitud del fragmento (Botstein et al., 1980).

Las deleciones de secuencias completamente internas del fragmento de restricción, disminuirán la longitud del fragmento, mientras que las deleciones que sólo abarquen uno de los dos sitios de restricción (que limitan a cada fragmento o banda), aumentarán o disminuirán la longitud del fragmento dependiendo del tamaño de la deleción y de la ubicación del sitio de restricción más cercano (Botstein et al., 1980).

Algunas estrategias útiles para detectar RFLPs (Skolnick & White, 1982):

Para detectar polimorfismos debidos a la sustitución de pares de bases, es conveniente digerir diferentes alícuotas de ADN con un gran número de enzimas de restricción, a los efectos de "barrer" la mayor cantidad de secuencias posibles. Esto es porque cada enzima reconoce una secuencia de nucleótidos diferente.

Por el contrario, la estrategia utilizada para hallar polimorfismos originados por reordenamientos cromosómicos, no requiere de un gran número de enzimas, pues las inserciones y deleciones grandes, serán detectadas por igual, por diferentes enzimas de restricción, cuyos sitios se encuentren en la zona reordenada. Las sondas moleculares largas tienen una probabilidad mayor de detectar deleciones o inserciones, que las sondas cortas.

Convendría entonces usar enzimas que digieran frecuentemente el ADN, (aquellas que reconocen un sitio de 4 nucleótidos) y otras que lo digieran menos frecuentemente (aquellas que reconocen un sitio de 6 nucleótidos), para obtener distintos tamaños de banda. De esta manera y con pocas enzimas, se podrían detectar cambios en el tamaño de las bandas, debidos a inserciones o deleciones.

También se pueden utilizar enzimas que reconozcan secuencias que posean AT y otras que posean CG, debido a que AT es más frecuente que CG, en el genoma humano; de esta manera también se logran fragmento de distinta longitud.

En todos los casos es importante realizar una digestión completa y no parcial del ADN a analizar. Pues si no, se producen artificios de la técnica, como por ejemplo la aparición de bandas u "alelos" que en realidad no lo son. Estas bandas desaparecen luego de una digestión exhaustiva del ADN.

Otro factor que debe considerarse es la aparición o desaparición de bandas en un único individuo debido a una señal de hibridación tenue, o debido a mucho "ruido" de fondo que no permite una correcta detección de la señal.

También pueden, eventualmente, aparecer bandas nuevas, por contaminación de la muestra; otro motivo puede ser una desnaturalización incompleta de un filtro de ADN que fue previamente hibridado y por lo tanto quedó parcialmente la sonda molecular unida al filtro, emitiendo una señal débil, cuando se lo volvió a hibridar.

Con respecto a cuales son las enzimas más convenientes para utilizar en la búsqueda de polimorfismo del ADN, resulta interesante destacar que la gran mayoría de los RFLPs que se encuentran presentes en la base de datos de RFLP's del Human Gene Mapping Workshop 9.5 (First interim, Human Gene Mapping Workshop, New Haven 1988), fueron encontrados utilizando como enzimas de restricción a Taq I, Msp I/Hpa II.

Msp I reconoce la secuencia C(C o Cmet)GG.  
Hpa II reconoce la secuencia CCGG (sin metilar ambas C)  
Taq I reconoce la secuencia TCGA

Estos tres sitios de reconocimiento poseen el dímero CG que tendría una tasa de mutación elevada por la presencia de 5-metilcitosina la cual muta a timidina (transición C --> T) (Skolnick and White 1982; Gusella, 1986). Es por esto que se utilizan Taq I y Msp I para hallar polimorfismos nuevos. Por otra parte usando Msp I y Hpa II se puede detectar diferencias en los patrones de metilación.

La probabilidad de encontrar un RFLP es en parte, función del número de enzimas utilizadas y del número de individuos no emparentados analizados (Gusella, 1986).

En relación al número de individuos a analizar, es decir al tamaño de la muestra, Skolnick & White (1982) determinaron que con nueve individuos se podría detectar los polimorfismos más útiles, es decir aquellos cuyos alelos más raros tuviesen una frecuencia mayor a 0.15. Por el contrario es poco probable encontrar las variantes con frecuencia menor a 0.05 y se observarían unas pocas de las variantes con frecuencias entre 0.05 y 0.15.

Es decir 9 sería el tamaño de la muestra si sólo se quieren encontrar alelos con frecuencia mayor a 0,15.

Las sondas moleculares que se utilizan para encontrar polimorfismos pueden ser (Gusella, 1986):

- Genes que se obtienen a partir de bibliotecas genómicas. Estas bibliotecas poseen secuencias de todo el genoma, por lo tanto estarán allí representadas, secuencias únicas, con pocas copias, medianamente repetidas y altamente repetidas; éstas a su vez pueden ser secuencias codificadoras o no codificadoras.
  
- ADN complementario que se copia a partir del ARN mensajero. Estas sondas pueden obtenerse de bibliotecas de ADN complementario. Estas secuencias que se expresan a nivel del mensajero, representan del 2 al 5 % del ADN total genómico.
  
- ADN anónimo de copia única, se lo denomina así pues no se sabe si posee información para algún mensaje; obtenido a partir de bibliotecas genómicas. También pueden construirse bibliotecas cromosómicas a partir de líneas



celulares somáticas híbridas entre humano y ratón, por ejemplo, que contienen un único cromosoma humano.

- Secuencias repetidas de ADN también se obtienen a partir de bibliotecas genómicas.

#### Localización de genes responsables de enfermedades humanas:

9

Como se mencionó más atrás sólo 2 a 5% de las 3.10 pares de bases del genoma humano contiene secuencias codificadoras, esto representa aproximadamente 100.000 genes. Varios de estos genes forman familias multigénicas, las cuales a veces están agrupadas y cuyos miembros están estructural y o funcionalmente relacionados (Landegren et al., 1988; Wright, 1986).

Estas secuencias se distribuyen en los 24 cromosomas, 22 autosómicos y 2 cromosomas sexuales X e Y. Como la especie humana es diploide, cada gen se encuentra en dos copias, una en cada cromosoma.

Cuando alguno o algunos de los 100.000 genes humanos presenta un defecto importante heredable, en las células germinales, o bien somático, en células no germinales, y tomando en cuenta el grado de penetración del mismo y la interacción con su medio ambiente, se producirá una enfermedad genética.

Las enfermedades genéticas humanas pueden agruparse de acuerdo al grado de conocimiento que de ellas se tiene, por el tipo de diagnóstico:

##### 1- Diagnóstico directo:

Es necesario demostrar una anomalía específica en un paciente a nivel del producto génico (ARN mensajero, proteína). Son en general enfermedades o desordenes monogénicos, de herencia mendeliana: autosómicas dominantes, autosómicas recesivas o bien recesivas ligadas al cromosoma sexual X. En todos estos casos se descubrió la proteína defectuosa responsable de la enfermedad y gracias a ella y mediante técnicas de ingeniería genética se pudo acceder al gen responsable.

Se ha determinado con mayor o menor precisión el producto génico de aproximadamente 400 desordenes monogénicos humanos (Landegren et al., 1988; Baird et al., 1988).

En algunos casos como el de la anemia falciforme u algunas talasemias, la secuencia alterada responsable de la enfermedad también afecta un sitio de restricción produciendo en consecuencia un polimorfismo (RFLP). El alelo defectuoso da una banda diferente (Orkin, 1984). En otros casos, como por ejemplo la Alpha-talasemia o la deficiencia en antitrombina III, la zona defectuosa presenta una delección que puede observarse también como un polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (Gusella, 1986).

Como ya se dijo, además de las mutaciones o defectos heredables, existen evidencias de la aparición de mutaciones somáticas que aumentarían la susceptibilidad a ciertas enfermedades asociadas con el envejecimiento tales como el cáncer y algunas degeneraciones neuronales y cardiovasculares (Weiss & Marshall, 1984).

6

La tasa de mutación germinal humana es aproximadamente 10 gametas por locus, por generación; la tasa de mutación somática, medida in vitro es algunos ordenes de magnitud superior (Wright, 1986). Esto puede deberse a errores de copia durante la replicación del ADN que pueden conducir a sustituciones de bases que a su vez produzcan un corrimiento del marco de lectura, etc. También las inserciones y delecciones pueden producir un corrimiento en el marco de lectura.

Se supone que las enfermedades autosómicas dominantes o recesivas ligadas al cromosoma X que interfieren con la reproducción de los individuos portadores de las mismas, es probable que se mantengan en la población debido a la aparición de eventos mutacionales nuevos.

## 2- Diagnostico indirecto:

Se realiza en enfermedades de las que se sabe que tienen una base genética, es decir son heredables, pero se desconoce la proteína o mensaje defectuoso. En esta clase se encuentran la mayoría de las enfermedades genéticas humanas. El diagnóstico puede realizarse a nivel del ADN, mediante ligamiento genético a un marcador no involucrado en la enfermedad. Cuanto más polimórfico sea este marcador mas útil será en el diagnóstico.

Como se explicó anteriormente los desórdenes monogenéticos se pueden dividir en los que muestran un fenotipo dominante y aquellos que muestran un fenotipo recesivo.

Las enfermedades de herencia recesiva son debidas en muchos casos a deficiencias enzimáticas (Gusella, 1986). Las enfermedades de herencia dominante parecen tener relación con alteraciones en proteínas estructurales, receptores, genes reguladores y en menor medida con deficiencias enzimáticas.

Esta distinción entre fenotipos dominantes y recesivos es un poco artificial debido a que en muchos casos, los individuos homocigotas para un fenotipo dominante muestran efectos más severos de la enfermedad que los individuos heterocigotas. Es decir parece haber un efecto de dosis. Del mismo modo, en las enfermedades recesivas, a veces, gracias a pruebas bioquímicas se pueden distinguir los tres fenotipos posibles para un sistema dialéctico: homocigotas defectuosos, heterocigotas con un alelo defectuoso y uno normal y homocigotas normales (Gusella, 1986).

Es decir, en los dos casos anteriores (enfermedades dominantes y recesivas) la herencia es en realidad, codominante. Este es el caso de la mayoría de los RFLPs, cuya herencia es también codominante; en algunos casos la herencia parece ser dominante, es decir se habla de presencia versus ausencia de bandas. Se considera un fenotipo dominante cuando la banda está presente y recesivo cuando está ausente.

Si el alelo defectuoso y un alelo determinado del locus marcador (que exhibe el RFLP) se encuentran en diferentes cromosomas o lo suficientemente lejos en un mismo cromosoma, se transmitirán a la progenie en forma independiente y por lo tanto no mostrarán correlación en la herencia. Si por el contrario se encuentran ubicados cercanos en un mismo cromosoma, ambos alelos se transmitirán en forma no independiente y se observa entonces, una correlación en su herencia.

Conocer la ubicación cromosómica del marcador genético permitirá inferir la ubicación del locus defectuoso, pues deberá estar próximo a éste.

El análisis de ligamiento genético arriba mencionado se basa en el intercambio de información genética o recombinación entre el par de cromosomas homólogos, uno de origen paterno y el otro de origen materno, que se produce durante la división meiótica

que dará lugar a la formación de gametas o células germinales. Cuánto más cerca estén los dos loci, el marcador y el presunto locus defectuoso, menor será la probabilidad de recombinación entre ellos.

La distancia genética entre dos marcadores se mide en centimorgans (cM.). Un centimorgan representa una probabilidad 1 en 100 (1%) de recombinación por generación. Esta distancia genética de 1 cM corresponde a una distancia física de aproximadamente 1.000.000 de pares de bases de ADN.

Esta relación entre el mapa genético y el mapa físico no siempre es lineal; es decir 1% de recombinación puede corresponder a menos o a más de 1.000.000 pares de bases, debido a la existencia de sitios preferenciales de recombinación (Kobori et al., 1986).

Por otra parte el genoma humano posee  $3 \cdot 10^9$  pares de bases que equivalen a 3300 cM (centiMorgans), dado que 1 cM = 1% de recombinación, que a su vez representa  $10^6$  pares de bases. Si el locus polimórfico que exhibe el RFLP se encuentra dentro de los 10 cM a un lado o al otro de la zona defectuosa, entonces, este locus defectuoso podrá probablemente ser ubicado. Es decir que con aproximadamente 150 marcadores genéticos dispersos a lo largo del genoma se podría construir un mapa de ligamiento genético (Botstein et al., 1980).

En la última década muchos genes, secuencias repetidas y secuencias únicas de ADN han sido clonados pero aún se está lejos de la concreción del mapa humano de ligamiento genético arriba propuesto (Claiborne Stephens et al., 1990).

Botstein et al. (1980) describieron una manera de medir el grado de polimorfismo de los RFLPs, el Contenido de Información Polimórfica (PIC) de un gen o locus como:

$$1 \quad \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \quad \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Siendo  $p$  = frecuencia alelica

De esta formula se deduce que cuanto mayor sea el número de alelos de un locus y mayor sea la uniformidad de las frecuencias alélicas, mayor sera el valor de este indice, es decir será más informativo, siendo entonces mejor "candidato" para encontrar ligamiento con algun otro gen responsable de una enfermedad. Se considera que:

PIC > 0.5 es altamente informativo

0.5 > PIC > 0.25 es razonablemente informativo

PIC < 0.25 es levemente informativo

Los loci mas altamente polimórficos descritos con valores de PIC > 0.97, son los de HLA-A, HLA-B y los minisatelites de secuencias de ADN repetidas en tandem que son regiones hipervariables (Jeffreys et al., 1985.(a)). Usando como sonda molecular los minisatelites se pueden construir "huellas digitales" individuales con el ADN humano (Jeffreys et al., 1985b).

Por otra parte, el concepto de PIC fue originalmente descripto para loci codominantes autosómicos (Botstein et al., 1980) y luego fue extendido por Willard et al. (1985) a los loci codominantes ligados al cromosoma X, aclarando que en este caso era idéntico a la frecuencia de heterocigotas en las hembras. Para aquellos sistemas que son dominantes (presencia vs. ausencia de bandas) la determinación del PIC supone que el investigador pueda distinguir heterocigotas de homocigotas por medio de la intensidad relativa de las bandas. Si esto no pudiese realizarse el PIC seria en realidad una sobreestimación del contenido polimórfico. (Pearson et al., 1987).

En las enfermedades genéticas cuya causa se desconoce, los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción juegan entonces, un papel clave.

En estos casos, para determinar si la causa de la enfermedad reside en un gen se pueden realizar estudios de ligamiento genético, para determinar la ubicación cromosómica del mismo. Esto se lleva a cabo buscando otra característica genética o marcador genético que se herede conjuntamente con el alelo defectuoso responsable de la enfermedad.

La posibilidad de aplicar el análisis de ligamiento genético depende de cuan informativo sea el marcador, o sea de su contenido de información polimórfica (PIC) (Botstein et al., 1980), arriba descrito. Por otra parte la precisión del análisis dependerá de la ubicación, es decir de la proximidad del marcador al locus defectuoso (Gusella, 1986).

Además según Gusella (1986), es muy importante determinar la heterogeneidad no alélica, es decir la posibilidad de la existencia de un segundo locus en juego, responsable también de la enfermedad. Esta posibilidad debe ser eliminada si se quiere aplicar análisis de ligamiento genético, pues de lo contrario se puede llegar a falsas conclusiones en el diagnóstico de esta enfermedad.

Esto significa que, tomando todas las precauciones anteriores, se pueden realizar predicciones en familias afectadas por una enfermedad genética, aun cuando no se conozca la naturaleza de la mutación o ni siquiera la identidad del gen o proteína involucrados. Como ya se dijo, esto puede llevarse a cabo por análisis de ligamiento a marcadores genéticos.

El proceso de identificar y aislar un gen, sin que se sepa para que proteína o ARN codifica, basándose en su ubicación cromosómica se denomina "genética inversa" (Orkin, 1986).

Primero se establece la posición cromosómica aproximada del gen y luego se identifica un gen dentro de esta zona cuyas mutaciones se correlacionen estrictamente con la enfermedad. Es decir se identifica un marcador genético cuyos alelos se hereden junto con el candidato a gen defectuoso.

Para ello se puede utilizar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) en combinación con métodos citogenéticos. Se puede así ubicar al gen de interés en el mapa cromosómico, con una resolución de hasta varios millones de pares de bases.

Orkin (1986) consideró que la identificación de un ARN transcripto o su ADN complementario y el hallazgo de una rotura o desorganización del mismo, es decir una expresión alterada en una enfermedad, es suficiente como para suponer que se encontró el locus defectuoso.

Gracias a la "genética inversa" se determinaron, entre otros, los genes de las siguientes enfermedades: la distrofia muscular de Duchenne, la granulomatosis crónica, el retinoblastoma y la fibrosis quística.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad ligada al cromosoma X que se caracteriza por un debilitamiento u agotamiento progresivo de los músculos. Afecta aproximadamente 1 de cada 3.000 hombres. Mediante el análisis de ligamiento usando RFLPs por un lado y las anomalías cromosómicas que se detectaron citológicamente por otro, se pudo asignar el gen defectuoso a la banda Xp21 en el brazo corto del cromosoma sexual X. Las translocaciones X-autosómicas serían responsables de la aparición de esta enfermedad en las mujeres (Orkin, 1986).

Las anomalías cromosómicas arriba mencionadas son entonces, deleciones y translocaciones que involucran al cromosoma X y a un cromosoma autosómico. Estudios de segregación en familias, determinaron que las deleciones estaban estrechamente ligadas a la enfermedad (Orkin, 1986; Koenig et al., 1989).

Se pudo correlacionar polimorfismos del ADN para las endonucleasas Pst I y Taq I, que involucraban una deleción del exon 51 de este largo gen (Laing et al., 1990), con esta enfermedad. El gen posee más de 2 millones de pares de bases (Innis & Gelfand, 1990).

Otro ejemplo de "genética inversa" es el caso de la fibrosis quística, que es una enfermedad muy común en las poblaciones de origen caucásico. Se trata de una disfunción pancreática que se detecta prenatalmente por el descenso de dos peptidasas, la  $\alpha$ -glutamil transpeptidasa y la aminopeptidasa M en el líquido amniótico proveniente de fetos afectados por fibrosis quística.

Se ha podido llegar al gen gracias a la presencia de un polimorfismo del ADN (RFLP) estrechamente asociado a esta enfermedad. Se hallaron pues, marcadores genéticos flanqueantes al gen defectuoso, responsable de la enfermedad en el cromosoma 7.

Gracias a la información obtenida por el análisis de ligamiento genético se llegó a la conclusión que el gen responsable de la fibrosis quística, se encuentra entre las zonas 7q31 y 7q32. (Duncan et al., 1988)

Por último, otro ejemplo interesante de la aplicación de la "genética inversa" es el del retinoblastoma. El retinoblastoma es una enfermedad maligna rara - se desarrolla un tumor maligno en la retina - que se produce en la infancia, generalmente antes de los 5 años de edad. Tiene una alta tasa de curación, lo que permite detectar tempranamente la aparición de descendientes afectados en algunos de los sobrevivientes de esta enfermedad (Knudson, 1985).

Se ha asociado a esta enfermedad la delección de una banda cromosómica, la 13q14, presente en el brazo largo del cromosoma 13. El gen *rb* (retinoblastoma) se encuentra en esta zona. Se han encontrado una forma heredable autosómica y una forma esporádica, no heredable, debida a una mutación somática (Orkin, 1986). Ambos tipos de mutaciones afectan al mismo gen.

Se aisló y clonó una secuencia que detectaba delecciones en la zona de interés del cromosoma 13 y se encontró que un fragmento inmediatamente vecino a esta secuencia hibridaba con un ARN de 4,7 kb. Este ARN se encontraba en baja frecuencia en tejidos normales, incluyendo la retina, pero estaba ausente de la zona tumoral retinal.

A partir de este ARN se aisló el ADN codificante genómico de más de 70 kb de largo, en donde se encuentra el gen defectuoso (Orkin, 1986).

También se descubrió un marcador genético estrechamente ligado al gen defectuoso, el gen de la esterasa D. Los resultados observados con los RFLPs sugerirían la existencia de fenómenos tales como delecciones o no disyunciones mitóticas, es decir no separación de las dos cromátidas hermanas en la división celular con la consiguiente pérdida de un cromosoma en una de las dos células hijas. Esto llevaría a un estado de hemicigosis de parte o todo el cromosoma, en el tumor.

Por el contrario una mutación somática o una recombinación mitótica, que también se cree que puede ocurrir, conduciría a la homocigosis, en parte, de ambos cromosomas homólogos. La recombinación mitótica es un fenómeno raro que consiste en el intercambio de información genética entre dos cromosomas homólogos durante la división mitótica. Este intercambio sólo ocurre normalmente, en la división meiótica que dará origen a las gametas.



Es así que el estudio del marcador genético estrechamente ligado al locus defectuoso, el gen de la esterasa D, más arriba mencionado, determinó la existencia de un mosaico, pues coexistían en un paciente de esta enfermedad: en los tejidos normales cromosomas heterocigotas para este locus (esterasa D) y en las células tumorales de la retina, cromosomas homocigotas para el mismo locus (Weinberg, 1989). Esto podría deberse a una mutación somática o a una recombinación mitótica.

Se propuso (Knudson, 1985) que la secuencia alterada sería en su forma normal un gen supresor de tumores que al estar en heterocigocis, determina el desarrollo normal celular. Es decir es dominante. Si por alguno de los mecanismos anteriores este alelo se pierde o muta hacia la forma alterada, y el otro alelo en el cromosoma homólogo ya estaba alterado, entonces se desarrolla un tumor en la retina. Esto indicaría una herencia autosómica recesiva, pues se necesita que el gen alterado esté en doble dosis para el desarrollo del tumor.

Es decir que bajo circunstancias normales, debe producirse una mutación deletérea en uno de los cromosomas y luego eliminarse el otro alelo normal, en el cromosoma homólogo por los mecanismos previamente mencionado (mutación somática, no disyunción mitótica, recombinación mitótica). La baja probabilidad con la que se darían estos dos eventos simultáneamente, explicaría porque sólo rara vez se observa un desarrollo bilateral de retinoblastomas, es decir la aparición en un mismo individuo de dos tumores a la vez.

Resumiendo, en todos los casos anteriores, distrofia muscular de Duchenne, fibrosis quística y retinoblastoma, el aporte realizado por los polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción en dilucidar la ubicación y la identificación del gen defectuoso, fue fundamental.

Resulta interesante destacar el aporte a la identificación génica, de la citogenética, gracias al bandeo cromosómico y a la observación citológica de grandes reordenamientos como deleciones y translocaciones como se vió en los casos del retinoblastoma y la distrofia muscular de Duchenne.

En todos estos casos, estos reordenamientos cromosómicos se ponían de manifiesto también, alterando el patrón de bandas de los polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción.

Los polimorfismos del ADN (RFLP) pueden por lo tanto, utilizarse para determinar el origen de anomalías tales como trisomías, monosomías, deleciones y translocaciones, es decir grandes alteraciones numéricas y estructurales, comparando los patrones de digestión normales y alterados (Gusella, 1986).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y cancer:

Si bien la etiología de todas las formas de cáncer, aún no es conocida, se puede decir, en general, que el cáncer es una enfermedad genética (Weiss & Marshall, 1984). El ADN alterado responsable de la transformación oncogénica puede ser el resultado de una o más mutaciones somáticas, no heredables, o bien germinales, heredables. Un mismo tipo de cáncer puede ser heredable o no heredable, en cuyo caso los mismos genes se encuentran alterados de la misma manera. Este es el caso del retinoblastoma, donde el 35 a 40% de los casos es heredable y el resto no, debido a mutaciones somáticas (Knudson, 1985).

Los oncogenes son formas alteradas de genes normales, llamados protooncogenes, que presentan alteraciones en su estructura o en su expresión. Como consecuencia de ello, se vuelven oncogénicos y de ahí sale su nombre. Muchos de estos oncogenes presentan una gran homología con genes presentes en retrovirus oncogénicos. Se cree que estos genes serían de origen celular y se insertaron en los retrovirus, adquiriendo en muchos casos mutaciones (Bishop, 1987). La nomenclatura es c-oncogene para las secuencias encontradas en el genoma humano normal, y v-oncogene para las halladas en los genomas virales.

Se supone que habría dos maneras por las cuales estos v-oncogenes, celulares en su origen, se volverían tumorigénicos. Una sería una expresión muy abundante de este gen. Es decir una síntesis aumentada de la proteína normal, codificada por el mismo, que en gran cantidad impulsaría un desarrollo oncogénico de la célula hospedante del retrovirus.

La otra manera sería que el gen adquiriese mutaciones nuevas que lo convirtieran en oncogénico debido a la síntesis de una proteína alterada. Parecen haber ejemplos de ambos tipos de mecanismos (Bishop, 1987).

En algunos casos, un retrovirus que no porta oncogenes, puede insertarse en el genoma humano, desencadenando una transformación oncogénica. Este fenómeno se denomina inserción mutagénica, pues al insertarse el retrovirus puede activar un gen, al ponerlo bajo el control de sus poderosos promotores virales, haciendo que se exprese en forma desmedida, fuera del control celular. Este es el caso de los linfomas de pollo, en los cuales el c-myc se activa por la inserción de ADN retroviral 5 prima o 3 prima del gen.

La inestabilidad cariotípica de las células cancerosas es un fenómeno muy común, que podría en muchos casos, representar un efecto más que una causa. Sin embargo existen evidencias de que las translocaciones que involucran oncogenes, así como deleciones y otros tipos de alteraciones cromosómicas, tendrían que ver con la etiología del cáncer y no son meramente un efecto del mismo.

Los oncogenes se relacionan en muchos casos con reordenamientos cromosómicos tales como translocaciones, inversiones, deleciones y amplificaciones de grandes dominios intracromosómicos (Bishop, 1987).

La nomenclatura de las translocaciones recíprocas es poner entre paréntesis los cromosomas involucrados por ejemplo (8;14) y luego las bandas que se translocaron en el mismo orden: (q24;q32). Es significa que se translocó la banda q24 del cromosoma 8 al cromosoma 14 y la banda q32 del cromosoma 14 al cromosoma 8. Cuando la banda se encuentra en el brazo largo del cromosoma se indica con una q y cuando se encuentra en el brazo corto se indica con una p.

Ejemplos de translocaciones son el linfoma de Burkitt, (BL) con t(8;14) (q24;q32) algunos otros No-Hodgkin linfomas y la leucemia mieloide (granulocítica) crónica (LMC). En el primer caso (linfoma de Burkitt y algunos No-Hodgkin linfomas) se produce una translocación entre los genes de inmunoglobulinas de los cromosomas 2, 14 y 22 y el gen myc del cromosoma 8.

En el segundo caso, LMC, se produce una translocación entre el cromosoma 9 (q34) y el 22 (q11). Esta translocación sólo se produce en las células mieloides y es entonces, un ejemplo de una mutación o alteración somática en el origen de un tumor maligno.

Como resultado de las translocaciones, así como en el caso de la inserción de retrovirus en el genoma humano, pueden producirse un exceso de proteínas normales, es decir una gran expresión del gen o bien una proteína bioquímicamente alterada, como es el caso más arriba descrito de la leucemia mieloide crónica.

En algunos tumores se han observado también, amplificación de oncogenes. No está claro que función cumple esta amplificación, parece tener relación en la progresión del tumor y no en la transformación maligna inicial.

Los oncogenes celulares se pueden dividir en nucleares y citoplasmáticos. Esto se refiere en realidad, a las oncoproteínas. Es decir, si los oncogenes codifican para proteínas que actúan en el núcleo se denominan oncogenes nucleares, si poseen información para la síntesis de proteínas que actúan en el citoplasma se llaman oncogenes citoplasmáticos.

Ambos tipos de oncogenes colaboran en el desarrollo de la transformación tumoral. Se sugirió que ambos tipos de oncoproteínas convergirían en un mismo camino metabólico, unas actuando en el núcleo y otras en el citoplasma (Weinberg, 1989). Es decir un oncogene activado, es capaz de controlar sólo un conjunto limitado de circuitos regulatorios del crecimiento celular. Esto último reflejaría la función que estos oncogenes cumplirían en su forma normal, como protooncogenes: intervendrían en el control del crecimiento celular (Weiss & Marshall, 1984; Knudson, 1985; Bishop, 1987; Weinberg, 1989).

Muchos de estos protooncogenes se expresan a nivel de proteína en las células normales, en general se expresan en forma regulada durante el desarrollo celular. Se comprobó que algunos son factores de crecimiento como el oncogen sis y otros son probablemente receptores celulares como el erb (Weiss & Marshall, 1984).

La siguiente tabla extraída de Weinberg (1989, tabla 1) ilustra la colaboración entre los dos tipos de oncogenes:

## Clasificación funcional de oncogenes cooperativos en fibroblastos de embrión de rata

Esta clasificación se basa en la capacidad de los oncogenes de colaborar en la transformación. Por ejemplo un oncogene ras puede colaborar con myc, p53, adenovirus E1A para transformar oncogénicamente a los fibroblastos de embrión de rata.

---

Oncogenes citoplásmicos	Oncogenes nucleares
Ha-ras	myc
Ki-ras	N-myc
N-ras	L-myc
src	p53
Polyoma MT	Adeno E1A
	Polyoma LT
	SV40 LT
	Papillomavirus E7

---

### En células de la médula ósea de aves

erbB	myc
src	myb
fps	
mil	
Ha-ras	
ros	
yes	
sea	

---

La tumorigénesis sería en la mayor parte de los casos, un proceso gradual, con varios pasos. El hecho de que muchos tumores aparezcan relacionados con la edad, en general con la adultez o con la vejez, sería una evidencia de que se requiere un proceso de acumulación de alteraciones genéticas (Bishop, 1987; Weinberg, 1989).

La mutagénesis por inserción de retrovirus y las mutaciones puntuales en protooncogenes debidas a carcinógenos químicos podrían ser ejemplos de pasos iniciales en la tumorigénesis. La

amplificación de protooncogenes ha sido asociada, en cambio con la progresión de los tumores malignos. Finalmente la tumorigénesis puede requerir también, la pérdida de parte o todo un cromosoma (Bishop, 1987).

Además de los oncogenes, se ha postulado un mecanismo de acción distinto, a través de los genes supresores de tumores. Estos genes fueron también llamados antioncogenes por Knudson (1985), pero Weinberg (1989) considera que es mejor llamarlos genes supresores de tumores o genes supresores del crecimiento celular, pues esto reflejaría mejor su función fisiológica normal.

Los genes supresores de tumores, son genes que ejercen una regulación negativa del crecimiento celular. Son específicos de tejidos. Se observó que fusionando células tumorales con células normales frecuentemente se revertía, el fenotipo tumoral. Esto apoya la noción de pérdida o alteración de genes controladores del crecimiento en las células tumorales, pues cuando el gen se encuentra en su forma normal, se inhibe el desarrollo tumoral (Weinberg, 1989).

Resumiendo, habría dos mecanismos diferentes responsables de la transformación maligna, uno debido a oncogenes y otro debido a genes supresores de tumores. Se ha encontrado que en general los oncogenes sufren mutaciones dominantes, mientras que los genes supresores de tumores sufren mutaciones recesivas o bien pérdida de parte o todo el cromosoma como en el caso del retinoblastoma más arriba descrito (Knudson, 1985). Ambos mecanismos podrían interactuar en algunos tumores.

Vineis & Caporaso (1991) realizaron una reseña desde el punto de vista epidemiológico de los polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción, en los oncogenes L-myc y Ha-ras. Describieron una asociación entre ciertos alelos de estos genes y ciertas formas de cáncer. Por ejemplo ciertos alelos raros, con una frecuencia menor a 0,005, del oncogen Ha-ras, estaban asociados con cancer de pulmón.

Sugimura y colaboradores (1990) investigaron la relación entre alelos raros de repeticiones en tandem de número variable (VTR) y la predisposición heredable a tener cáncer de pulmón. Analizaron si había o no diferencias debidas a la edad, raza (negros y blancos) y al hábito de fumar presente o pasado, en grupos de control. Llegaron a la conclusión que ciertos alelos raros representan un factor de riesgo en algunos tipos de cáncer

de pulmón. Esta asociación era más fuerte en la raza negra que en la raza blanca. Es decir el factor de riesgo era más elevados para negros que para blancos. De todos los factores arriba mencionados el más significativo resultó el factor étnico.

Resulta interesante destacar que el grupo control del trabajo anterior (Sugimura et al., 1990) no estaba formado por individuos sanos, sino por pacientes que no sufrían de cáncer de pulmón sino de otro tipo de enfermedades. Sugimura y colaboradores hicieron notar este hecho, sugiriendo un estudio más amplio en una muestra poblacional de individuos sanos.

Por otra parte los alelos de VTR del gen Ha-ras arriba mencionados, podrían ser sitios preferenciales de recombinación genética. Por lo tanto podrían ser blancos potenciales de los efectos de los carcinógenos químicos de muchos contaminantes ambientales como por ejemplo los componentes de los cigarrillos.

#### Leucemias y genes de interferon:

Los genes Alpha y Beta-1 interferón están involucrados (participan) en reordenamientos cromosómicos en algunas leucemias. Díaz et al. (1986) hallaron que la translocación (9;11) (p22;q23) se hallaba presente en alrededor del 10% de los pacientes con leucemia monocítica aguda.

Díaz y colaboradores (1986) realizaron hibridación in situ en células de pacientes con esta leucemia, que mostraban la translocación, usando como sonda de hibridación a ADN de Alpha o Beta-1-IFN. Descubrieron que sólo se translocaba del brazo corto del cromosoma 9 al brazo largo del 11, el gen Beta-1-IFN y no el resto del agrupamiento de genes Alpha-IFN. De esta forma precisaron el sitio de ubicación del gen Beta-1-IFN en la banda p22, por bandeado Giemsa.

También analizaron el ADN genómico de pacientes con leucemia monocítica aguda, mediante hibridación a membranas de Southern con las mismas sondas moleculares, Alpha y Beta-1-IFN. El ADN genómico fue digerido con las endonucleas Bam HI y Hind III. No se observaron diferencias en el patrón de bandas con respecto al ADN de individuos normales, usados como control. Ellos concluyeron que las secuencias regulatorias de la transcripción se translocarían junto con el gen Beta-1-IFN y por lo tanto no se observarían reordenamientos, por lo menos para los sitios de restricción Bam HI y Hind III (Díaz et al., 1986).

Por otra parte, se hibridó también in situ a las células de estos mismos pacientes con la sonda molecular v-ets, pues previamente se halló que en las bandas 11q23-q24 se hallaba el protooncogen c-ets. Se encontró que se había translocado al brazo corto del cromosoma 9.

Al igual que en el caso de las sondas moleculares Alpha y Beta-1-IFN, tampoco se detectaron rearrreglos al analizar el patrón de bandas, luego de hibridar membranas de Southern, conteniendo ADN genómico normal y de pacientes con la sonda v-ets.

No estaba claro cual era el rol de los genes de IFN y del gen c-ets en la etiología o el desarrollo de este tipo de leucemia. Díaz y colaboradores (1986) consideraron que tal vez el protooncogen c-ets al translocarse, quedase sometido a los mismos mecanismos regulatorios que los genes Alpha-IFN, por estar ubicado muy próximo a ellos. Es decir se transcribiría el c-ets-1 y esto activaría un camino alternativo de proliferación celular, que tuviese relación con la etiología de esta leucemia.

Se hallaron anomalías en el brazo corto del cromosoma 9, en el sitio en donde se encuentra el agrupamiento de genes Alpha y el gen Beta-1-IFN, en la leucemia linfoblástica aguda y en neoplasias linfoides. Estas alteraciones consistían en la pérdida de un cromosoma 9 entero (monosomía), la delección de sólo el brazo corto de un cromosoma 9 o la translocación desbalanceada de esta misma zona (Díaz et al., 1990a).

Díaz et al. (1988), hallaron delecciones homocigotas de los genes de interferón, es decir que a diferencia de lo hallado anteriormente, involucraban a ambos cromosomas homólogos 9. Esto se halló en líneas celulares que se establecieron a partir de sangre de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

Estas delecciones a veces, en algunas líneas celulares, no eran detectables citológicamente, con el microscopio óptico, pero sí mediante hibridación molecular a membranas de Southern con las sondas de Alpha y Beta-1-IFN. Dado que una banda cromosómica es de aproximadamente 5.000 kb de largo, es probable que la delección sea menor que 2.000 kb (Díaz et al., 1988).

Estas delecciones no sólo involucraban a los genes de IFN, sino también al gen de la 5'-metiltioadenosina fosforilasa



(MTAP). Es decir los genes de IFN y de la MTAP estarían ligados. Ambos podrían ser candidatos a genes supresores de tumores, interviniendo como tales, en la etiología de las leucemias linfoblásticas agudas (Díaz et al., 1988).

Estos resultados logrados in vitro, en líneas celulares, fueron confirmados posteriormente (Díaz et al., 1990a) en muestras de células de pacientes de esta enfermedad. Se observaron en algunos pacientes, translocaciones entre el 9 y el cromosoma 11, t(9;11) (p21;q25).

El análisis de sangre periférica de pacientes con remisión completa de la enfermedad, reveló un número normal de genes de interferón Alpha y Beta-1. Es decir se revirtió al genotipo y al fenotipo normal celular.

De un 7 a un 13% de los pacientes mostraban estas deleciones que involucraban al cromosoma 9. Díaz y colaboradores (1990b), no consideraron que las deleciones fuesen el único mecanismo responsable de la tumorigénesis en todos los casos de leucemia linfoblástica aguda, sino sólo en algunos casos.

Los interferones Alpha y Beta-1 endógenos inhiben la proliferación de fibroblastos y monocitos, previamente inducidos por factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el factor estimulador de la formación de colonias de los macrófagos. La deleción de los genes de IFN permitiría la aparición de un clon de células, con una ventaja adaptativa mayor en cuanto a la proliferación celular, al no estar sometidas al control negativo ejercido por los IFNs. (Díaz et al., 1988).

Pitha-Rowe (1990), ha propuesto que los genes de interferón, en particular Alpha y Beta-1-IFN podrían ser una nueva clase de genes supresores de tumores.

Otro mecanismo supresor de tumores, propuesto por Díaz et al., (1988), podría ser el incremento de la sensibilidad de las células tumorales, debido al efecto citotóxico mediado por los linfocitos T.

## Objetivo de la tesis:

Resumiendo lo anterior, los genes de interferón de clase I (Alpha y Beta-1) tendrían un rol importante en la etiología y el desarrollo de algunas leucemias linfoblásticas agudas y de algunos linfomas.

El panorama no es tan claro en otros tipos de leucemia. Los distintos tipos de leucemias crónicas han respondido en forma diversa a los tratamientos con interferones exgenos. Por ejemplo, el tratamiento con Alpha-IFN en pacientes con tricoleucemia es en general muy exitoso (Quesada et al., 1984; Hofmann et al., 1985; Coci et al., 1987; Golomb & Ratain, 1987), con más de 90 % de los pacientes con remisión parcial o total, de la enfermedad.

También se han descripto buenos resultados en el tratamiento de las leucemias mieloides crónicas, si bien no son tan evidentes como en el caso de las tricoleucemias.

La tricoleucemia representa el 2 % de las leucemias y en general los adultos, la sufren en mayor proporción. Se ha propuesto para esta enfermedad (Quesada et al., 1984), que tal vez el interferón exógeno sea tan exitoso debido a la deficiencia en interferón endógeno. Es decir podría tratarse de una terapia de reemplazo, se reemplaza la deficiencia de interferón endógeno suministrando interferón a los enfermos de tricoleucemia.

Por otra parte, parece haber polimorfismo en los genes Alpha así como en el gen Beta-1-IFN (Riggin & Pitha, 1982; Sagar et al., 1983; Ohlsson et al., 1985; Von Gabain et al., 1986). Parecen ser buenos marcadores genéticos del brazo corto del cromosoma 9. El gen Gamma-IFN parece ser monomórfico (Gray & Goeddel, 1982).

El uso de las diferencias en las secuencias más arriba mencionadas, ha incrementado enormemente el potencial para investigar las enfermedades genéticas. Como ya se vió, el sistema de interferón está íntimamente ligado a la primera línea de defensas antivirales y antitumorales.

Sería interesante, entonces, investigar las consecuencias terapéuticas de las variaciones genéticas de los genes de

interferón, que además son buenos marcadores genéticos, Es por esto que nos propusimos como objetivo de la tesis doctoral el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, en una muestra de individuos sanos y en una muestra de individuos leucémicos crónicos, en función de descubrir alguna correlación o asociación entre los genes de interferón y las leucemias.

Es necesario aclarar que esta asociación no significa que los interferones sean genes "candidatos", o sea causantes de las leucemias en estudio. Puede haber asociación por estar algún o algunos alelos de los genes de interferón, ligados al locus "candidato" o bien ligados a un gen regulatorio.

En el caso de las leucemias mieloides crónicas, se sabe que la causa se encuentra en la translocación 9 a 22 (ver más arriba), pero tal vez pueda a llegar a determinarse poblaciones de riesgo, en relación a ciertos alelos de los genes de interferón.

Por otra parte, para las tricoleucemias tal vez pueda descubrirse alguna alteración en los genes de interferón, pues se desconoce la etiología de esta enfermedad.

## MATERIALES Y METODOS

### Sondas moleculares:

#### Alpha-2-IFN humano:

Al comenzar esta investigación, el gen Alpha-2-IFN humano se hallaba inserto en el plásmido pBR322. La secuencia usada se aisló a partir de una biblioteca de ADN genómico recombinante, en el bacteriófago Lambda Charon 4a, según la metodología de Lawn et al. (1981). Un subfragmento de 900 pb fue subclonado en el sitio Cla I del pBR322.

Posteriormente, el Alpha-2-IFN fue insertado en el plásmido pTZ19 (Pharmacia), subclonándose. Se lo digirió con Eco RI y Hind III y se electroeluyó la banda correspondiente al gen de interferón, para usarla como sonda de hibridación molecular.

#### Beta-1-IFN:

La secuencia del gen Beta-1-IFN humano también se hallaba inserta en otro plásmido, el pAT153, derivado del pBR322. Se obtuvo el ADN complementario por transcripción reversa a partir del ARN mensajero del gen de Beta-1-IFN según la metodología de Derynck et al. (1981). Esta secuencia de 730 pb aproximadamente fue insertada en el pAT153.

Luego, el Beta-1-IFN fue insertado en el plásmido pTZ19, subclonándolo. Se lo digirió con Bam HI y Sal I y se electroeluyó la banda correspondiente al gen de interferón, para usarla como sonda molecular.

#### Gamma-IFN:

El ADN complementario o copia, que codifica para el Gamma-IFN aislado de una biblioteca de cADN, siguiendo la metodología de Gray et al. (1982), fue insertado en el plásmido pAT153. Posee 1.200 pb.

Al comenzarse esta investigación, se subclonó el Gamma-IFN. Se insertó el cADN de Gamma-IFN, en el plásmido pTZ19. Se lo

digirió con Pst I y se electroeluyó la banda correspondiente a la secuencia de ADN de Gamma-IFN, en función de usarla como sonda de hibridación molecular

#### ADN humano:

El ADN humano normal, se extrajo de muestras de sangre periférica, de donadores voluntarios, provenientes de los centros hematológicos de la Academia Nacional de Medicina y del Hospital Escuela Gral. San Martín.

En los centros hematológicos, la sangre fue analizada para comprobar ausencia de HIV, hepatitis B, mal de Chagas, sífilis y en algunos casos brucelosis. Sólo se extrajo ADN de muestras de sangre sin estas enfermedades.

Las muestras de sangre leucémica, fueron obtenidas de pacientes con tricoleucemia, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica y leucemia linfocítica aguda y cedidas gentilmente por la Dra. Irene Larripa, por la Dra. Lucía Barazutti y por el Dr. Leonardo Satz.

Los pacientes de leucemia mieloide crónica, se encontraban en la fase estable de la enfermedad. Presentaban un cariotipo los de sexo masculino de 46 XY, cromosoma Filadelfia positivo (Phi +) y los de sexo femenino de 46 XX, cromosoma Phi +, sin otros reordenamientos cromosómicos. Dos pacientes eran Phi -. Ninguno recibió tratamiento previo.

En el caso de los pacientes de tricoleucemia, algunos fueron tratados con interferón, otros recibieron otros tratamientos, Uno tenía remisión completa, sin recibir tratamiento hace mucho tiempo. Se tomaron muestras de sangre periférica, salvo en un caso en el que se tomó una muestra de bazo, pues se lo habían sacado, como parte del tratamiento, al paciente.

#### Extracción de ADN humano:

Se recolectaron muestras de sangre periférica provenientes de distintos centros hematológicos de la Capital Federal.

Se centrifugaron las muestras 15 min. a 4.000 g y se recogió la interfase de leucocitos (que arrastra eritrocitos y plasma) a la que se agregó el anticoagulante.

Muestras de 5 ml. fueron centrifugadas durante 15 min. a 3.000 g, descartándose la fase superior (plasma). Por cada volumen de muestra se agregaron 18 volúmenes de cloruro de amonio 0,83 %. Se agitó y se dejó reposar 15 min. a 4 C. Luego se centrifugaron 15 min. a 3.000 g, descartándose el sobrenadante con el lisado de eritrocitos. Se repitió el lavado y la posterior centrifugación con cloruro de amonio 0,83 %.

Se resuspendió el precipitado de cada muestra de leucocitos en 2 ml. de PBS pH=7,4 transfiriendo la suspensión a dos tubos Eppendorf (de 1,5 ml. de volumen c/u). Se centrifugó 15 seg. a 13.000 g, descartándose el sobrenadante.

La lisis de leucocitos se realizó de diferentes maneras:

Caso 1: Se resuspendió el precipitado de leucocitos en 1 ml. de buffer de lisis de glóbulos blancos (1) y se agitó a 50 C durante 3 horas (Maniatis et al, 1982, modificado).

Caso 2: Se resuspendió el precipitado en 1 ml. de buffer de lisis de glóbulos blancos (2) agitándose durante la noche a 37 C.

Caso 3: Se resuspendió el precipitado en 1 ml. de buffer de lisis de glóbulos blancos (2). Se agitó 15 min. a 65 C y luego toda la noche a 37 C.

A algunas muestras se les extrajo el ADN con el siguiente procedimiento:

Se centrifugaron las muestras de sangre periférica, descartándose el plasma (fase superior).

Se agregó a cada muestra 1 volumen de buffer de lisis de glóbulos rojos y se centrifugó 10 min. a 1.500 g. Se descartó el sobrenadante con el lisado de eritrocitos.

Se resuspendió el precipitado en el doble del volumen original de buffer de lisis de glóbulos rojos, repitiendo el paso anterior.

Se resuspendió el último precipitado de leucocitos en 2 ml. del mismo buffer, se agitó y se agregó rápidamente 15 ml. de buffer de lisis de glóbulos blancos (3). Los volúmenes anteriores se refieren a muestras de 30 ml. de sangre periférica.

La lisis se realizó a 42 C durante la noche.

En todos los casos, si no se purificó el ADN se inmediato se almacenó a -20 C.

Reactivos:

Anticoagulante: Citrato fosfato dextrosa

ClNH4		0,83 %
PBS	pH=7,4	
Tris	pH=7,6	1 M
Tris	pH=8	1 M
EDTA	pH=8	0,25 M
SDS		10 %
NaCl		5 M
MgCl2		
Proteinasa K		10 mg/ml

Buffer de lisis de glóbulos blancos (1):

Tris	pH=7,4	10 mM
EDTA	pH=8	10 mM
SDS		1 %
Proteinasa K		200 ug/ml

Buffer de lisis de glóbulos blancos (2):

Tris	pH=7,4	10 mM	
EDTA	pH=8	10 mM	
NaCl		150 mM	
SDS		0,4 %	(Se agrega último)
Proteinasa K		400 ug/ml	

Buffer de lisis de glóbulos blancos (3):

Tris	pH=7,6	10 mM
EDTA	pH=8	10 mM
NaCl		50 mM
SDS		0,2 %
Proteinasa K		200 ug/ml

Buffer de lisis de glóbulos rojos:

Tris	pH=7,6	10 mM
MgCl <sub>2</sub>		5 mM
NaCl		50 mM

Purificación de ADN humano:

A cada volumen de muestra se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo frío y se agitó bien. Se centrifugó 5 min. a 13.000 g, recuperándose la fase superior acuosa con los ácidos nucleicos y dejando la interfase protéica. Se repitió este paso dos veces más (Maniatis et al., 1982).

A la última fase acuosa obtenida se le agregó un volumen igual de éter frío. Se agitó y se centrifugó 2 min. a 13.000 g. Se descartó la fase superior fenólica y se repitió este paso dos veces más.

Luego se agregó NaCl para una concentración final de 250 mM, se agitó y se agregó 2 volúmenes de etanol frío. Se agitó y se enroscó el ADN en una varilla de plástico.

Cuando no se purifica el volumen entero proveniente de la lisis (1 ml), el mismo se fracciona y luego se precipita cada alícuota (100-200 ul) 15 min. a 13.000 g.

Otro procedimiento para purificar ADN fue:

A cada volumen de muestra se le agregó 0,5 volúmenes de AcoNH<sub>4</sub> pH=7,3 7,5 M. Se agitó y se calentó 10 min. a 65 C, luego se agregaron 2 volúmenes de etanol frío y se precipitó el ADN de 15 a 30 min. a 13.000 g (alícuotas ver más arriba).



Se resuspendió el ADN en agua destilada esteril y se repitió el paso anterior con el AcoNH<sub>4</sub> y el etanol.

Se repite en algunos casos hasta 4 veces el paso anterior. Se resuspendió el precipitado en T.E. pH=7,6 y se guardó el ADN a -20 C.

#### Reactivos:

Fenol-cloroformo. Preparación (Maniatis et al., 1982, modificado): Se destila el fenol y se satura con buffer NET hasta formar las dos fases. Al fenol saturado se le agrega un volumen igual de cloroformo (1:1). Se mezcla y se agrega 8 OH-quinoleína al 0,1 %. Se mezcla y se fracciona.

Buffer NET pH = 7:

Tris	3,037 g
ClNa	2,92 g
EDTA	0,185 g
HCl	1,65 ml
agua c.s.p.	

Etanol

Eter

AcoNH<sub>4</sub> pH=7,3      7,5 M

TE pH=7,6

Tris-Cl	10 mM	(pH=7,6)
EDTA	1 mM	(pH=8)

#### Digestión de ADN humano con endonucleasas de restricción:

La digestión se realizó de acuerdo a las condiciones de reacción óptimas especificadas para cada enzima por su fabricante (BRL o New England BioLab).

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos Eppendorf (1,5 ml) con diferentes volúmenes finales: 20, 50 y 100 ul, digiriéndose en ellos 10 ug de ADN purificado.

Los buffers utilizados, provistos por el fabricante, de concentración 10x, se diluyeron hasta llegar a 1x.

Se aseguró que las enzimas de restricción representasen menos de 1/10 del volumen final de la reacción, de manera tal que la actividad enzimática no se inhibiera por el glicerol. En general las enzimas de restricción se almacenan a -20 C en un buffer que contiene 50 % de glicerol.

#### Electroforesis en gel de agarosa:

Se realizaron corridas electroforéticas de geles de agarosa de diversa concentración 0,5; 0,8; 1 y 1,2 %.

El buffer del gel y el buffer de corrida utilizados fueron T.B.E. 1x, pH=8.

Las condiciones de corrida fueron variables: durante toda la noche a 25 volts o bien aproximadamente 3 hs. a 100 volts.

El tamaño de los geles era de 11 x 14 cm.

Se utilizaron 5 ul. de buffer de carga por cada 20 ul. de muestra sembrados en el gel.

Los geles se colorearon con bromuro de etidio 0,5 ug/ml. en agua destilada después de la corrida electroforética, dejándose de 20 a 30 min. a T ambiente. Se observaron a la luz ultravioleta con un transiluminador y se fotografiaron con un filtro adecuado.

#### Reactivos:

Bromuro de etidio 1 mg/ml

#### Buffer T.B.E. 1x:

Tris-borato	0,088 M
Acido bórico	0,088 M
EDTA	0,002 M

pH= 8,3

Buffer de carga:

Azul de Bromofenol	0,07	%
Glicerol	33	%
SDS	7	%
en buffer T.B.E. 1x		

Transferencia de geles:

Se realizó de acuerdo a la técnica de Southern (1975, modificada).

Se deja el gel unos minutos al UV para producir cortes en el ADN que favorezcan su transferencia a la membrana.

Se tomó el gel previamente cortado en un extremo identificatorio y se lo sumergió 30 minutos a T ambiente en una solución desnaturalizadora.

Se lo sacó de la solución anterior, se lo lavó con agua y se lo pasó a una solución neutralizadora. Se lo dejó 30 min. sumergido a T ambiente.

Simultáneamente se cortó un filtro de nitrocelulosa (Microfiltration Systems o Micron Separations Inc.) o de nylon Zetaprobe o Biodyne ( a los que se transferirá el ADN) y 2 papeles de filtro Whatman, del mismo tamaño del gel. Se identificó con un corte un extremo del nylon o de la nitrocelulosa. Se depositó a todos los filtros en una solución de 2x SSC o bien agua destilada, cuidando de que se embeban lentamente.

La transferencia se realizó durante toda la noche a T ambiente. Se colocó un papel de filtro Whatman previamente embebido en 2x SSC, sobre un vidrio que a su vez se encontraba en contacto con una cuba en cada extremo del mismo. El papel de filtro era suficientemente largo como para sumergirse en el líquido de cada cuba. Se depositó el gel invertido sobre este papel. Se colocó el filtro de nylon o de nitrocelulosa sobre el gel. Se cubrió este filtro con los dos papeles Whatman.

Por encima se colocó gran cantidad de papel absorbente, doblado y apilado, luego un vidrio y finalmente arriba de todo un peso de 500 g.

El líquido de las cubas era 20x SSC para nylon y nitrocelulosa y 10x SSC solo para nitrocelulosa.

En lugar de cubas separadas, se utilizó también un recipiente de plástico en el que se colocaba la solución salina (20x SSC o 10x SSC) y 2 paños esponja absorbentes embebidos en esta solución. Sobre estos paños se colocó el gel invertido. El resto del procedimiento fue igual que en el caso anterior.

Al día siguiente se fijó el ADN al filtro de nylon (Pall Biodyne) invertido sobre un transiluminador con luz ultravioleta durante 8 minutos; o bien se fijó el ADN al filtro de nylon (BioRad) 2 horas a 80 C.

Cuando se transfirió a nitrocelulosa, se fijó el día siguiente 1.5 hs en una estufa a 80 C.

Los filtros se guardaron envueltos en un sobre de papel Whatman en un lugar seco, hasta el momento de ser usados.

#### Reactivos

##### Solución desnaturalizadora

OHNa            0.5 M

NaCl            1.5 M

##### Solución neutralizadora

Tris-Cl        1 M        pH= 8

NaCl            1,5 M

##### 1x SSC:

NaCl                            0.15 M

Citrato de Trisodio        0.015 M

## Formación de ADN recombinante: ligación

La reacción se realizó durante toda la noche, en un baño a 15 C, en un volumen de 10 o 20 ul.

La relación molar inserto - vector utilizada fué de 10 a 1.

La enzima utilizada fue la ligasa.

## Reactivos

### Buffer de ligamiento:

Tris-HCl	25	mM	pH= 7,6
MgCl <sub>2</sub>	10	mM	
Dithiothreitol (DTT)	10	mM	
ATP	0.4	mM	

Ligasa 10 u/ul

## Transformación de Escherichia coli:

### A - Inducción de la competencia bacteriana:

Una alícuota de un ml. de un cultivo fresco de E.coli (DH5 Alpha o DH5Alpha F', BRL) se sembró en 100 ml. de caldo Psi. Se incubó el cultivo durante 2 hs. a 37 C con agitación controlándose periódicamente la absorbancia hasta que ésta alcanzó un valor aproximado de 0,48 a 600 nm.

Las bacterias se recolectaron luego con centrifugación a 4 C y 5.000 rpm. El precipitado se resuspendió en 40 ml de Tfb I manteniendo siempre el material en frío y se volvió a centrifugar 5 minutos a 5.000 rpm. El nuevo precipitado se resuspendió en 4 ml de Tfb II y se mantuvo en hielo durante 5 minutos.

La suspensión de bacterias así permeabilizadas se fraccionó en tubos Eppendorf en alícuotas de 200 ul, las que se congelaron a -70 C hasta su transformación.

## B - Transformación de células competentes:

Se utilizó el método de Hanahan (1983).

Luego de descongelarlas y mantenerlas en hielo durante 10 minutos, 50 ul de células competentes se incubaron con 10 a 50 ng de ADN plasmídico. Luego se calentó la suspensión a 42 C 90 segundos y se la enfrió en hielo inmediatamente por 2 minutos.

A cada tubo de suspensión sometido a los tratamientos térmicos descritos se agregaron 200 ul de caldo Luria y la mezcla se incubó a 37 C con agitación durante una hora.

Como control de transformación se incluyeron tanto un tubo sin ADN, como otro conteniendo 0,1 ng de vector.

## C - Selección y plaqueo de células transformadas:

Se prepararon placas de agar Luria (caldo Luria con agregado de agar DIFCO, 15 gr/l). Las placas contenían 100 ug/ml de Ampicilina (SIGMA) ó 25 ug/ml de Tetraciclina (SIGMA) ó la concentración de antibiótico que requiera el ensayo.

Una suspensión de 50 ul de bacterias transformadas fueron sembrados con espátula de Trigalsky en placas conteniendo uno u otro antibiótico. Las placas se incubaron a 37 C toda la noche.

La eficiencia de transformación se calculó como:

$$E \text{ (unidades formadoras de colonias/ug de ADN)} = \frac{\text{número de colonias}}{\text{masa de ADN transformada}}$$

Reactivos:

Medio Psi-b:

Bactoextracto de levadura	5 g/litro
Bacto-triptona	20 g/litro

MgSO<sub>4</sub> 5 g/litro

Se ajusto el pH a 7,6 con KOH.

Se filtró a traves de un filtro de 45 micrones y se autoclavó.

TfbI:

KAc 30 mM

RbCl<sub>2</sub> o KCl 100 mM

CaCl<sub>2</sub> 10 mM

MnCl<sub>2</sub> 50 mM

Se agregó glicerol hasta 15 %.

Se ajustó el pH a 5,8 con 0,2 M de ácido acético.

Se esterilizó por filtración.

TfbII:

MOPS o PIPES 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 75 mM

RbCl<sub>2</sub> o KCl 10 mM

Glicerol 15 %

Se ajustó el pH a 6,5 con KOH y se esterilizó por filtración.

Medio LB

Agar L: se prepara igual que el medio LB y se agrega 1,2 % de agar (1,2 g/100 ml de medio LB).

Se ajusta a pH= 7,2 - 7,4 con OHNa 4 N.

## Extracción de plásmidos:

Se utilizó la técnica de Birnboim y Doly (1979) con modificaciones.

Para poder extraer el ADN plasmídico con los insertos Alpha, Beta y Gamma-IFN humanos, se dejó crecer a las cepas transformadas con una dilución 1/100, en 2 ml de LB (en tubos Britania de 10 ml).

Las secuencias de Alpha-2 y Beta-1-IFN insertadas, interrumpen el gen de resistencia a ampicilina de los plásmidos pBR322 y pAT153, respectivamente. Por su parte, la secuencia de Gamma-IFN, interrumpe el gen de resistencia a tetraciclina en el plásmido pAT1533. Es por esto que se agregó al medio de cultivo 40 ug/ml de ampicilina en el caso de Alpha y en el de Beta y 15 ug/ml de tetraciclina en el caso de Gamma-IFN.

Luego de subclonarse los 3 insertos, cada uno, en un plásmido pTZ19, el gen de resistencia a ampicilina no se interrumpía y se usó como marcador de selección, también a una concentración de 40 ug/ml

Los cultivos se agitaron aproximadamente 18 a 37 C. Se tomó, luego, una alícuota de 200 ul y se inoculó a 20 ml del medio LB (dilución 1/100, en erlenmeyers de 125 ml) que contenía la concentración de antibióticos antes descripta. Se dejó agitándose 18 horas aproximadamente a 37 C.

Se fraccionó cada cultivo en cámara estéril, en Eppendorfs (1,5 ml), o bien se colectó el cultivo entero en un tubo de vidrio (Corex de 30 ml).

Cada ml de cultivo de células transformadas se centrifugó en tubo Eppendorf durante 5 minutos en microcentrífuga. El precipitado se resuspendió en 100 ul de solución de lisis y se incubó en hielo durante 30 minutos, agitándose cada 10 min con "vortex", para favorecer la lisis bacteriana.

Se agregaron luego a la suspensión 200 ul de solución alcalina. Se mezcló por inversión y se incubó por otros 5 minutos en hielo. Se agregaron luego 150 ul de AcONa 3 M pH = 4,6 - 4,8 y se incubó durante 30 minutos a la misma temperatura. La suspensión se centrifugó luego 15 minutos en microcentrífuga.



El sobrenadante se extrajo 3 veces sucesivas con 1 volumen de fenol cloroformo 1:1 saturado con buffer TE conservándose la fase acuosa. La misma se extrajo luego con 1 volumen de éter etílico para eliminar los restos de fenol cloroformo. El ADN plasmídico allí presente se precipitó luego con dos volúmenes de etanol previo agregado de AcONH<sub>4</sub> 7,5 M hasta 2,5 M final y centrifugación.

El precipitado obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de buffer TE evaluándose la cantidad y calidad del ADN allí presente por electroforesis de una alícuota en gel de agarosa 0.8 %.

Reactivos:

Ampicilina	10 mg/ml
Tetraciclina	10 mg/ml
AcoNa pH=4,6	3 M
Etanol	
Isopropanol	

RNAsa libre de DNAsa, (SIGMA) de páncreas bovino. Se utilizó una suspensión de 10 mg/ml, calentada a ebullición durante 10 minutos.

Solución de lisis:

Lisozima	2 mg/ml
Tris-Cl	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	9 mg/ml

Solución alcalina:

OHNa	0,2 N
SDS	1 %

Medio de cultivo LB (Luria Bertani):

Para 1 litro:

Bacto-triptona 10 g

Bacto-extracto de levadura 5 g

NaCL 10 g

Se ajustó el pH a 7,5 con OHNa.

Purificación de ADN plasmídico:

A cada volumen de muestra se le agregó un volumen igual de fenol cloroformo frío y se agitó bien. Se centrifugó 5 minutos a 13.000 g, recuperándose la fase superior acuosa con los ácidos nucleicos y dejando la interfase protéica. Se repitió este paso dos veces más.

A la última fase acuosa obtenida se le agregó un volumen igual de éter frío. Se agitó y se centrifugó 2 minutos a 13.000 g. Se descartó la fase superior fenólica y se repitió este paso dos veces más.

Después del último éter se agregó 0,5 volúmenes de  $\text{AcoNH}_4$  pH= 7,3 - 7,5 M y se dejó en hielo 10 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 13.000 g recuperándose el sobrenadante y descartando el precipitado protéico.

Se precipitó luego, el ADN con 2 volúmenes de etanol o con 1 volumen de isopropanol, durante 15 minutos a 13.000 g. Se dejó secar el precipitado y luego se resuspendió en T.E. pH= 7,6 guardándose en alícuotas a -20 C.

Digestión de ADN plasmídico con endonucleasas de restricción:

Las reacciones se llevaron acabo de acuerdo a las indicaciones de los laboratorios que comercializan las enzimas.

El volumen final que se utilizó en las reacciones fué variable, entre 20 y 50 ml.

Los buffers utilizados, todos ellos 10x se diluyeron hasta llegar a 1x.

Se aseguró que las enzimas de restricción representasen menos de 1/10 del volumen final de la reacción de manera tal que la actividad enzimática no se inhibiera por el glicerol.

En general las enzimas de restricción se almacenan a -20 C en un buffer que contiene 50% de glicerol.

#### Electroelución de fragmentos de ADN:

Se digirió el ADN con endonucleasas de restricción. Se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa en función de separar los fragmentos de ADN de acuerdo a su peso molecular. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se recortó la banda correspondiente al fragmento que se deseaba electroeluir.

En la mayoría de los casos, se sembraba una alícuota de la digestión enzimática, en una calle paralela. Se cortaba el gel longitudinalmente y sólo se teñía esa calle. Luego se cortaba el gel a la altura de la banda de interés. Esto se hace para no irradiar al ADN, en cuestión, con UV.

Se lavó brevemente el taco (trozo del gel) y se lo colocó en una vesícula de diálisis. La vesícula fue previamente hervida para despegarla e inactivar nucleasas. Se agregó de 1 a 2 ml de buffer T.B.E. 1x estéril. Se cerró con broches ambos extremos de la bolsa.

Se realizó una corrida electroforética con la vesícula sumergida en el buffer de corrida, a 300 V durante 20 minutos.

Se sacó el taco de la vesícula cuidadosamente, dejando el buffer dentro de la misma. Se tiñó el taco con bromuro de etidio para observar si quedó ADN sin electroeluir.

Se repitió la corrida electroforética a 300 V pero en sentido inverso (del ánodo al cátodo) durante 3 minutos. Se volvió a invertir el sentido de la corrida (de cátodo al ánodo) a 300 V durante 1 minuto. Se invirtió de nuevo el sentido de la corrida a 300 V durante 30 segundos.

Finalmente se invirtió el sentido de la corrida a 300 V durante 15 segundos.

Se recuperó el buffer de la vesícula, se lavó con 500 ul de T.B.E. 1x estéril a la bolsita agregándose, al buffer recuperado previamente.

Se centrifugó 10 min. a 13.000 RPM (microcentrífuga) y se recuperó el sobrenadante.

Se repitió el paso anterior. Se agregó 0.5 volúmenes de AcoNH<sub>4</sub> 7,5 M, se agitó y se dejó 10 minutos en hielo.

Se centrifugó a 13.000 RPM (microcentrífuga) y se recuperó el sobrenadante descartándose el precipitado con restos de gel y otros contaminantes.

Se agregaron 2 volúmenes de etanol y se precipitó el ADN y se guardó a -20 grados C.

**Marcación radioactiva de sondas moleculares:**

**Nick translation:**

Para realizar la marcación se siguieron las instrucciones de Bethesda Research Laboratory (BRL), fabricante del kit de nick translation utilizado.

Por cada ug de ADN que se quería marcar radioactivamente se agregó:

dCTP Alpha 32 P, 100 uCi/10 ul (400 Ci/mmol )

Buffer frío 5 ul

agua destilada estéril c.s.p. 45 ul

Se agitó y se agregó 5 ul de DNA polimerasa I/DNAsa I (BRL) (DNA pol. 0.4 U/ul; DNAsa I 40 pg/ul).

Se volvió a agitar y se centrifugó muy brevemente en función de que esté todo el volumen junto. Se dejó en un baño a 16 C durante una hora.

Luego se agregó agua destilada estéril hasta llegar a un volumen final de 200 ul. Se precipitó el ADN con los volúmenes correspondientes de AcoNH<sub>4</sub> y etanol durante 15 minutos a 13.000 g, dejándose secar el precipitado. De esta manera se eliminaron los nucleótidos no incorporados durante la reacción.

Se midió la radioactividad incorporada con un contador Geiger, se resuspendió el ADN en T.E. pH 7,6 o en agua destilada estéril.

Se calentó 5 minutos a 100 C para desnaturalizar el ADN y luego se dejó 5 minutos en hielo.

En algunos casos se usó de inmediato, mientras que en otros casos se dejó 1 o 2 horas en hielo para luego utilizarlo.

Reactivos:

<sup>32</sup>  
dNTP Alpha P 3000 Ci/mmol

Buffer frío:

dNTP	0.2	mM	
Tris-Cl	500	mM	pH= 7.8
MgCl <sub>2</sub>	50	mM	
2-mercaptoetanol	100	mM	
Albúmina sérica bovina (libre de nucleasas)	100	ug/ml	

#### Random Primers:

Se mezclaron 100 ng de sonda molecular, más 500 pg de Lambda Hind III, en 5 ul de agua estéril. Se hirvió durante 3 minutos y luego se dejó en hielo 5 minutos.

Se centrifugó 10 segundos en la microcentrífuga, se agregó 5 ul de OLB 5x. Luego 8,7 ul de agua estéril, 4 ul de Alpha P32 dCTP a 10 uCi/ul (>3000 Ci/mmol) y finalmente se agregó 1.3 ul de la polimerasa Klenow (3 u/ul)

Se siguió estrictamente el orden anterior, obteniéndose como volumen final 25 ul.

Se marcó la sonda a temperatura ambiente aproximadamente durante 4 horas. Se eliminaron los nucleótidos no incorporados filtrando la muestra a través de una columna de 2,5 ml de Sephadex G100, en una pipeta de plástico; o bien filtrando la muestra a través de una columna de 1 ml de Biogel P60, en una tuberculina.

#### Hibridación molecular:

La solución de prehibridación e hibridación, varió de acuerdo con la severidad del ensayo, es decir con el porcentaje de homología exigido. Se varió la temperatura y la concentración de las sales para conseguir el nivel de homología buscado.

La temperatura de fusión,  $T_m$ , es una medida de la estabilidad térmica de los híbridos. Es la temperatura a la cual, la mitad de las moléculas están asociadas y la otra mitad sin asociarse. Es característica de cada especie de ADN o ARN. (Hames & Higgins, 1985).

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% G+C) - 0,72 (\% \text{ formamida})$$

M = molaridad del catión monovalente, que es el  $\text{Na}^+$ .

SSC 1x = 0,15 M de  $\text{ClNa}$  y 0,0013 M de tricitrato de Na

$$\begin{aligned}
T_m (0,1 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-30,27) + 16,4 = 67,6 \text{ C} \\
T_m (1 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-13,70) + 16,4 = 84,2 \text{ C} \\
T_m (2 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-8,70) + 16,4 = 89,2 \text{ C} \\
T_m (3 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-5,70) + 16,4 = 92,2 \text{ C} \\
T_m (4 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-3,68) + 16,4 = 94,2 \text{ C} \\
T_m (5 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-2,07) + 16,4 = 95,8 \text{ C} \\
T_m (6 \times \text{SSC}) &= 81,5 + (-0,76) + 16,4 = 97,1 \text{ C}
\end{aligned}$$

Temperatura de trabajo -  $T_m$  = % de mal apareamiento permitido

	65 C	60 C	55 C	50 C
$T_m (0,1 \times \text{SSC})$	-2,6	-7,6	-12,6	-17,6
$T_m (1 \times \text{SSC})$	-19,2	-24,2	-29,2	-34,2
$T_m (2 \times \text{SSC})$	-24,2	-29,2	-4,2	-39,2
$T_m (3 \times \text{SSC})$	-27,2	-32,2	-37,2	-42,2
$T_m (4 \times \text{SSC})$	-29,2	-34,2	-39,2	-44,2
$T_m (5 \times \text{SSC})$	-30,8	-35,8	-40,8	-45,8
$T_m (6 \times \text{SSC})$	-32,1	-37,1	-42,1	-47,1

Por ejemplo, si se hibrida a 65 C y con 1 x SSC, significa que se permite hasta un 20 % de mal apareamiento. Cuanto menor es la temperatura y mayor es la concentración de sales, más estable será el híbrido y se tolerará mejor el mal apareamiento.

Cuando se desea obtener una hibridación con máxima homología, es conveniente hibridar a  $T_m - 20$  C, y luego lavar en condiciones más estrictas, a  $T_m - 3$  C. Es decir, favorecer la hibridación y luego exigir más en el lavado.

### Solución de prehibridación:

SSC de acuerdo a la severidad del ensayo

SDS 0.5 % cuando se usaba filtros de nitrocelulosa

SDS 1 % cuando se usaba filtros de nylon

leche en polvo 0.3 %

ADN de esperma de arenque sonicado 100 ug/ml

Se hervía 5 min y luego se dejaba en hielo otros 5 min.

Luego de 2 horas de prehibridación, se renovó la solución de prehibridación y se le agregó la sonda de ADN radioactivo, previamente hervida 10 min y enfriada 5 min en hielo, cuidando de lavar bien el Eppendorf para que toda la sonda pase a la solución de hibridación.

Se dejó agitando durante aproximadamente 20 hs a la temperatura deseada. Luego se lavan los filtros con solución de lavado, durante aproximadamente 3 horas, renovando cada 30 min la solución de lavado.

### Solución de lavado:

SSC de acuerdo con la severidad del ensayo

SDS 0.5 % para nitrocelulosa y 1 % para nylon

La temperatura de lavado se eligió de acuerdo con el porcentaje de homología (ver tabla de T<sub>m</sub>).

### Reactivos:

SSC (ver transferencia de geles)	20	X
SDS	10	%
Leche en polvo	10	%
Acida sódica	0.2	%
ADN de esperma de arenque sonicado	10	mg/ml



### **Autorradiografía:**

Luego de lavados los filtros, se los colocó en un recipiente metálico apropiado (holder). En algunos casos no se secaron los filtros después del lavado en función de volverlos a hibridar.

Encima de los filtros se colocó una placa radiográfica, luego una pantalla intensificadora. Se cerró herméticamente el recipiente metálico y se dejó toda la noche a -20 o 56 C.

Se reveló generalmente a los 3 días y se colocó una nueva placa radiográfica, dejándose a la misma temperatura fría que antes, durante un tiempo variable, de aproximadamente un mes, de acuerdo a cada caso.

### **Reactivos:**

Revelador para autorradiografía Kodak

Lavador: Agua y ácido acético puro, mezclados

Fijador Kodak

## RESULTADOS

### Subclonación de ADN codificante para Alpha-2, Beta-1 y Gamma-IFN

Al iniciarse la presente investigación, las secuencias de ADN codificantes para las proteínas Alpha-2, Beta-1 y Gamma-IFN se encontraban insertas en el plásmido pBR322 o bien en un derivado del mismo.

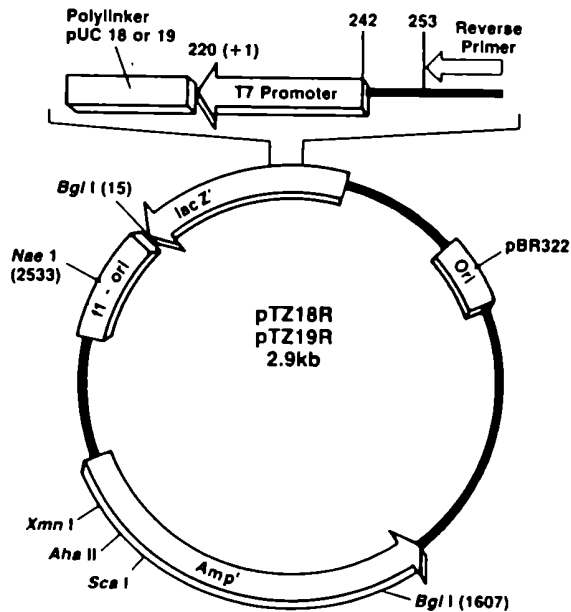
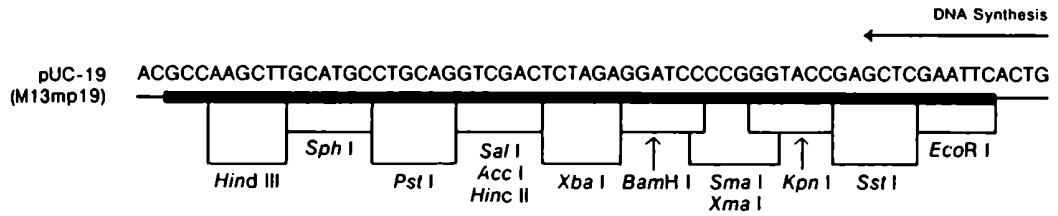
Un fragmento de aproximadamente 900 pb de ADN genómico correspondiente al gen Alpha-2-IFN se hallaba inserto en el pBR322. Una secuencia de 730 pb aproximadamente, del gen Beta-1-IFN se encontraba inserta en el pAT153, que es un plásmido derivado del pBR322. El ADN complementario que codifica para Gamma-IFN, de alrededor de 1200 pb, se hallaba por su parte, inserto también, en un plásmido pAT153 (ver materiales y métodos).

Todos estos plásmidos poseían alrededor de 4,3 kb, sin el inserto; los insertos eran de aproximadamente 1000 pares de bases cada uno. Es decir representaban alrededor de un quinto de la masa del plásmido recombinante.

Para aumentar la proporción de inserto a vector, se decidió transferir cada inserto a un vector pTZ19R (Pharmacia), que posee 2,9 kb. Este plásmido es un derivado del pUC19, que es a su vez un derivado del pBR322.

El plásmido pTZ es un vector de funciones múltiples pues permite clonar ADN, secuenciar ADN por el método de dideoxinucleótidos, realizar mutagénesis in vitro y transcripción in vitro.

Otra característica muy importante, además de su bajo peso molecular, (2,9 kb), es la presencia de un sitio de clonación múltiple derivado del pUC19. Este sitio es un ordenamiento de sitios de restricción únicos, pues no se encuentran en ninguna otra parte del plásmido, de ciertas enzimas, usadas comúnmente en experimentos de clonación. El ordenamiento de sitios de restricción se puede usar para clonar fragmentos de ADN, cuyos extremos compartan algunos de estos sitios de restricción. Este ordenamiento se encuentra inserto en el gen lacZ' como se observa en la siguiente figura extraída del catálogo de Pharmacia: Molecular Biologicals, de 1986.



El lacZ' es el fragmento amino terminal del gen lacZ que codifica para la enzima Beta-galactosidasa. Esta proteína incompleta es capaz de complementarse intralélicamente (alpha) con una forma defectuosa de la Beta-galactosidasa sintetizada por la bacteria hospedadora.

En presencia de isopropilthio-Beta-D-galactosido (IPTG) se induce la síntesis de ambos fragmentos de la enzima Beta-galactosidasa. Cuando se cultiva a las bacterias portadoras de este plásmido en un medio que contiene el sustrato cromogénico de esta enzima: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-Beta-D-galactósido (X-gal) y se las induce con IPTG, se observan colonias azules.

Si el gen lacZ' es interrumpido por la inserción de otra secuencia, no se sintetiza el fragmento amino terminal de la enzima, eliminándose así, la alpha-complementación y en consecuencia las colonias son blancas.

El pTZ19R posee además, al igual que el pBR322 un marcador de selección, un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

Es decir se puede clonar una secuencia de ADN, insertándola en el sitio de clonación múltiple, siempre que el inserto posea en sus extremos, los mismos sitios únicos de restricción que el vector. Se observarán entonces colonias blancas en presencia de IPTG y X-gal y se evitará la contaminación al seleccionar con ampicilina. Es decir se usarán dos marcadores de selección, el gen de la resistencia a la ampicilina y el gen lacZ' cuando se interrumpa por la inserción de otra secuencia.

Se partió entonces, de los plásmidos recombinates:

- pBR322-Alpha-2-IFN
- pAT153-Beta-1-IFN
- pAT153-Gamma-IFN

Se extrajo el ADN plasmídico, se lo purificó por el método del fenol cloroformo. Estos plásmidos eran todos de secuencia conocida (Lawn et al, 1981; Derynck et al., 1981 y Gray et al., 1982). Se corroboró la identidad de los mismos, digiriendo con diferentes endonucleasas de restricción:

- pBR322-Alpha-2-IFN: Bgl II  
Pvu II  
Eco RI  
Hind III
- pAT153-Beta-1-IFN: Bam HI  
Sal I  
Hinc II
- pAT153-Gamma-IFN: Pst I

Se digirió:

pBR322-Alpha-2-IFN	pAT153-Beta-1-IFN	pAT153-Gamma-IFN
y pTZ19R con	y pTZ19R con	y pTZ19R con
Eco RI y Hind III	Bam HI y Sal I	Pst I

En todos los casos, como producto de la digestión se obtenía el inserto con la zona codificante para Alpha-2, Beta-1 y Gamma-IFN y el vector plasmídico (pBR322 o derivados). Luego se electroeluía en función de tener el inserto de IFN puro, sin el vector.

Simultáneamente, como se indicó arriba, el pTZ19R también se digirió con las mismas enzimas, de manera de poseer extremos compatibles. Estos extremos eran cohesivos y no romos.

Se realizó una reacción de ligación entre el inserto Alpha-2-IFN con extremos Eco RI y Hind III y el pTZ19R también con extremos Eco RI y Hind III, en una proporción de 10 : 1 de inserto a vector, para favorecer la formación del plásmido recombinante. Se usó 1 ng de vector y 10 ng de inserto en total.

Aproximadamente la misma relación de masas fue utilizada para ligar Beta-1-IFN con extremos Bam HI y Sal I y pTZ19R con los mismos extremos. Gamma-IFN con extremos Pst I y pTZ19R también con extremos Pst I, fueron ligados del mismo modo.

La masa se estimaba a partir de corridas electroforéticas en geles de 1 o de 1,2 % de agarosa (fig. 3 y 5) y también con un fluorómetro.

Se transformó con Alpha-2-IFN-pTZ19R (fig. 1 y 2) y Beta-1-IFN-pTZ19R (fig. 3 - 6) respectivamente, en cepas DH5Alpha F' de Escherichia coli; mientras que Gamma-IFN-pTZ19R (fig. 7 y 8) fue utilizado para transformar una cepa Dh5Alpha de Escherichia coli.

Alpha-2-IFN-PTZ19R:

Control de 0 ADN, o sea DH5Alpha F' solo: 0 colonias.

Control de transformación con 1 ng de pTZ sin digerir, es decir circular: 138 colonias azules.

Transformación con el material ligado: 44 colonias blancas y 3 azules.

Eficiencia de la transformación:

$E = \text{unidades formadoras de colonias} / \mu\text{g de ADN} =$   
 $= \text{número de colonias} / \text{masa de ADN transformante}$

$E = 138 \text{ colonias azules} \times 5.000 = 690.000 = 6,9 \times 10^5$

Se multiplica por 5.000, pues se transformó con un quinto de la masa y además se usó 1 ng de pTZ19 para transformar y la eficiencia se calcula por  $\mu\text{g}$  de ADN. O sea se multiplica por 5 y luego por 1000.

Porcentaje de colonias recombinantes =

$\frac{\text{número de colonias recombinantes}}{\text{número de colonias totales}}$

Porcentaje de colonias recombinantes =  $\frac{44 \text{ colonias blancas}}{47 \text{ colonias totales}} = 0,94.$

Beta-1-IFN-pTZ19R:

Control de 0 ADN: 0 colonias.

Control de transformación con 1 ng de pTZ19 sin digerir: 8 colonias azules.

Transformación con material ligado: 53 colonias blancas y 1 colonia azul.

Eficiencia de la transformación =  $8 \times 5.000 = 4 \times 10^4$   
Porcentaje de colonias recombinantes = 53 colonias blancas =  
/ 54 colonias totales  
= 0,98.

Gamma-IFN-pTZ19R:

Control de 0 ADN: 0 colonias.

Control de transformación con 1 ng de pTZ19 sin digerir: 88  
colonias azules.

Transformación con material ligado: 1 colonia blanca y 77  
colonias azules.

Eficiencia de la transformación =  $88 \times 5.000 = 4,4 \times 10^6$

Porcentaje de colonias recombinantes = 1 colonia blanca  
/ 78 colonias totales  
= 0,01.

El bajo porcentaje de colonias recombinantes, puede deberse al corte en un solo sitio (Pst I), lo que permite que el plásmido se vuelva a circularizar.

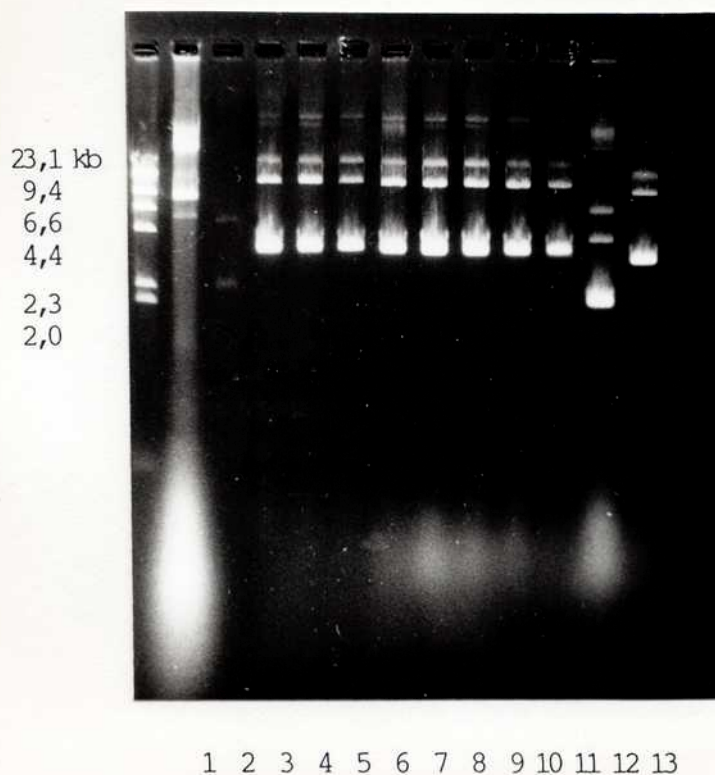


Fig. 1: ADN plasmídico de 10 clones luego de la transformación con Alpha-2-IFN-pTZ19R. 1: 200 ng del bacteriófago Lambda digerido con Hind III. 2: 250 ng de Alpha-2-IFN-pBR322. 3: 25 ng de pTZ19R. 4-13: ADN de 10 clones transformados con Alpha-2-IFN-pTZ19R. Gel de agarosa de 1%.



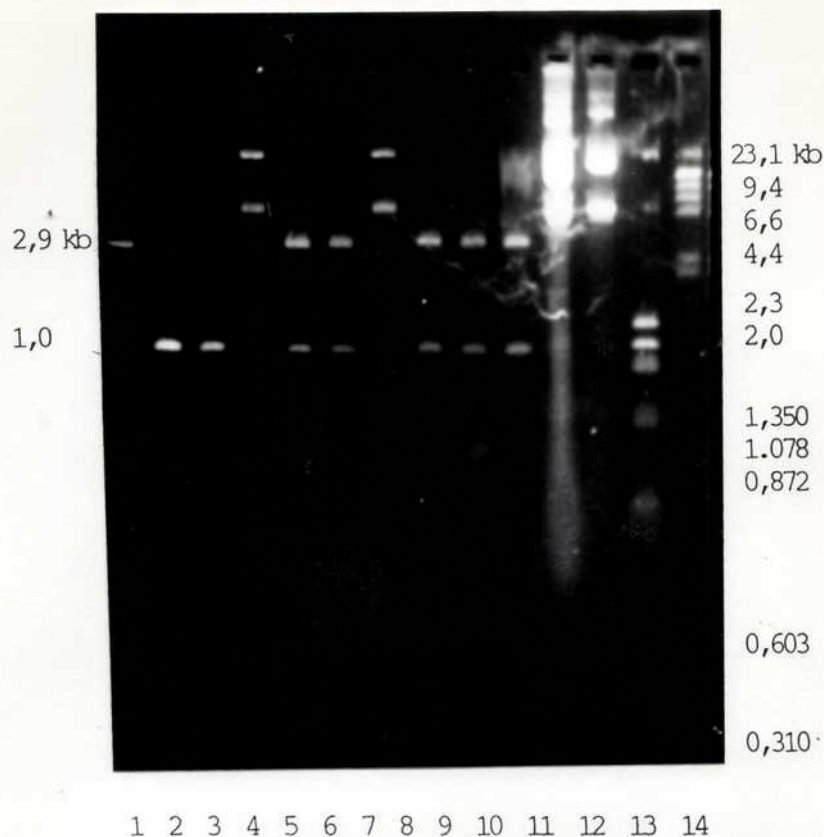


Fig. 2: Comprobación por restricción de la subclonación de Alpha-2-IFN-pTZ19R. 1: pTZ19R digerido con Eco RI y Hind III, ca. 50 ng. 2 y 3: Insertos de Beta-1, ca. 110 ng y Gamma-IFN ca. 60 ng previamente electroeluidos, respectivamente. 4: ADN plasmídico del clon 4, sin digerir, previamente transformado con Alpha-2-IFN-pTZ19R. 5: Digestión enzimática con Eco RI y Hind III del ADN plasmídico del clon de la calle 4. 6: Dilución 1/2 del ADN de la calle 5. 7: ADN plasmídico del clon 5, previamente transformado con Alpha-2-IFN-pTZ19R. 8: Digestión enzimática con Eco RI y Hind III del ADN plasmídico del clon de la calle 7. 9: Dilución 1/2 del ADN de la calle 8. 10: Digestión con las mismas enzimas del ADN plasmídico del clon 6. 11 y 12: ADN plasmídico de los clones 6 y 7 respectivamente. 13 y 14: Bacteriófago PhiX174 digerido con Hae III y Lambda digerido con Hind III, respectivamente. Los clones parecen contener el inserto Alpha-2-IFN, de ca. 1 kb, el clon 7 no se digirió. Gel de agarosa de 1%.

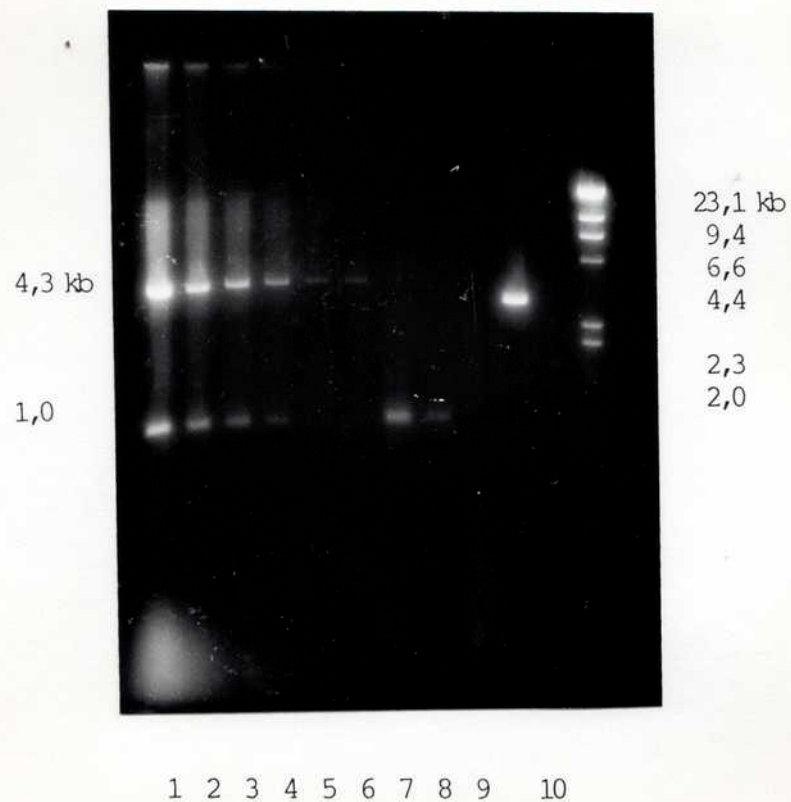
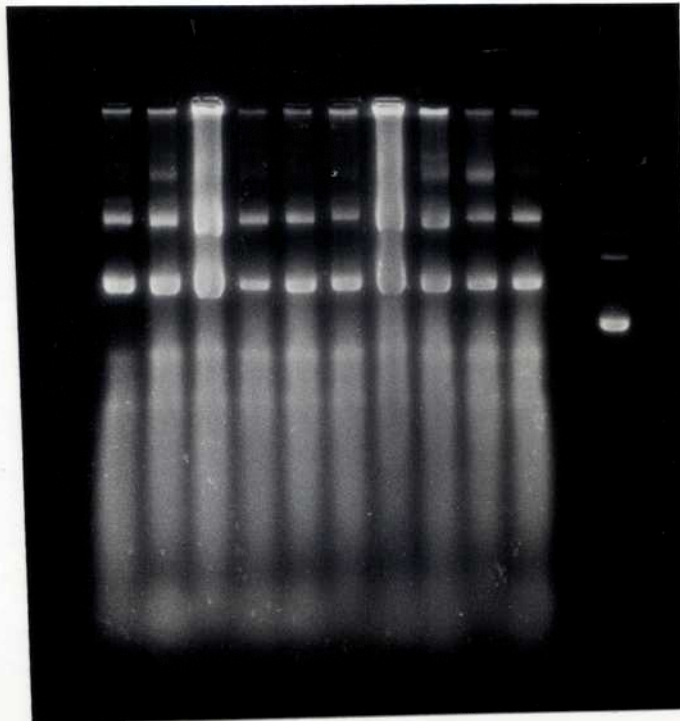
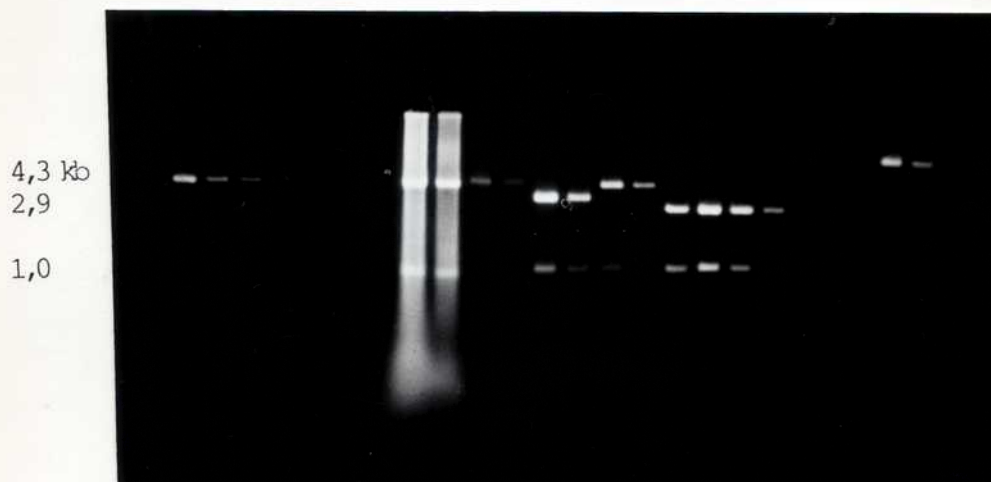


Fig. 3: Calibración de la masa de ADN de Beta-1-IFN electroeluido. 1-6: pAT153-Beta-1-IFN digerido con Bam HI y Sal I para liberar al inserto. En la calle 1 se sembraron 500 ng; en la 2, 250 ng; en la 3, 125 ng; en la 4, 62 ng; en la 5, 31 ng y en la 6, 15 ng. 7: Beta-1-IFN electroeluido, parece haber ca. 60 ng. 8: Una dilución 1/2 del ADN de la calle anterior, parece haber ca. 30 ng. 9: pTZ19R, ca. 125 ng. 10 Lambda Hind III, 250 ng. Gel de agarosa de 1%.



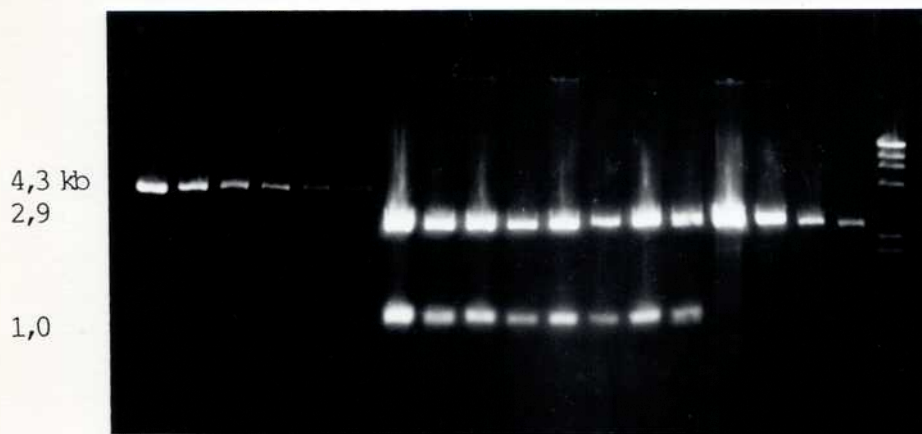
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Fig. 4: ADN de 10 clones luego de la transformación con Beta-1-IFN-pTZ19. 1-10: ADN de clones 1 a 10, respectivamente. Se observa un peso molelcular mayor que el del pTZ19 solo. 11: pTZ19, 500 ng. Gel de agarosa de 1%.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Fig. 5: Calibración de la masa de ADN plasmídico. 1-7: pBR322 digerido con Bam HI (sitio único). En la calle 1 se sembraron 750 ng; en la 2, 500 ng; en la 3, 250 ng; en la 4, 125 ng; en la 5, 62 ng; en la 6, 31 ng y en la 7, 15 ng. 8 y 10: Dos extracciones diferentes de Alpha-2-IFN-pBR322 digeridos con Eco RI y Hind III. 12: Extracción de Beta-1-IFN-pAT153 digerido con Bam HI y Sal I. 14: Gamma-IFN-pAT153 digerido con Pst I. 16 y 18: Digestión Bam HI y Sal I de los clones 1 y 6 respectivamente, transformados con Beta-1-IFN-pTZ19R. Las calles 9, 11, 13, 15, 17 y 19 son diluciones al 1/2 de las calles antecesoras, respectivamente. 20: Lambda Hind III, ca. 100 ng. 21: pTZ19R digerido con Bam HI, ca. 600 ng. 22: Dilución al 1/2 del ADN de la calle anterior. Gel de agarosa de 1%.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Fig. 6: Comprobación por restricción de la subclonación de Beta-1-IFN-pTZ19R y además calibración de su masa plasmídica. 1-6: pBR322 digerido con Bam HI (sitio único). Se sembraron en la calle 1, 500 ng; en la 2, 250 ng; en la 3, 125 ng; en la 4, 62 ng; en la 5, 31 ng y en la 6, 15 ng. 7 y 8: ADN plasmídico del clon 1. 9 y 10: clon 4. 11 y 12: clon 5. 13 y 14: clon 6. 15 y 16: pTZ19R digerido con Bam HI (sitio único). 17 y 18: pUC18 digerido con Bam HI (también es un sitio único). 19: Lambda Hind III como marcador de peso molecular. El segundo punto es siempre una dilución al medio del primero. Gel de agarosa de 1%.



Fig. 7

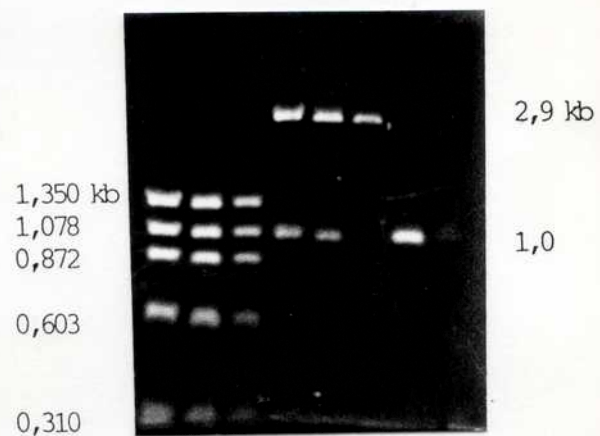


Fig. 8

Fig. 7: Electroelución de Gamma-IFN. 1: Gamma-IFN-pAT153 digerido con Pst I, 500 ng. 2: Lambda Hind III, 200 ng. Se electroeluyó una banda de 1 kb aproximadamente que presuntamente estaba a la misma altura que la que señala la flecha, pero que no fue irradiada al UV, para ello se cortó el gel. Gel de agarosa de 1 %.

Fig. 8: Comprobación por restricción de la subclonación del Gamma-IFN-pTZ19R y además calibración de su masa plasmídica. 1, 2 y 3: PhiX174 digerido con Hae III, 800, 400 y 200 ng respectivamente. 4 y 5: Gamma-IFN-pTZ19R digerido con Pst I, que libera el inserto, 40 y 20 ng respectivamente. 6: pTZ19R digerido con Pst I (sitio único), 50 ng. 7: Beta-1-IFN electroeluido, o sea el inserto solo, de aproximadamente 1.000 pb, de similar tamaño al Gamma-IFN. La banda de 1 kb de PhiX174 coincide con el tamaño de los insertos de Beta-1 y Gamma-IFN. Esta banda representa el 20% de la masa del fago y se puede usar para calibrar la masa del inserto. (Coincide con calibración hecha con fluorómetro). Gel de agarosa de 1,2%.

## Hibridación molecular:

Se realizó el estudio de los patrones de hibridación de ADN de una muestra de individuos normales y de una muestra de individuos leucémicos, usando como sondas de hibridación molecular los genes Alpha-2, Beta-1 y Gamma-IFN previamente clonados en pTZ19.

El ADN humano de diferentes muestras de sangre periférica analizadas, provino de los centros hematológicos de la Academia Nacional de Medicina y del Hospital Escuela Gral. San Martín. Esta sangre proviene de dadores voluntarios sanos.

En los centros hematológicos la sangre fue analizada para comprobar ausencia de HIV, hepatitis B, Chagas, sífilis y en algunos casos brucelosis. Sólo se trabajó con muestras de sangre sin estas enfermedades.

Las muestras de sangre leucémica fueron obtenidas de pacientes con tricoleucemia, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica y leucemia linfocítica aguda y cedidas gentilmente por la Dra Irene Larripa, por la Dra. Lucía Barazuti y por el Dr. Leonardo Satz (ver materiales y métodos)!

Se extrajo y purificó el ADN de estas muestras. Se determinó su concentración con un fluorómetro o con un espectrofotómetro y también por aproximación comparando con ADN de masa conocida en geles de agarosa de 0,5%, o sea en condiciones de mejor resolución de ADN de alto peso molecular. En los geles se comprobó además la integridad del ADN, pues se considera un ADN íntegro o muy poco degradado cuando se encuentra por encima de la banda de 23 kb del bacteriófago Lambda digerido con Hind III (fig. 9).

Se lo digirió con diferentes enzimas de restricción. Se digirieron aproximadamente 10 ug de ADN por individuo. Una pequeña alícuota de aproximadamente 0,5 ug se corrió en un gel en forma rápida, para observar si la digestión fue completa. Si era necesario se agregaba más enzima y se dejaba unas horas más para que se completase la digestión. En algunos casos fue necesario volver a limpiar el ADN, pues casi no se había digerido.

Se corrieron geles de agarosa y luego se transfirió el ADN de los geles a membranas de nylon (Southern, 1975, modificado).

Antes de fijar por calor el ADN a la membrana, se observó al UV la misma. Se observa el ADN digerido como un "chorreado" de color debido al bromuro de etidio remanente. También se observa al UV si los geles están vacíos. Luego, se fija el ADN a los filtros.

Estas membranas o filtros de nylon fueron posteriormente prehibridadas e hibridadas con la sonda correspondiente, o bien se guardaron en un lugar seco.

Para hibridar sólo se utilizó el inserto con el ADN de Alpha, Beta o Gamma-IFN y no el plásmido recombinante entero. Por ello, se digería en cada caso al plásmido con las enzimas que liberan al inserto, las mismas que fueron utilizadas para subclonar en pTZ19. Luego se corría un gel para electroeluir la banda de interés, o sea la del ADN de interferón.

Se decidió hibridar sólo con el inserto para evitar la hibridación cruzada que se produce entre el vector y el ADN humano, cuando éste está contaminado con ADN de origen bacteriano (Ambinder et al., 1986). Si bien las muestras no estaban contaminadas, se decidió evitar el riesgo de aparición de bandas espurias.

El ADN del inserto solo, o sea la sonda de hibridación molecular, fue radioactivamente marcado por el método de extensión por "random primers". En la mayoría de los casos este ADN fue marcado conjuntamente con el ADN del bacteriófago Lambda digerido previamente con la endonucleasa Hind III. Esto se hizo para que hibridase con el marcador de peso molecular también presente en el filtro (sembrado en el gel). El marcador usado fue una mezcla de Lambda Hind III y de Lambda Sma I, 5 ng de cada uno.

Se utilizaba 100 a 200 ng de sonda radioactivamente marcada por cada 10 ml de solución de hibridación.

La hibridación se realizaba durante aproximadamente 20 horas con agitación, a 65 C y 1 x SSC, lo que determinaba un  $T_m = -20$ , o sea se exigía 80 % o más de homología.

Luego se lavaba de acuerdo a la homología requerida. Cuando se utilizaba Beta-1 o Gamma-IFN, se exigía máxima homología,  $T_m - 3$ , pues estos son genes de copia única. Cuando se hibridaba con Alpha-2-IFN, se exigía en el lavado la misma homología que al



hibridar, o sea 80% o más de homología. Esto se hacía en función de detectar a los otros miembros de la familia Alpha, en particular a los de la clase I, pues con la clase II hay menor homología.

Se exponían placas de radiografía a los filtros y se dejaban a - 20 C o a -56 C, durante 3 días. Luego se revelaban las placas y generalmente se volvía a exponer otra placa radiográfica durante aproximadamente un mes a la misma temperatura.

Se sembraron en algunos geles, controles positivos de hibridación, 10 ng y 1 ng de sonda molecular sin marcar radioactivamente.

Se controló la identidad de las sondas al controlar el patrón de hibridación con nuestras sondas, con patrones de hibridación conocidos, de ADN digerido con ciertas enzimas de restricción. Esto se realizaba con cada preparativa nueva de sonda molecular.



23,1 kb

Fig. 9a

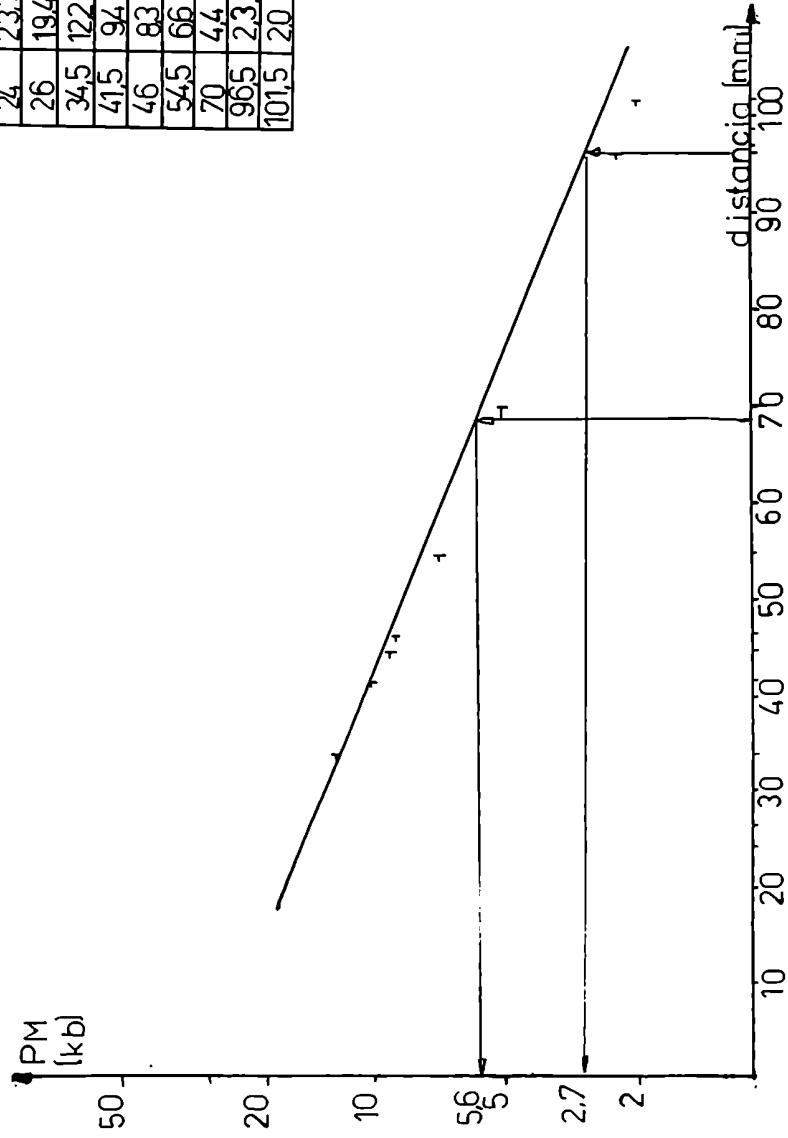


Fig. 9b

Fig. 9a: Comprobación de la identidad del ADN genómico humano. 1-17: ADN de 17 muestras diferentes, luego de su purificación. 18 y 19: ADN de timo de ternera (BRL), 1 y 5 ug respectivamente, un poco degradado. 20: Lambda Hind III, 200 ng. El ADN genómico debe ubicarse por encima de la banda de 23 kb, o sea la banda superior, del Lambda Hind III, para ser considerado ADN íntegro, o poco degradado. 9b: 19 muestras de ADN humano diferentes, luego de su purificación. Geles de 0,5%.

mm	kb
24	231
26	194
34,5	122
41,5	94
46	83
54,5	66
70	44
96,5	23
101,5	20

Curva de Calibración Bgl II  $\alpha$ -IFN



## Hibridación de ADN de Alpha-2-IFN con ADN humano:

### Bgl II:

Se digirió el ADN con diferentes enzimas, en función de descubrir polimorfismos nuevos. Como ya se dijo antes, los genes Alpha-IFN forman una familia multigénica, formada a su vez por dos subfamilias o clases: I y II. La sonda molecular aquí utilizada Alpha-2-IFN, pertenece a la clase I.

Se hibridó el ADN a  $T_m - 20$  o sea exigiendo como mínimo un 80 % de homología. En esas condiciones sólo hibridan los miembros de la clase I, pues las clases I y II tienen un 70 % de homología, entre ellas.

Se halló un polimorfismo nuevo, al digerir el ADN, con la endonucleasa Bgl II (fig. 10 a). En algunos individuos se observó la ausencia de una banda de aproximadamente 5,3 kb y en otros se observó la ausencia de una banda de alrededor de 2,7 kb. Por último, en algunos individuos se observaba ausencia de las dos bandas (fig. 11 y 13). La mayoría de los individuos analizados presentaban ambas bandas (fig. 12).

El tamaño de las bandas fue estimado a partir de una curva de calibración, realizada con los pesos moleculares del Lambda Hind III más Lambda Sma I (ver página anterior).

Parecen ser dos loci polimórficos diferentes. Ambos segregan en forma dominante, es decir que el polimorfismo se manifiesta como presencia o ausencia de bandas. Por otra parte no se pudo distinguir entre los homocigotas 5,3 +/5,3 + kb y los heterocigotas 5,3 +/5,3 - . Lo mismo sucedió con el locus de 2,7 kb.

Se analizaron 62 individuos normales y 22 individuos leucémicos. De los 22 leucémicos estudiados, 6 eran tricoleucémicos y el resto poseían leucemia mieloide crónica.

Se realizó para cada locus, una prueba de contingencia para determinar si la diferencia entre las frecuencias genotípicas era significativa.

Locus de 5,3 kb

	Normales	Leucémicos	
5,3 +/- kb +	59 a	21 c	80 a + c
5,3 -/5,3 - kb	3 b	1 d	4 b + d
	62 a + b	22 c + d	84 = N

N = tamaño de la muestra

$$\chi^2 = \frac{(ad-bc)^2 - 0,5 N}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)} =$$

$$\chi^2 = \frac{(59 - 21 \times 3)^2 - 42}{84 / 62 \times 80 \times 22 \times 4} = 0,2779$$

La chi cuadrado calculada, es inferior al valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5%:  $0,2779 < 3,84$

No rechazo la hipótesis que dice que las frecuencias no son significativamente diferentes.

Para estar seguros que las muestras de leucémicos y normales no son significativamente diferentes, luego de realizar la prueba de contingencia, es conveniente realizar una prueba de heterogeneidad, para determinar si las muestras son homogéneas. Puede ocurrir que dos muestras posean las mismas frecuencia alélicas, pero diferentes frecuencias genotípicas, es decir son muestras heterogéneas.

Para poder aplicar la prueba de heterogeneidad, es necesario discriminar las diferentes clases genotípicas, homocigotas y heterocigotas. En este caso no fue posible distinguir entre la clase homocigota dominante, cuando la banda estaba presente con los dos alelos, uno de cada cromosoma, de la clase heterocigota, que es cuando solo un alelo estaba presente.

No obstante, se decidió agrupar en una sola clase a leucémicos y normales, tomando en cuenta solo la prueba de contingencia, en función de aumentar el tamaño de la muestra total.

5,3 +/- kb	5,3 - / 5,3 - kb	
80	4	N = 84

N = 84

Suponiendo que hubiera un equilibrio de Hardy Weinberg, se calculó las frecuencias alélicas:

$$\hat{q}^2 = 4 / 84 = 0,0476 \quad \text{o sea que } \hat{q} = (0,0476)^{1/2} = 0,2182$$

$\hat{q}$  = frecuencia del alelo de 5,3 kb -

$$\hat{p} = 1 - \hat{q} = 0,78$$

$\hat{p}$  = frecuencia del alelo de 5,3 kb +

$$\text{E.S.} = \text{Error standard} = ((\hat{p} \times \hat{q}) / 2N)^{1/2}$$

$$\text{E.S.} = 0,03$$

Una vez estimadas las frecuencias, se puede calcular el contenido de información polimórfico (P.I.C.).

P.I.C. = contenido de información polimórfico =

$$\text{P.I.C.} = 1 - p_1^2 - p_2^2 - 2 p_1 p_2$$

$$1 - 0,78^2 - 0,22^2 - 2 (0,78) (0,22) = 0,28$$

P.I.C. = 0,28

Si  $0,5 > P.I.C. > 0,25$  el P.I.C. es considerado como razonablemente informativo. Es decir que en este caso lo es.

Locus de 2,7 kb

Se realizó la prueba de contingencia para el locus de 2,7 kb.

	Normales	Leucémicos	
2,7 +/- kb	57	19	76
2,7 -/2,7 - kb	5	3	8
	62	22	84 = N

$$\chi^2 = 0,1171$$

La chi cuadrado calculada, es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5%:  $0,1171 < 3,84$

No rechazo la hipótesis que dice que las frecuencias no son significativamente diferentes.

Al igual que con el locus anterior, se agrupan juntas ambas muestras, aumentándose así el tamaño total y se las trata como a una sola muestra

2,7 +/- kb	2,7 -/2,7 - kb	
76	8	N = 84

N = tamaño de la muestra

Suponiendo que estuviesen en equilibrio de Hardy Weinberg, calculo las frecuencias alélicas:

$$\hat{q}^2 = 8 / 84 = 0,0952 \text{ o sea } \hat{q} = 0,3085$$

$$\hat{q} = \text{frecuencia del alelo de 2,7 kb -}$$

$$\hat{p} = 1 - \hat{q} = 0,6915$$

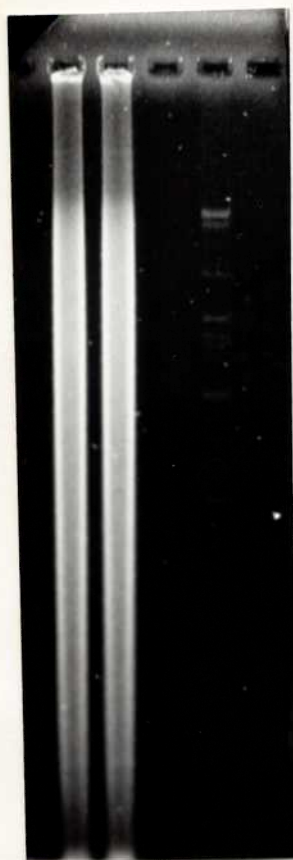
$$\hat{p} = \text{frecuencia del alelo de 2,7 kb +}$$

$$\text{E.S.} = \text{Error Standard} = 0,03$$

$$\text{P.I.C.} = 0,34.$$

El P.I.C. es también en este caso, razonablemente informativo.

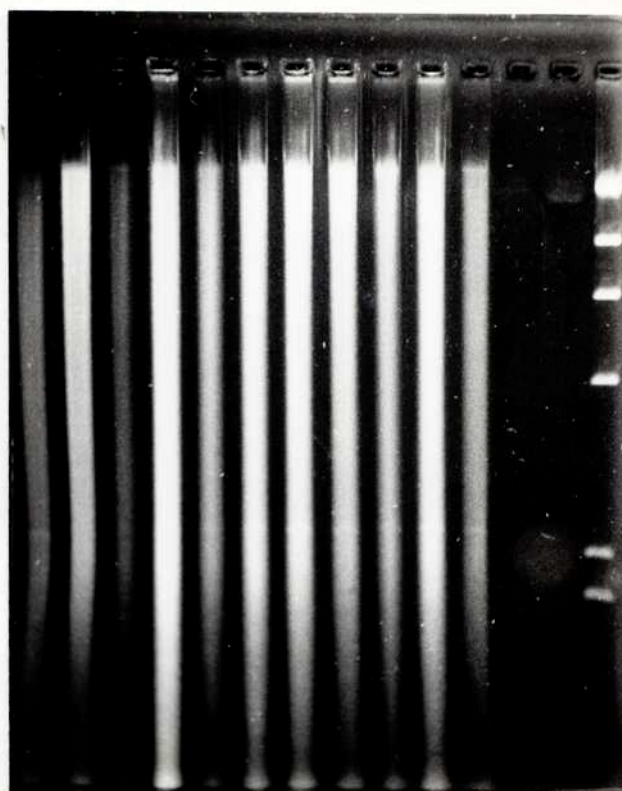




23,1 kb

1,2 3

Fig. 10a



23,1 kb

9,4

6,6

4,4

2,3

2,0

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Fig. 10 b

Fig. 10 a: ADN humano digerido con Bgl II. 1 y 2: ADN del individuo nro.: 80, el mismo ADN en ambas calles. 3: Mezcla de Lambda Hind III y de Lambda Sma I. Gel de agarosa de 0,5%. 10 b: ADN humano digerido con Msp I. 1-11: ADN de individuos 332-342. 12: Beta-IFN, inserto solo, 10 ng. 13: Lamda Hind III, 200 ng. Gel de agarosa de 0,8%.

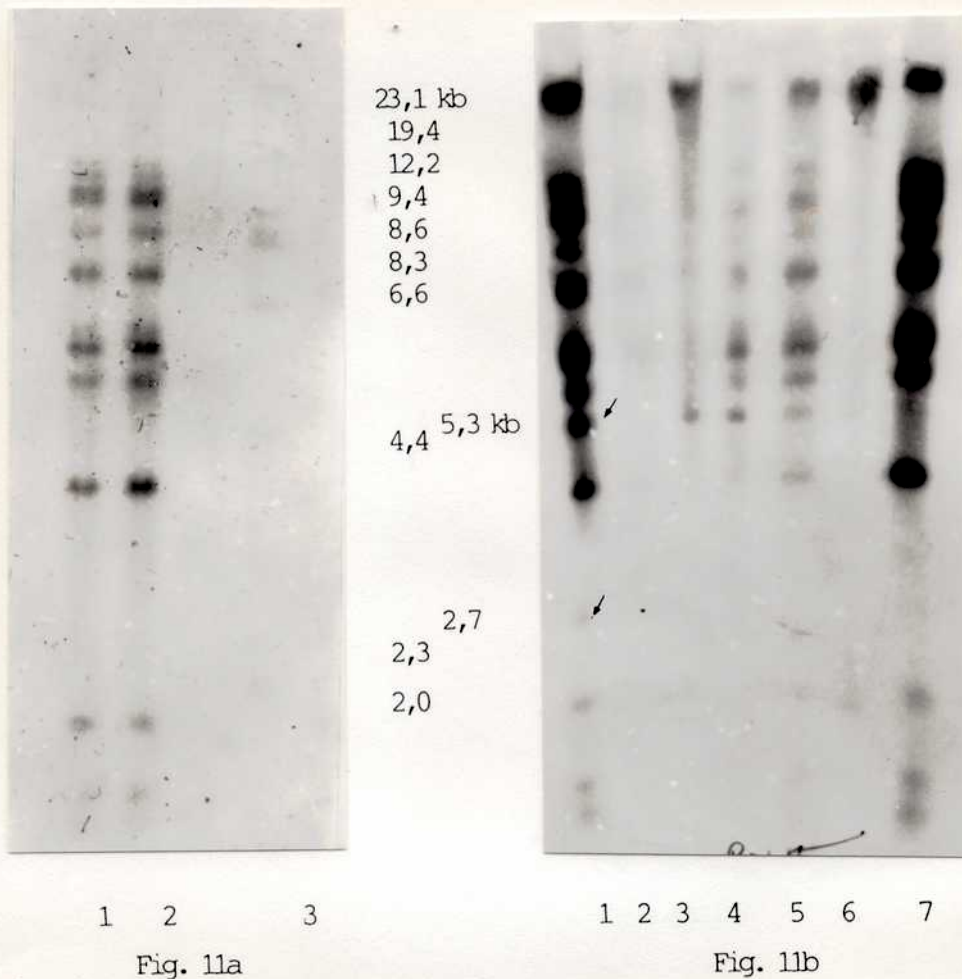


Fig. 11: Autorradiografías correspondientes a la hibridación entre Alpha-2-IFN y ADN humano normal, restringido con Bgl II. 11a: "Southern" correspondiente al gel de la figura 10a. 1 y 2: ADN de individuo nro.: 80. 3: Lambda Hind III más Lambda Sma I, como control de peso molecular. 11b: 1-7: ADN de individuos nro.: 64, 105, 126, 127, 128, 148 y 150, respectivamente. Observese presencia o ausencia de las bandas de 5,3 y 2,7 kb. Geles de agarosa de 0,5%.

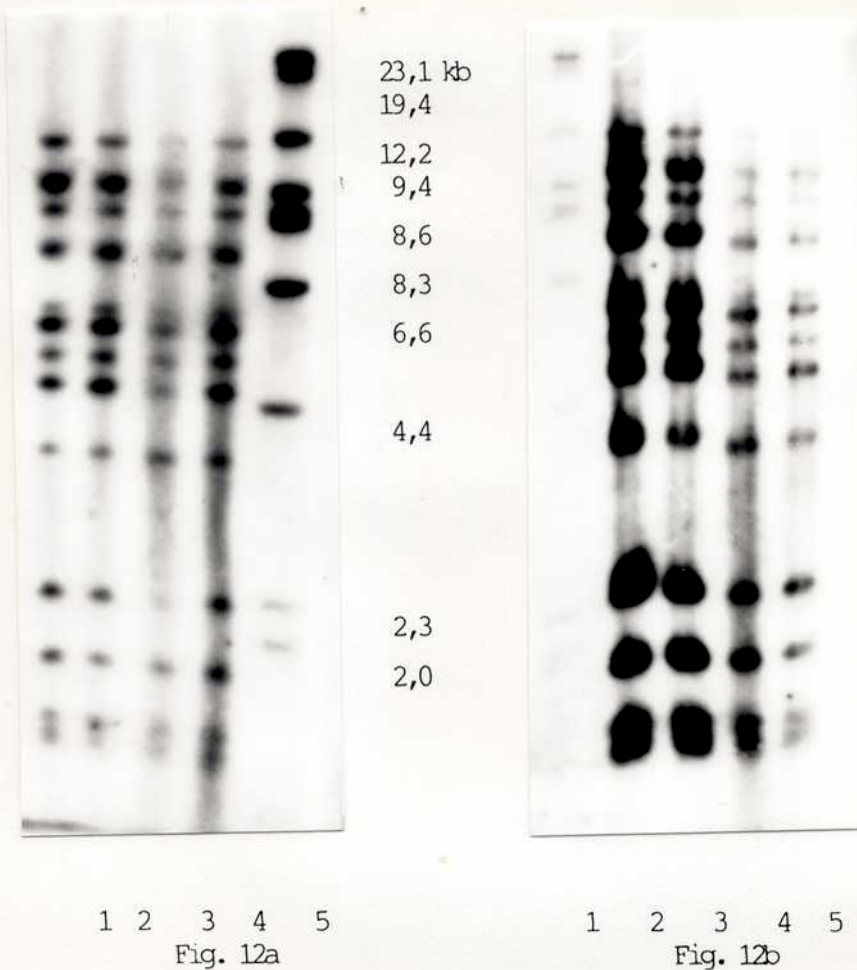


Fig. 12: Autorradiografías correspondientes a la hibridación entre Alpha-2-IFN y ADN humano normal, digerido con Bgl II. 12a: 1-4: ADN de individuos nro.: 383, 385, 356 y 360 respectivamente. 5: Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng, como control de peso molecular. 1: El mismo control de peso molecular que en 11a. 12b: 2-5 ADN de individuos nro.: 106, 117, 39 y 116, respectivamente. Observese el patrón de bandas más frecuente, con la presencia de las bandas de 5,3 y 2,7 kb. Geles de agarosa de 0,5%.

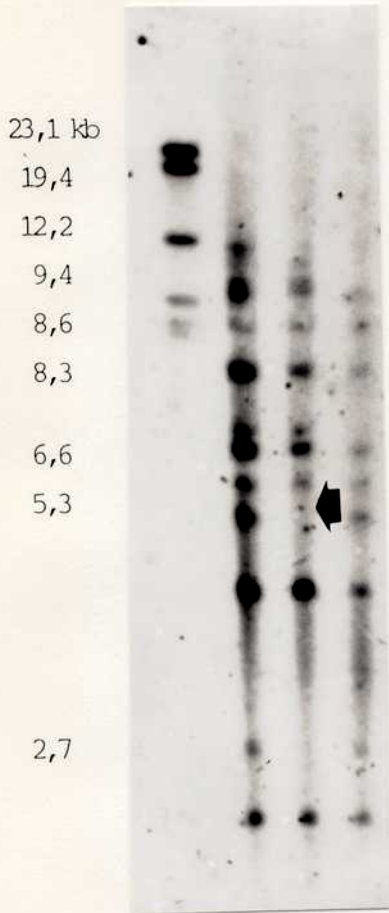


Fig. 13a

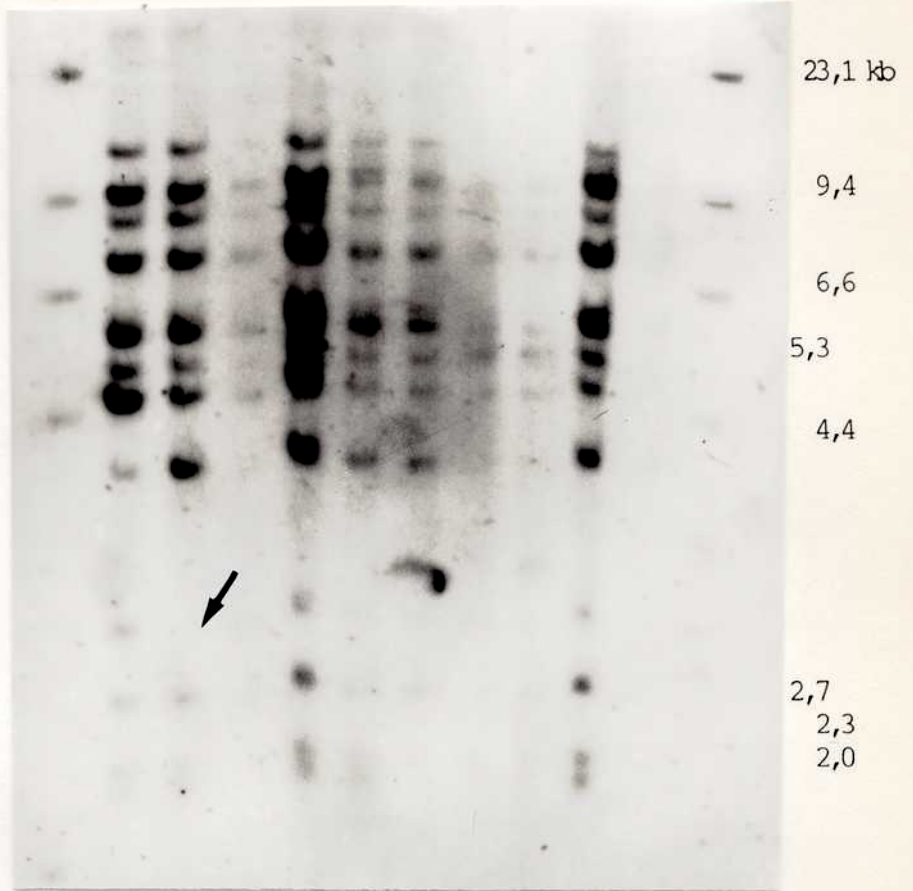


Fig. 13b

Fig. 13: Autorradiografías correspondientes a la hibridación de ADN humano de pacientes leucémicos digerido con Bgl II con Alpha-2-IFN. 13 a: 1: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 2-4: ADN de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), individuos nro.: 650, 689 y 579. 13b: 1: Lambda Hind III como control de peso molecular 2-4: ADN de pacientes con LMC, individuos nro.: 620, 449 y 684. 5-9: ADN de pacientes con tricoleucemia, individuos nro. 1, 2, 3, 4 y 5. 10: ADN de un individuo normal nro.: 236. El patrón de bandas observado no difiere significativamente del de los individuos normales. Observese presencia o ausencia de las bandas de 2,7 y 5,3 kb. Geles de agarosa de 0,5%.

Msp I:

Se confirmaron para nuestra población, 3 loci polimórficos previamente descritos para Msp I (fig. 10 b) y Alpha-2-IFN (Ohlsson et al., 1985; Von Gabain et al., 1986).

Se analizaron 41 individuos normales (fig. 14 y 15) y 26 individuos leucémicos (fig. 16 y 17). De los 26 leucémicos estudiados, 6 eran tricoleucémicos, 3 sufrían de leucemia linfocítica crónica y 17 sufrían de leucemia mieloide crónica.

Se realizó para cada locus, una prueba de contingencia para determinar si la diferencia entre las frecuencias alélicas observadas, entre leucémicos y normales, era significativa. En los casos en que fue posible se realizó una prueba de heterogeneidad, entre las 2 muestras.

Locus 8,6 y 7,5 kb:

	Normales	Leucémicos	
8,6 kb	50	29	79
7,5 kb	32	23	55
	82	52	134 = 2 N

N = tamaño de la muestra

$$X^2 = 0,1738$$

La chi cuadrado calculada es inferior al valor de tablas, con un grado de libertad y par un nivel de significación del 5%:  $0,1738 < 3,84$ .

No rechazo la hipótesis que dice que las frecuencias alélicas no son significativamente diferentes.

Como ya se explicó más arriba, para el polimorfismo hallado con Bgl II, es necesario realizar una prueba de heterogeneidad antes de juntar los datos de los individuos normales y de los individuos leucémicos.

Este locus parece segregar en forma codominante. Por otra parte, tanto en normales como en leucémicos, estaba ausente la clase homocigota para el alelo de 7,5 kb. Se aplicó entonces, el índice F de Nei (1987, pág 166), que se utiliza cuando una de las clases homocigotas es menor que 1.

$$F = (H_e - H_o) / H_e$$

$H_e$  = nro. de heterocigotas

$H_o$  = nro. de homocigotas de la clase que esté presente

Individuos normales:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas
8,6/8,6 kb	8,6/7,5 kb	7,5/7,5 kb
9	32	0

$N = 41$

$$F = (32-9) / 32 = 0,7187$$

$$X^2_{\text{normales}} = N \times F^2 = 41 (0,7187)^2 = 21,1777$$

(1 grado de libertad)

Individuos leucémicos:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas
8,6/8,6 kb	8,6/7,5 kb	7,5/7,5 kb
3	23	0

$$N = 26$$

$$F = 0,8695$$

$$X^2 \text{ leucémicos} = 26 \times (0,8695)^2 = 19,6568$$

(1 grado de libertad)

Agrupando juntos normales y leucémicos:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas
8,6/8,6 kb	8,6/7,5 kb	7,5/7,5 kb
12	55	0

$$N = 67$$

$$F = 0,7818$$

$$X^2 \text{ global} = 67 \times (0,7818)^2 = 40,9511$$

(1 grado de libertad)

$$X^2 \text{ total} = X^2 \text{ normales} + X^2 \text{ leucémicos} = 21,1777 + 19,6568$$

(2 grados de libertad)

$$X^2 \text{ total} = 40,8345$$

(2 grados de libertad)

$$X^2 \text{ heterogeneidad} = X^2 \text{ total} - X^2 \text{ global}$$

$$X^2 \text{ heterogeneidad} = 40,8345 - 40,9511 = - 0,1166$$

Se restan los grados de libertad.

La chi cuadrado calculada, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 %, es inferior al valor de tablas: -  $0,1166 < 3,84$ .

No rechazo la hipótesis que dice que las frecuencias alélicas no son significativamente diferentes.

Agrupo normales y leucémicos y calculo las frecuencias alélicas:

$$\text{frec (8,6 kb)} \quad \text{frec de } 8,6/8,6 \text{ kb} + 1/2 \text{ frec de } 8,6/7,5 \text{ kb}$$

$$\text{frec (8,6 kb)} = 0,1791 + 0,5 \times 0,8208 = 0,5894$$

$$\text{frec (7,5 kb)} = 1 - \text{frec (8,6 kb)} = 0,4106$$

$$\text{E.S.} = 0,04$$

Según la ley de Hardy Weinberg:

$p^2$	$2 p q$	$q^2$
$(0,5894)^2$	$2 (0,5894) (0,4106)$	$(0,4106)^2$
0,3474	0,4840	0,1686

Nro. de genotipos esperado:

$$p^2 = 67 (0,3474) = 23,2758$$

$$2 p q = 67 (0,484) = 32,428$$

$$q^2 = 67 (0,1686) = 11,2962$$

$$X^2 = 32,4703$$



La chi cuadrado calculada es mucho mayor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % : 32,4703 > 3,84.

La muestra no está en equilibrio de Hardy Weinberg.

Por su parte, el contenido de información polimórfico resultó ser razonablemente informativo.

$$P.I.C.: \quad 1 - \frac{p_1^2}{1} - \frac{p_2^2}{2} - 2 \frac{p_1 p_2}{2}$$

$$p_1 = \text{frec (8,6 kb)} \quad p_2 = \text{frec (7,5 kb)}$$

$$P.I.C. = 0,37$$

Este valor indica un contenido de información polimórfico razonablemente informativo.

Locus 11,3 y 3,1 kb:

Prueba de contingencia:

	Normales	Leucémicos	
11,3/-- kb	31	23	54
3,1/3,1 kb	10	3	13
	41	26	67 = N

N = tamaño de la muestra total

No se pudo distinguir entre los individuos que eran homocigotas para 11,3 kb y los heterocigotas 11,3/3,1 kb y por ello se los agrupó en la categoría 11,3/-- kb.

$$\chi^2 = 0,9591$$

La chi cuadrado calculada, es inferior al valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 %:  $0,9591 < 3,84$ .

No rechazo la hipótesis que dice que las frecuencias genotípicas (fenotípicas) de leucémicos y normales, no son significativamente diferentes.

No se pudo realizar la prueba de heterogeneidad pues no se podían distinguir las 3 clases genotípicas en juego. Se decidió agrupar juntos normales y leucémicos, para aumentar el tamaño de la muestra total.

11,3/-- kb	3,1/3,1 kb	
54	13	N = 67

N = tamaño de la muestra

Suponiendo que hubiera equilibrio de Hardy Weinberg:

$$q = \text{frec} (3,1/3,1 \text{ kb}) = 0,1940$$

$$q = \text{frec} (3,1 \text{ kb}) = (0,1940)^{1/2} = 0,4404$$

$$p = \text{frec} (11,3 \text{ kb}) = 1 - q = 0,5596$$

$$E.S. = 0,0429$$

$$P.I.C. = 1 - \frac{2}{1} p - \frac{2}{2} p - 2 \frac{2}{1} p \frac{2}{1} p$$

P.I.C. = 0,37

Este valor indica un contenido de información polimórfico razonablemente informativo.

Locus 7,1 + y 7,1 - kb:

Prueba de contingencia:

	Normales	Leucémicos	
7,1 +/- kb	17	16	33
7,1 -/7,1 - kb	24	10	34
	41	10	67 = N

N = tamaño de la muestra total

No se pudo distinguir entre los individuos que eran homocigotas 7,1 +/7,1 + kb y los heterocigotas 7,1 +/7,1 - kb y por eso se los agrupó en la categoría 7,1 +/- kb.

$$\chi^2 = 1,8251$$

La chi cuadrado calculada, es inferior al valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5%:  $1,8251 < 3,84$ ,

No rechazo la hipótesis que dice que las frecuencias genotípicas (fenotípicas) no son significativas.

No se pudo realizar la prueba de heterogeneidad por la imposibilidad de distinguir las 3 clases genotípicas. Se juntaron entonces los resultados de las dos muestras en una sola.

7,1 +/- kb

7,1 -/7,1 - kb

33

34

N = 67

N = tamaño de la muestra

Suponiendo que hubiese equilibrio de Hardy Weinberg:

$$q^2 = \text{frec. (7,1 -/7,1 - kb)} = 0,5075$$

$$q = \text{frec. (7,1 - kb)} = (0,5075)^{1/2} = 0,7124$$

$$p = \text{frec. (7,1 + kb)} = 1 - q = 0,2876$$

$$E.S. = 0,0391$$

$$P.I.C. = 0,3259$$

Nuevamente, el contenido de información polimórfico es razonablemente informativo.

Se digirió el ADN humano normal, con otras enzimas en busca de polimorfismo. Se digirió ADN de 9 individuos aproximadamente, con las endonucleasas Bcl I, Eco RV, Xba I y Sst I. Todos estos sistemas resultaron ser monomórficos cuando se usó como sonda molecular de hibridación, Alpha-2-IFN (fig. 18 y 19).

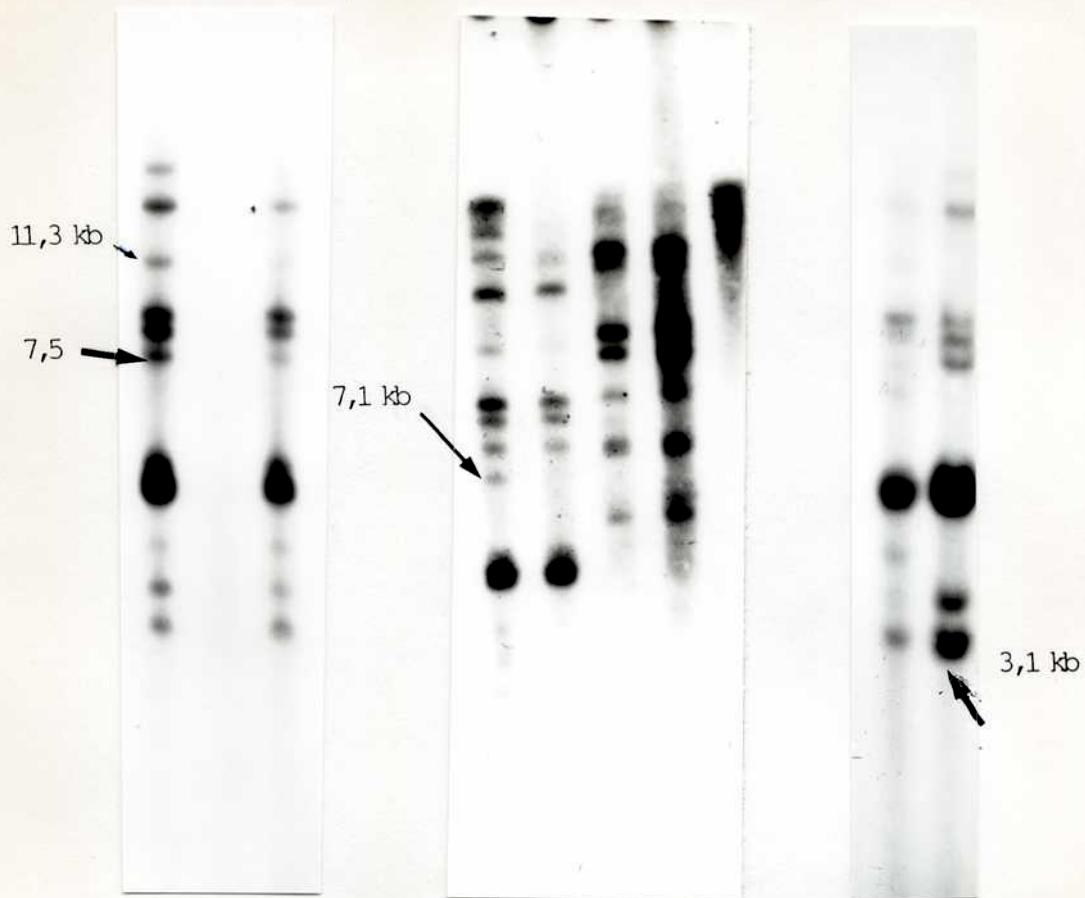


Fig. 14a

Fig. 14b

Fig. 14c

Fig. 14: Autorradiografías correspondientes a la hibridación entre Alpha-2-IFN y ADN humano normal, digerido con Msp I. 14a: 1 y 2: ADN de individuos nro.: 217 y 199. 14b: 1-2: ADN de un individuo normal, nro.: 62 y ADN de un paciente de tricoleucemia, respectivamente, ambos digeridos con MspI. 3 y 4: los mismos individuos digeridos con Sst I, que resultó ser monomórfica para Alpha-IFN. 14c: 1 y 2: ADN de individuos nro.: 321 y 333. Geles de agarosa de 0,5 %.

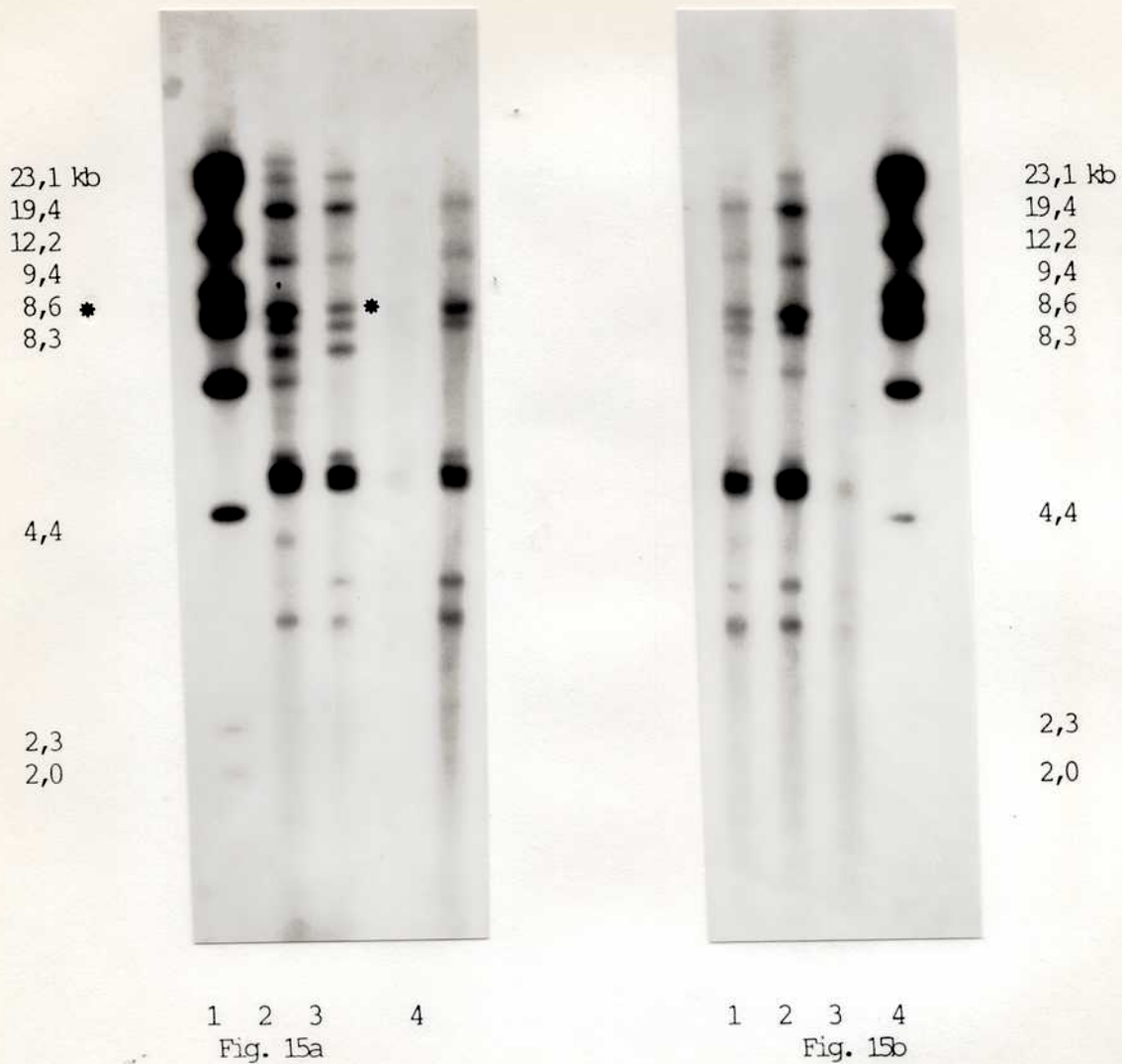


Fig. 15: Autorradiografías correspondientes a la hibridación entre Alpha-2-IFN y ADN humano normal, digerido con Msp I  
 15a: 1: Control de peso molecular, Lambda HInd III, 5 ng, más Lambda Sma I 5 ng. 2-4: ADN de individuos nro.: 362, 363, 364 y 366. 15b: 1-3: ADN de individuos nro.: 390, 391 y 394. 4: Control de peso molecular igual al de la fig. 14d. Observe las bandas de 11,3, 7,1 y 7,5 kb. Geles de agarosa de 0,5 %.

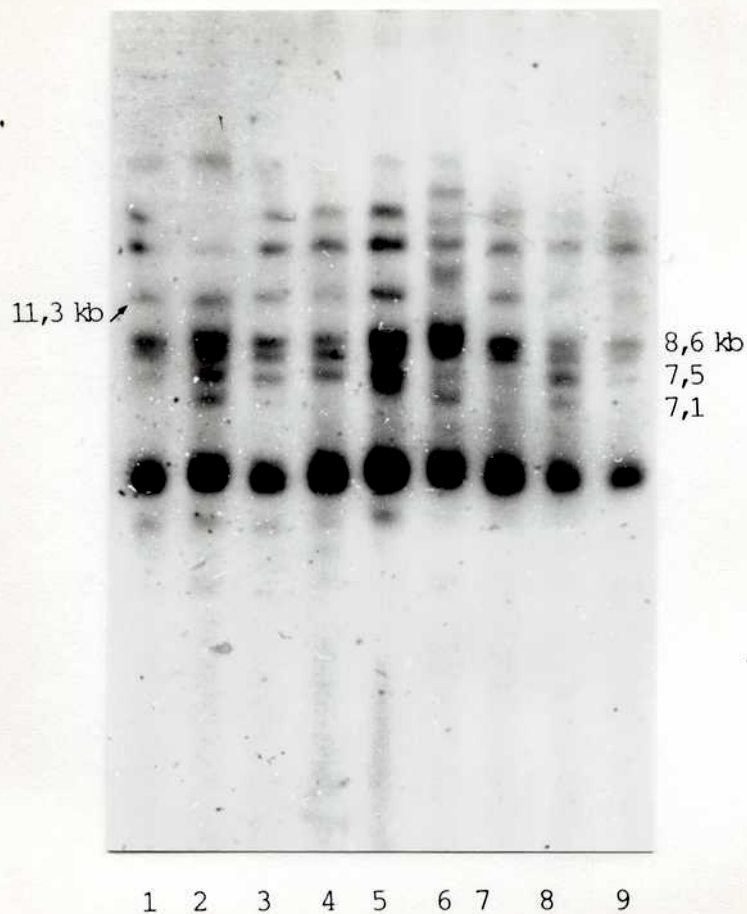


Fig. 16: Autorradiografía correspondiente a la hibridación entre Alpha-2-IFN y ADN humano leucémico digerido con Msp I. 1-9: ADN de individuos con leucemia mieloide crónica, nro.: 655, 620, 610, 652, 639, 449, 589, 6 y 579. El patrón de bandas no difiere significativamente, del hallado en los individuos normales. Gel de agarosa de 0,5%.

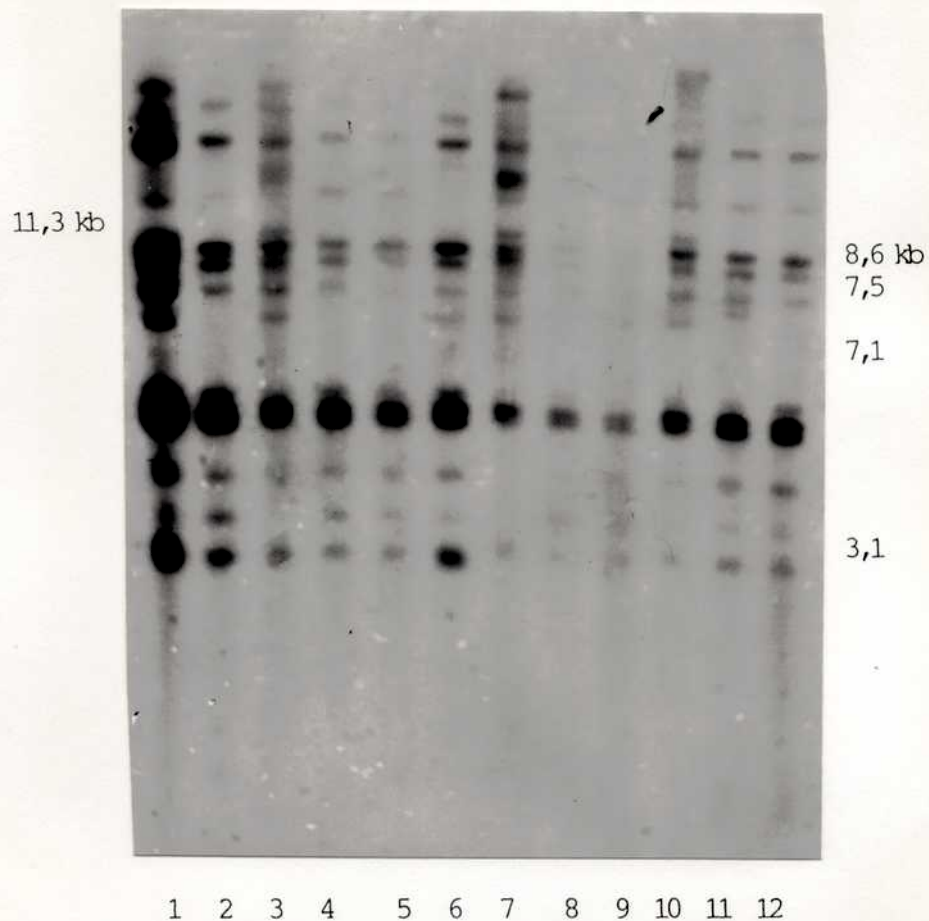


Fig. 17: Autorradiografía correspondiente a la hibridación entre ADN humano leucémico, digerido con Msp I y Alpha-2-IFN 1-5: ADN de pacientes de tricoleucemia, nro.: 1, 2, 3, 4 y 5. 6 y 7: ADN de pacientes de leucemia mieloide crónica, nro.: 449 y 620. 8 y 9: ADN normal de individuos nro.: 203 y 224. 10-12: ADN de pacientes de leucemia linfocítica crónica nro. L197, L198 y L204. No se observan diferencias significativas con respecto a los individuos normales. Gel de agarosa de 0,5%.



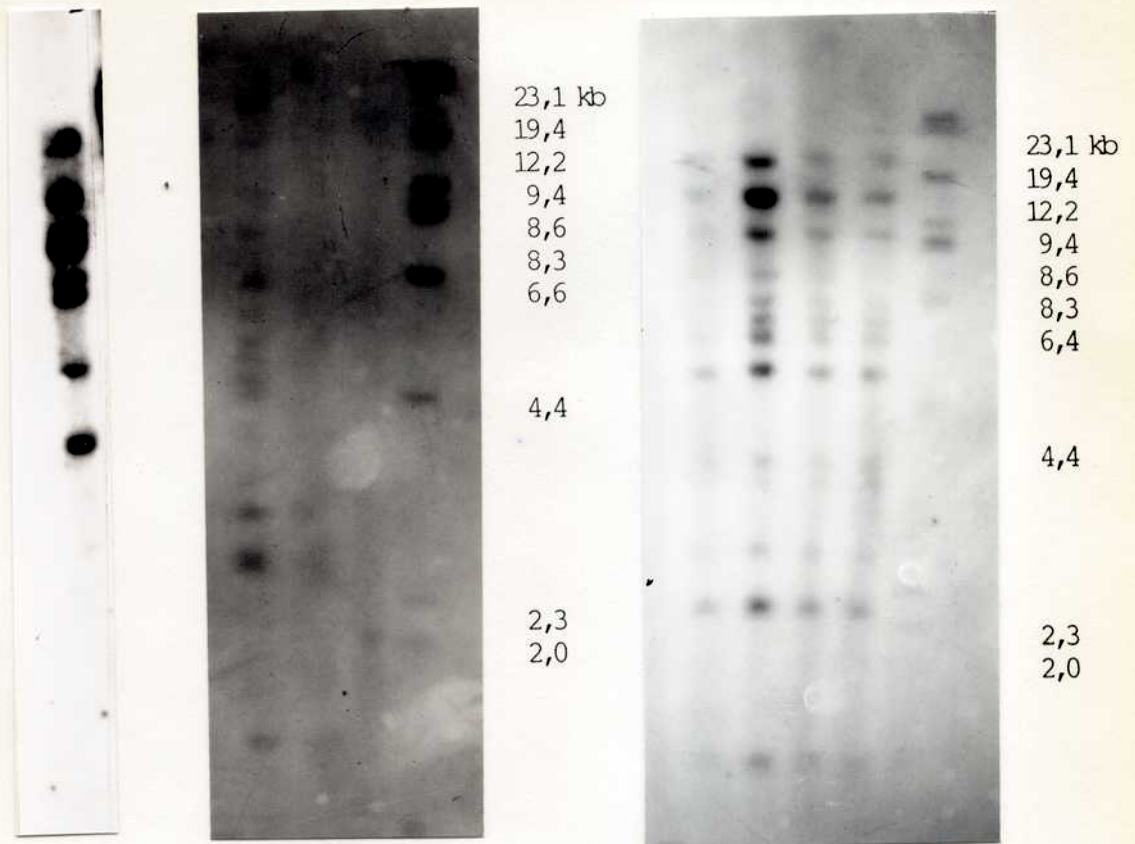


Fig. 18a

Fig.18b

1 2 3 4 5  
Fig. 18c

Fig. 18: Autorradiografías correspondientes a la hibridación de Alpha-2-IFN y ADN humano normal, digerido con diferentes enzimas, dando como resultado un patrón monomórfico. 18a: 1: ADN digerido con Bcl I, individuo nro.: 78. 18b: ADN digerido con Eco RV, individuo nro.: 216. 18c: 1-4: ADN digerido con Xba I, individuos nro.: 333, 335, 356 y 357. 5: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. Geles de agarosa de 0,5%.

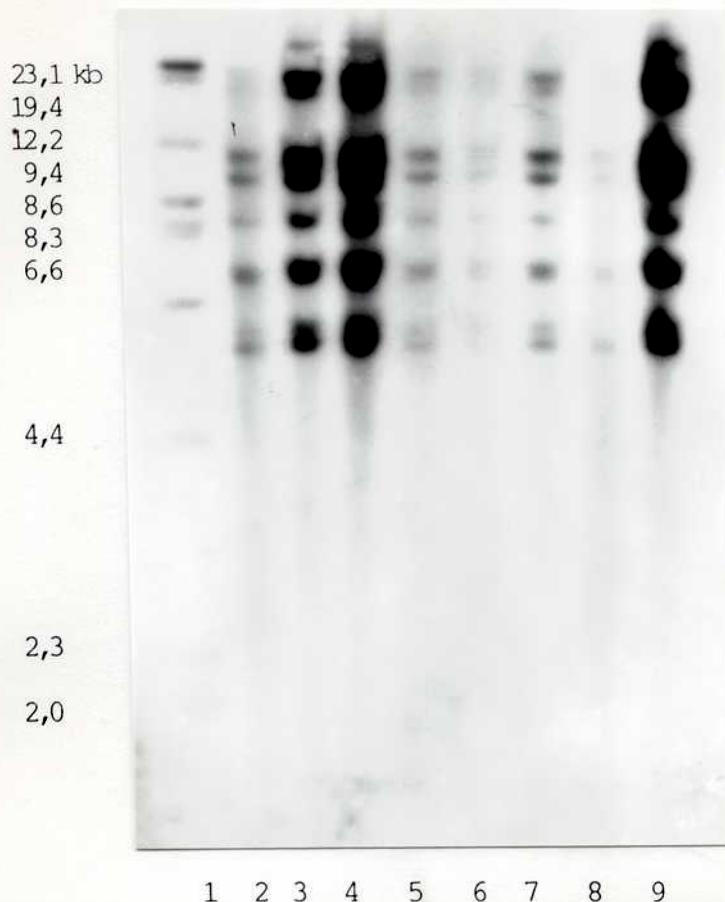
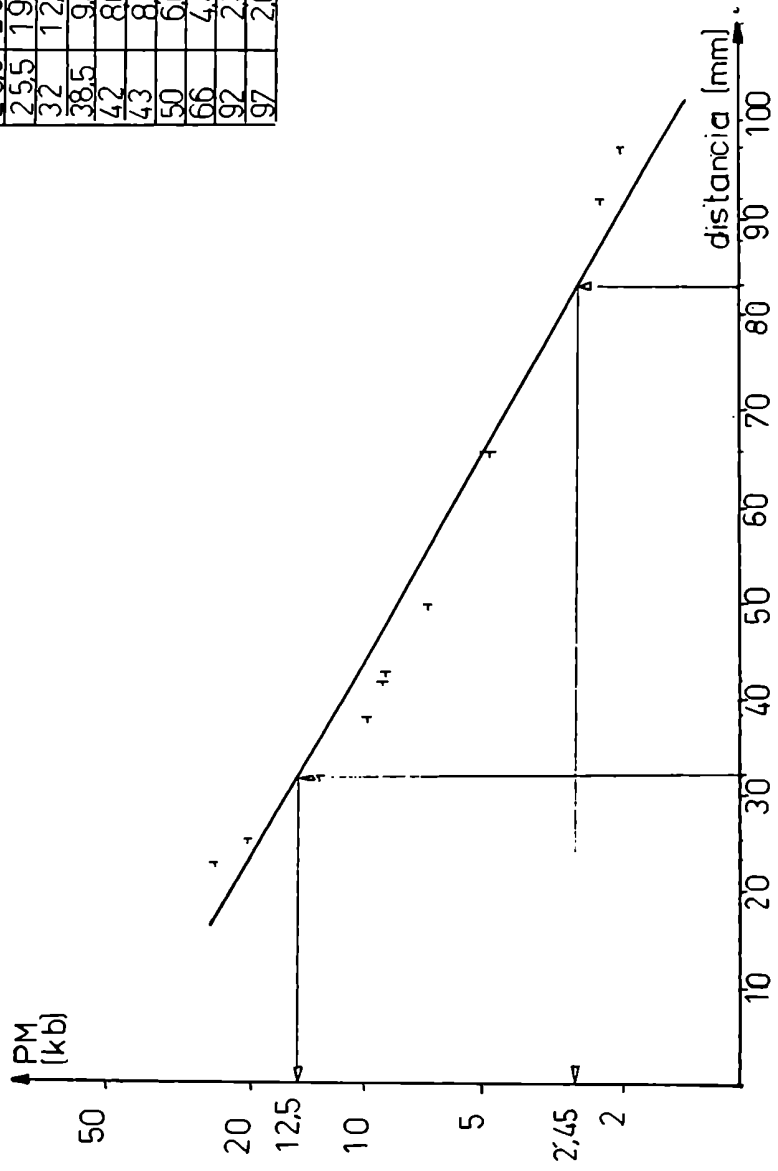


Fig. 19: Autorradiografía correspondiente a la hibridación entre Alpha-2-IFN y ADN humano normal, digerido con Sst I, dando como resultado un patrón monomórfico. 1: Control de peso molecular, 5 ng de Lambda Hind III más 5 ng de Lambda Sma I. 2-9: ADN de individuos nro.: 80, 154, 230, 203, 235, 206, 224 y 62. Gel de agarosa de 0,5%.

mm	kb
235	231
255	194
32	122
38,5	94
42	86
43	83
50	66
66	44
92	23
97	20

Curva de Calibración Sst I  $\beta$ -IFN



## Hibridación de ADN de Beta-1-IFN con ADN humano:

### Sst I:

Se halló un polimorfismo nuevo, al digerir ADN humano con Sst I (fig. 20) e hibridarlo con Beta-1-IFN. Si bien Ohlsson et al. (1985) ya se habían referido al reconocimiento por parte de esta enzima de un sitio polimórfico para Beta-1-IFN, el tamaño de las bandas no coincide (ver discusión).

Este locus parece segregar en forma codominante, con dos alelos de ca. 12,5 kb y ca. 2,45 kb, respectivamente.

El tamaño de las bandas se estimó a partir de una curva de calibración, similar a la realizada para Bgl II (ver página anterior).

Se analizaron 48 individuos normales (fig. 21 - 23) y 26 leucémicos (fig. 24 y 25). De los 26 leucémicos estudiados, 5 eran tricoleucémicos, 2 sufrían de leucemia linfocítica crónica y 19 sufrían de leucemia mieloide crónica.

Se realizó una prueba de contingencia, para determinar si la diferencia entre las frecuencias alélicas de los individuos normales e individuos leucémicos era estadísticamente significativa.

	Normales	Leucémicos	
2,45 kb	82	37	119
12,5 kb	14	15	29
	96	52	148 = 2 N

N = tamaño de la muestra total

$$\chi^2 = 3,4970$$

La chi cuadrado calculada, es levemente inferior a la de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5%.

Cuando se compararon las frecuencias entre individuos normales y pacientes de leucemia mieloide crónica (L.M.C.) la diferencia resultó ser significativa.

	Normales	L.M.C.	
2,45 kb	82	24	106
12,5 kb	14	12	26
	96	36	132 = 2 N

N = tamaño de la muestra total

$$X^2 = 4,6942$$

La chi cuadrado calculada resultó ser superior al valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % :  $4,6942 > 3,84$ .

Rechazo la hipótesis que dice que las diferencias no son significativamente diferentes.

Se calcularon las frecuencias alélicas para normales y leucémicos.

Normales:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas	
12,5/12,5 kb	12,5/2,45 kb	2,45/2,45 kb	
5	4	39	N = 48

N = tamaño de la muestra

frec. (12,5 kb) = frec. de homocigotas para 12,5 kb + 1/2 de la  
frec. de los heterocigotas = 0,1458

frec. (2,45 kb) = 1 - frec. (12,5 kb) = 0,8542

E.S. = 0,036

Se analizó si estaban en equilibrio de Hardy Weinberg:

$p^2$	$2 p q$	$q^2$
$(0,8542)^2$	$2 (0,8542) (0,1458)$	$(0,1458)^2$
0,7296	0,2491	0,0212

Nro. de genotipos esperados es:

$$p^2 = 48 (0,7296) = 35,0208$$

$$2 p q = 48 (0,2491) = 11,9568$$

$$q^2 = 48 (0,0212) = 1,0176$$

$$X^2 = \frac{\text{Sumatoria de (nros. observados} - \text{nros. esperados)}^2}{\text{nros. esperados}}$$

$$X^2 = 21,1165$$

La chi cuadrado calculada es mayor que el valor de tablas, con un grado de libaertad y para un nivel de significación del 5 % : 21,1165 > 3,84.

Es decir no están en equilibrio de Hardy Weinberg.

Leucémicos totales:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas	
12,5/12,5 kb	12,5/2,45 kb	2,45/2,45 kb	
4	6	16	N = 26

N = tamaño de la muestra

frec. (12,5 kb) = 0,2692

frec. (2,45 kb) = 0,7308

E.S. = 0,0615

Se analizó si estaban en equilibrio de Hardy Weinberg:

$p^2$	$2 p q$	$q^2$
$(0,7308)^2$	$2 (0,7308) (0,2692)$	$(0,2692)^2$
0,5341	0,3935	0,0725

Nro. de genotipos esperados:

$$p^2 = 26 (0,5341) \quad 13,8866$$

$$2 p q = 26 (0,3935) \quad 10,231$$

$$q^2 = 26 (0,0725) \quad 1,885$$

$$X^2 = 4,6591$$

La chi cuadrado calculada es mayor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % :  $4,6591 > 3,84$ .

Es decir, no están en equilibrio de Hardy Weinberg.

Leucémicos mieloides crónicos:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas	
12,5/12,5 kb	12,5/2,45 kb	2,45/2,45 kb	
3	6	10	N = 19

N = tamaño de la muestra

frec. (12,5 kb) = 0,3158

frec. (2,45 kb) = 0,6842

E.S. = 0,0754

Se analizó si estaban en equilibrio de Hardy Weinberg:

$p^2$	$2 p q$	$q^2$
$(0,6842)^2$	$2 (0,6842) (0,3158)$	$(0,3158)^2$
0,4681	0,4321	0,0997

Nro. de genotipos esperados:

$p^2 = 19 (0,4681) = 8,8939$

$2 p q = 19 (0,4321) = 8,2099$



$$q^2 = 19 (0,0997) = 1,8943$$

$$X^2 = 1,3777$$

La chi cuadrado calculada es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % :  $1,377 < 3,84$ .

Es decir, están en equilibrio de Hardy Weinberg.

Por otra parte el contenido de información polimórfico resultó ser levemente informativo para los individuos normales, pues los P.I.C.s menores de 0,25 son considerados levemente informativos.

$$P.I.C. = 1 - \frac{p_1^2}{p_1} - \frac{p_2^2}{p_2} = 2 \frac{p_1 p_2}{p_1 + p_2}$$

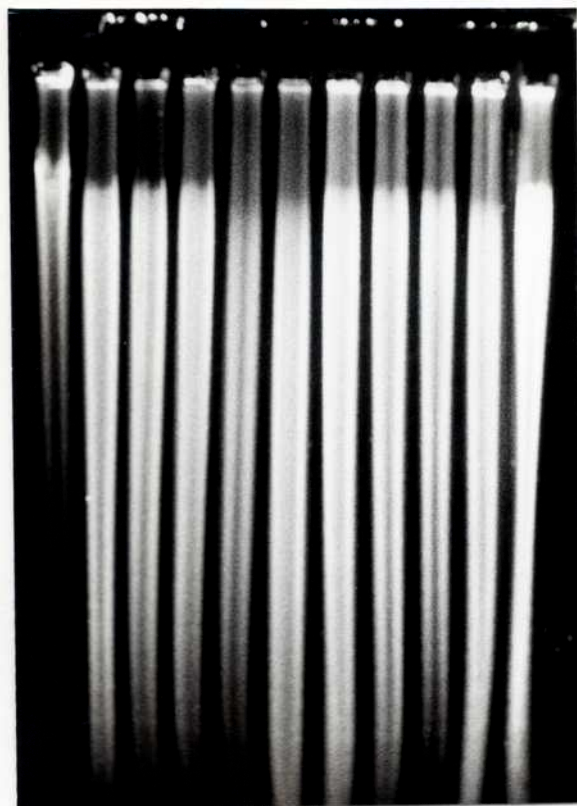
$$P.I.C. = 0,23$$

Por lo contrario, el P.I.C. para los leucémicos resultó ser razonablemente informativo.

$$P.I.C. = 0,32$$

El P.I.C. calculado sólo para los individuos que sufrían de leucemia mieloide crónica resultó ser un poco superior, siendo también razonablemente informativo.

$$P.I.C. = 0,34$$



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Fig. 20: Digestión de ADN humano normal con Sst I. 1-11: ADN de individuos nro.: 96, 99, 98, 100, 24, 39, 17,15, 19, 115 y 37. Gel de agarosa de 0,5%.

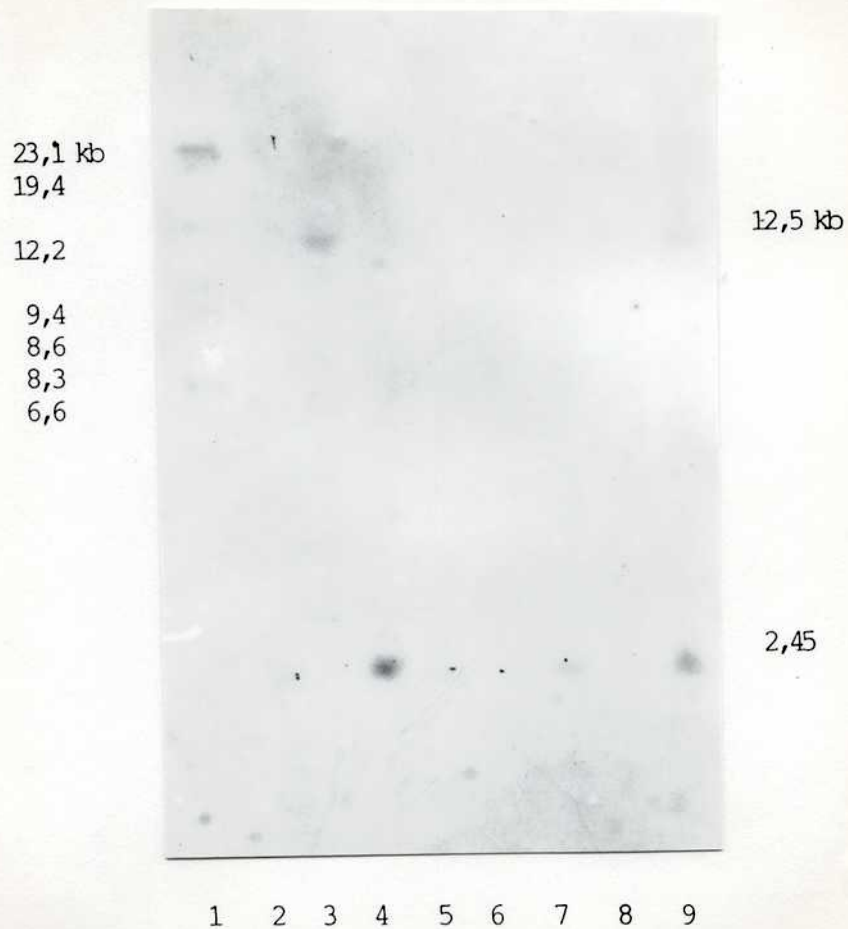


Fig. 21: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Beta-1-IFN con ADN humano normal, digerido con Sst I. 1: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 2-9: ADN de individuos nro.: 80, 154, 230, 203, 235, 206, 224 y 62. Gel de agarosa de 0,5 %.

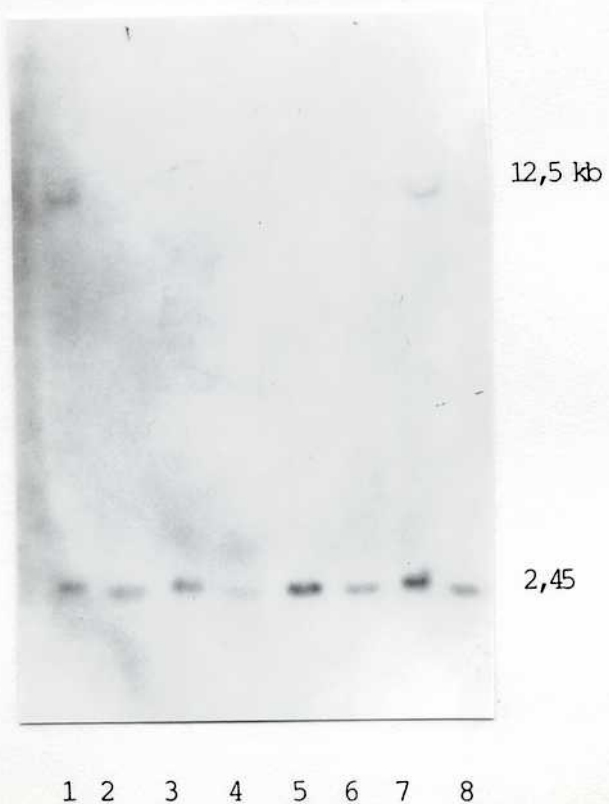


Fig. 22: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Beta-1-IFN con ADN humano normal, digerido con Sst I. 1-8: ADN de individuos nro.: 61, 145, 20, 80, 116, 117, 60 y 120. Se observan 2 bandas, una de ca. 12,5 kb y la otra de ca. 2,45 kb. Gel de agarosa de 0,5%.

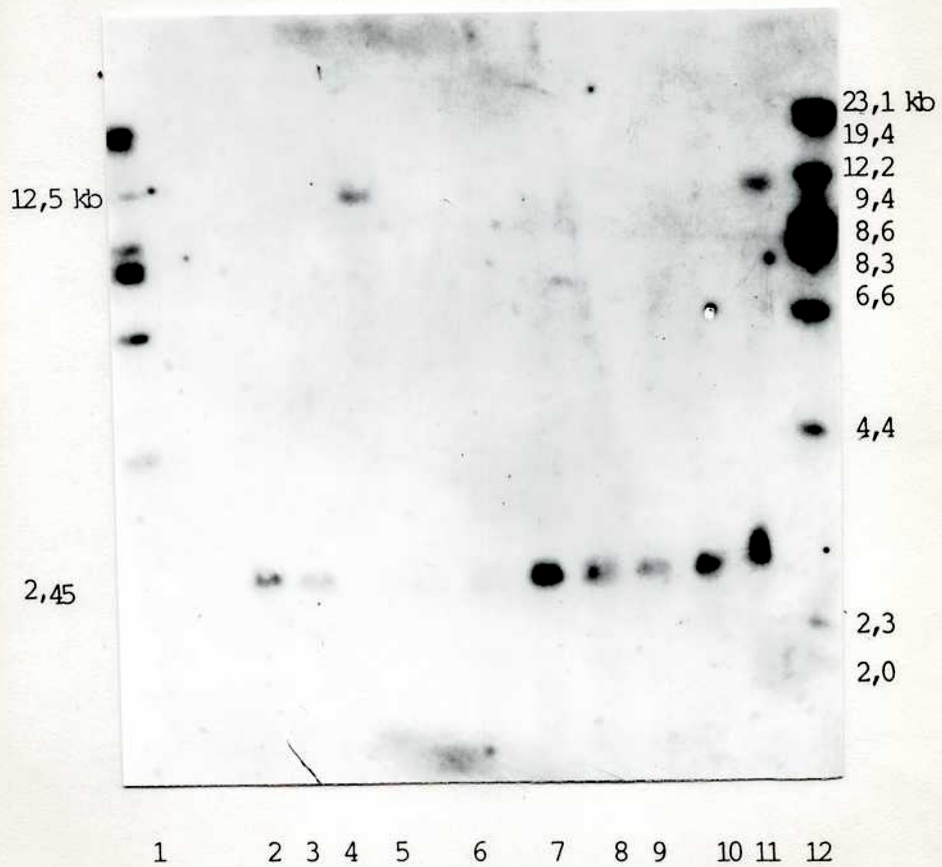


Fig. 23: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Beta-1-IFN con ADN humano normal, digerido con Sst I. 1 y 12: Controles de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 1-10: ADN de individuos nro.: 99, 98, 100, 24, 39, 17, 15, 19, 115 y 37. Gel de agarosa de 0,5%.

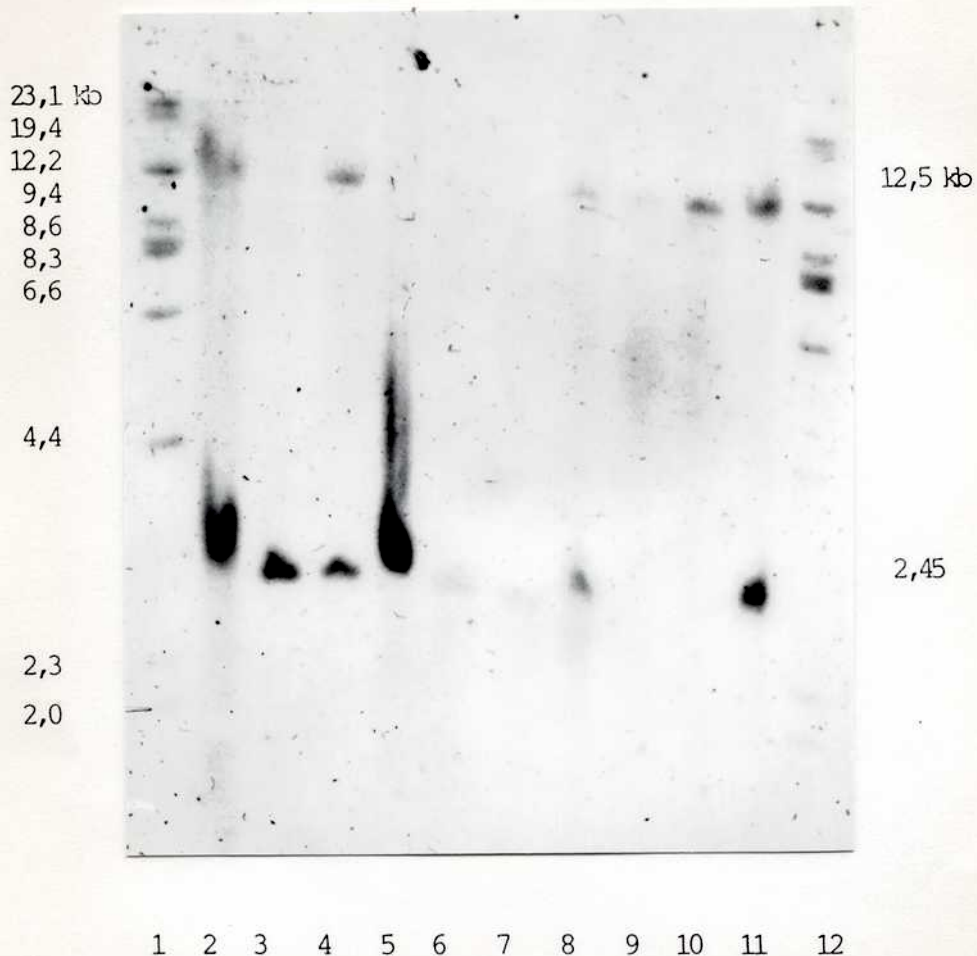


Fig. 24: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de ADN humano leucémico, digerido con Sst I, con Beta-1-IFN. 1 y 12: Controles de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng y Lambda Sma I, 5ng. 2-11: ADN de individuos nro.: 817, 658, L197, 731, 589, 652, 579, 689, 650 y 653. Son todos pacientes de leucemia mieloide crónica, salvo L197 que es un paciente de leucemia linfocítica crónica. Se observa una mayor frecuencia de la banda superior, de 12,5 kb, con respecto a los individuos sanos. Gel de agarosa de 0,5%.

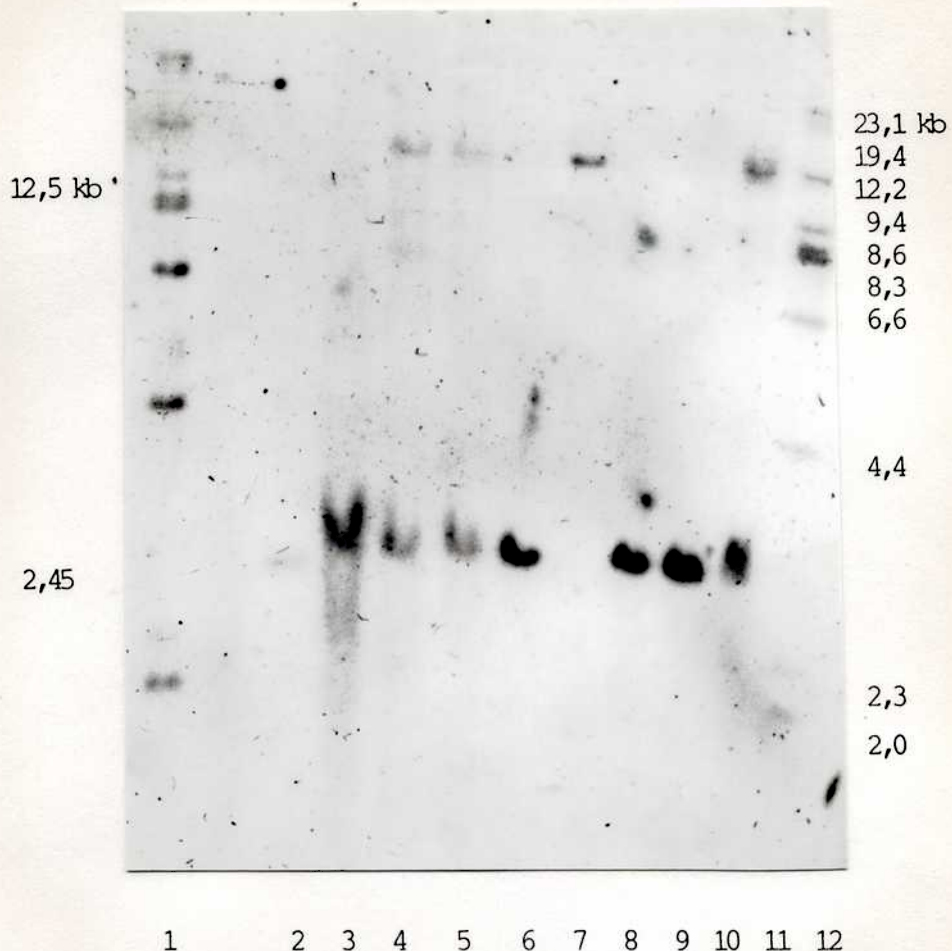


Fig. 25: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Beta-1-IFN con ADN humano leucémico, digerido con Sst I. 1 y 11: Controles de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng más Lambda Sma I, 5 ng. 2-10: ADN de pacientes de leucemia mieloide crónica, individuos nro.: 684, 583, 672, 465, 466, 655, 449, 610 y 677. Se observa una mayor frecuencia de la banda de 12,5 kb, con respecto a los individuos normales. Gel de agarosa de 0,5%.

Msp I:

Se confirmó, en nuestra población, el polimorfismo para Msp I y Beta-1-IFN, previamente descrito por Ohlsson et al (1985). Se trata de un locus polimórfico con 2 alelos, de 4,5 y 2,5 kb, que segrega en forma codominante (fig. 26 - 30). Ohlsson y colaboradores describieron un locus dialélico de 3,9 y 2,5 (ver discusión).

Se analizaron 168 individuos normales y 31 leucémicos. De los 27 leucémicos estudiados, 5 eran tricoleucémicos, 5 poseían linfoma, 2 sufrían de leucemia linfocítica crónica, 2 de leucemia linfocítica aguda y 17 de leucemia mieloide crónica.

Se realizó una prueba de contingencia para determinar si la diferencia entre las frecuencia alélicas de los individuos leucémicos y los individuos normales era significativa estadísticamente:

	Normales	Leucémicos	
4,5 kb	227	47	274
2,5 kb	109	15	124
	336	62	398 = 2 N

N = tamaño de la muestra

$$\chi^2 = 1,2975$$

La chi cuadrado calculada es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5%:  $1,2975 < 3,84$ .

No rechazo la hipótesis que dice no hay diferencias significativas entre normales y leucémicos.

Se realizó luego, una prueba de heterogeneidad, entre las dos muestras.



Normales:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas	
4,9/4,5 kb	4,5/2,5 kb	2,5/2,5 kb	
78	71	19	168 = N

N = tamaño de la muestra

frec. (4,5 kb) 0,6756

frec. (2,5 kb) 0,3244

$$E.S. = ((p - q) / 2 N)^{1/2}$$

$$E.S. = 0,0255$$

De acuerdo con la ley de Hardy Weinberg:

$$\begin{array}{ccc} p^2 & 2 p q & q^2 \\ (0,6756)^2 & 2 (0,6756) (0,3244) & (0,3244)^2 \\ 0,4564 & 0,4383 & 0,1052 \end{array}$$

Nro. de genotipos esperado:

$$p^2 = 168 (0,4564) = 76,6752$$

$$2 p q = 168 (0,4383) = 73,6344$$

$$q^2 = 168 (0,1052) = 17,6736$$

$\chi^2$   
 $\chi^2$  normales      0,2166

La  $\chi^2$  cuadrado calculada es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5%:  
 $0,2166 < 3,84$ .

La muestra está en equilibrio de Hardy Weinberg.

Leucémicos:

Homocigotas	Heterocigotas	Homocigotas	
4,5/4,5 kb	4,5/2,5 kb	2,5/2,5 kb	
18	11	2	31 = N

N = tamaño de la muestra

frec. (4,5 kb) = 0,758

frec. (2,5 kb) = 0,242

E.S. = 0,0544

De acuerdo con la ley de Hardy Weinberg:

$$\begin{array}{ccc}
 \frac{2}{p} & 2 p q & \frac{2}{q} \\
 \\
 (0,7580)^2 & 2 (0,758) (0,242) & (0,2420)^2 \\
 0,5746 & 0,3669 & 0,0586
 \end{array}$$

Nro. de genotipos esperado:

$$p^2 = 31 (0,5746) = 17,8126$$

$$2 p q = 31 (0,3669) = 11,3739$$

$$q^2 = 31 (0,0586) = 1,8166$$

$$X^2 \text{ leucémicos} = 2,0024$$

La chi cuadrado calculada es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % :  $2,0024 < 3,84$ .

La muestra está en equilibrio de Hardy Weinberg.

Normales y leucémicos juntos:

Homocigotas	Heterocigota	Homocigotas	
4,5/4,5 kb	4,5/2,5 kb	2,5/2,5 kb	
96	82	21	199 = N

N = tamaño de la muestra

$$\text{frec. (4,5 kb)} = 0,6885$$

$$\text{frec. (2,5 kb)} = 0,3115$$

$$\text{E.S.} = 0,0232$$

De acuerdo con la ley de Hardy Weinberg:

$$\begin{array}{rcc}
 p^2 & 2pq & q^2 \\
 (0,6885)^2 & 2(0,6885)(0,3115) & (0,3115)^2 \\
 0,4740 & 0,4289 & 0,0970
 \end{array}$$

Nro. de genotipos esperado:

$$p^2 = 199 (0,4740) = 94,3260$$

$$2pq = 199 (0,4289) = 85,3511$$

$$q^2 = 199 (0,0970) = 19,3030$$

$$x_{\text{global}} = 0,3105$$

La chi cuadrado calculada es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % :  $0,3105 < 3,84$ .

La muestra se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

$$X^2_{\text{total}} = X^2_{\text{normales}} + X^2_{\text{leucémicos}}$$

$$X^2_{\text{total}} = 0,2166 + 2,0024 = 2,219$$

$$X^2_{\text{heterogeneidad}} = X^2_{\text{total}} - X^2_{\text{global}}$$

$$X^2_{\text{heterogeneidad}} = 2,219 - 0,3105 = 1,9085$$

Se restan los grados de libertad:  $2 - 1 = 1$

La chi cuadrado calculada es menor que el valor de tablas, con un grado de libertad y para un nivel de significación del 5 % :  $1,9085 < 3,84$ .

Las muestras son homogéneas. Se pueden agrupar juntas y calcular el contenido de información polimórfico que resultó ser razonablemente informativo

P.I.C. = 0,34

Se digirió el ADN humano normal con otras enzimas en busca de polimorfismo. Se digirió ADN de 9 individuos, con las endonucleasas Bam HI, Hinc II, Kpn I y Xba I (fig. 31). Todos estos sistemas resultaron ser monomórficos para Beta-1-IFN (fig. 32).

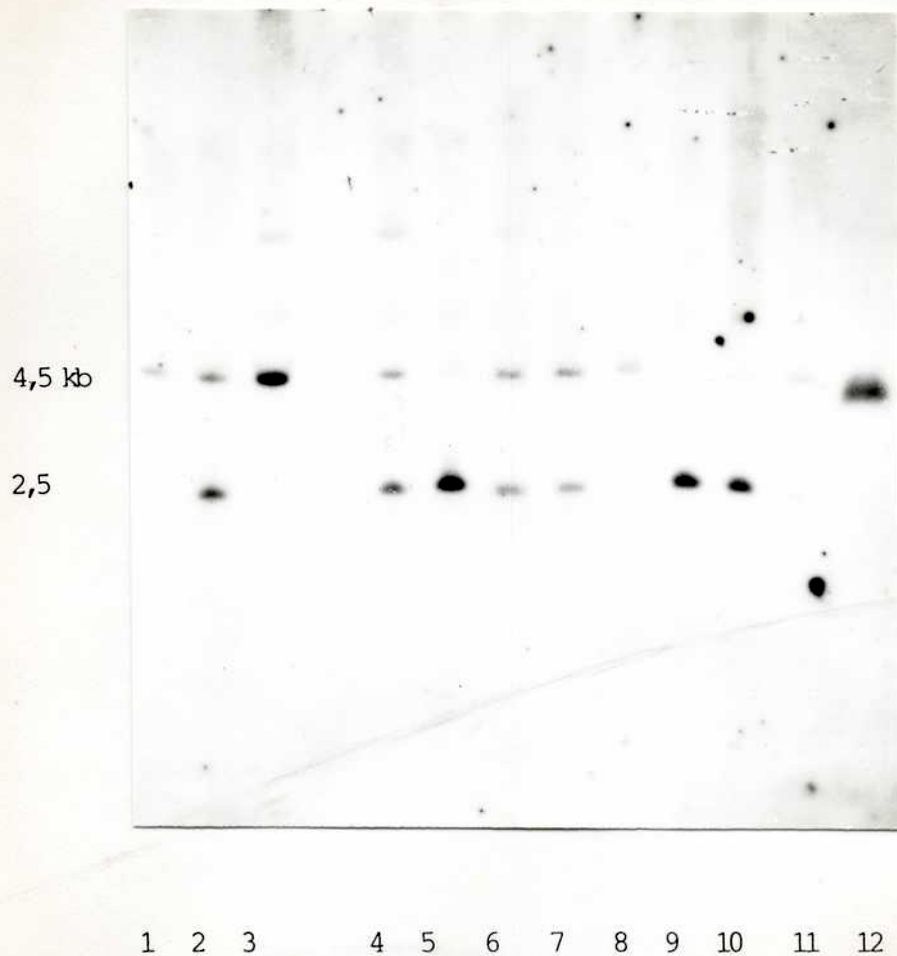


Fig. 26: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Beta-1-IFN con ADN humano digerido con Msp I. 1-11: ADN humano normal, individuos nro.: 320, 321, 322, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330 y 331. 12: 10 pg de Beta-1-IFN. Gel de agarosa de 0,8%.

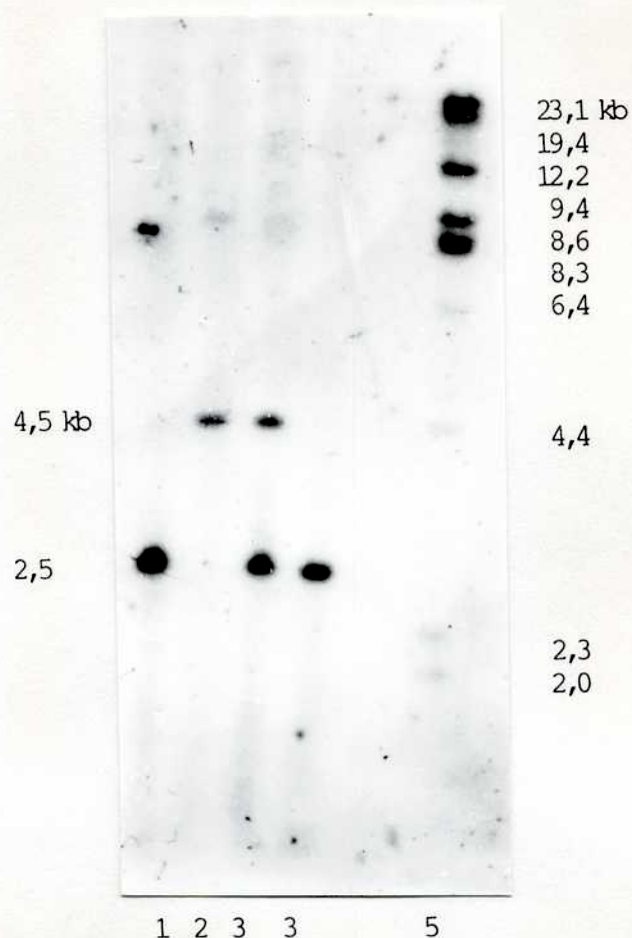
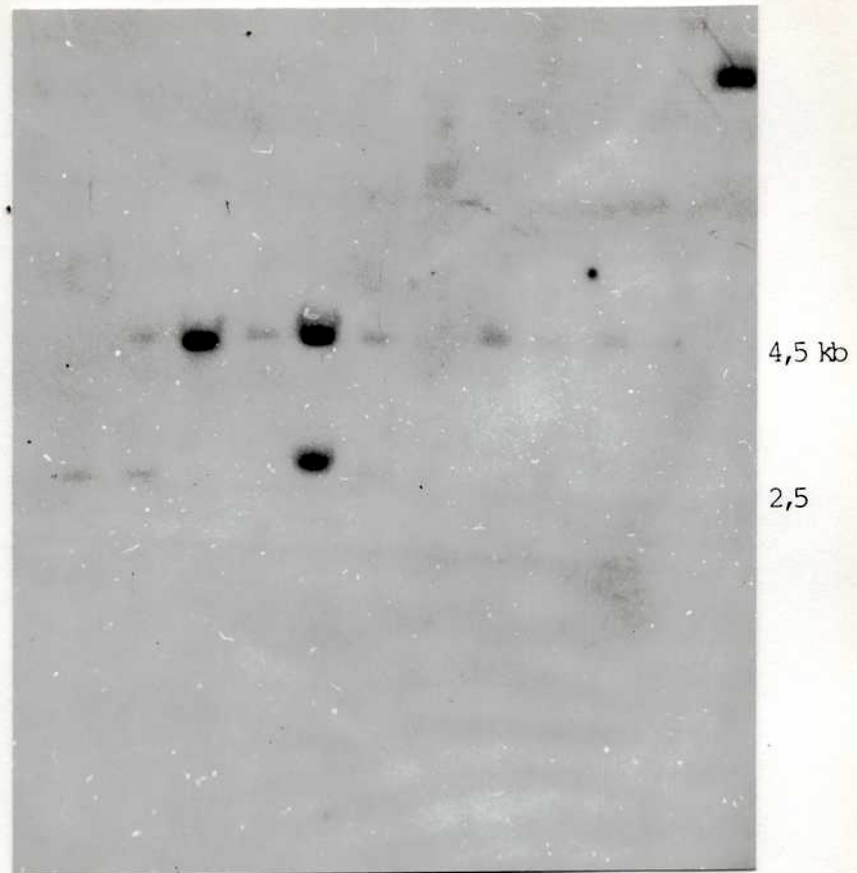


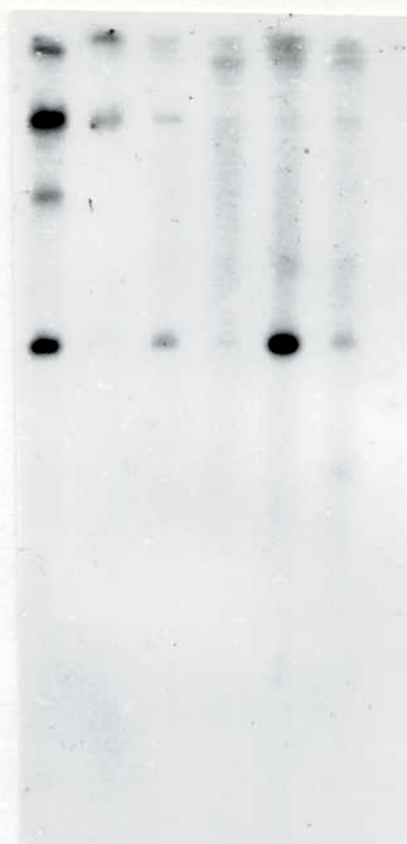
Fig. 27: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Beta-1-IFN con ADN humano digerido con Msp I. 1: ADN humano normal, individuo nro.: 335. 2-4: ADN de pacientes de leucemia mieloide crónica, individuos nro.: 620, 639 y 652., digeridos con un exceso de enzima 5: Control de peso molecular Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. Se observan 2 bandas, una de ca. 4,5 kb y otra de ca. 2,5 kb. Las bandas superiores son debidas a una digestión parcial. Gel de agarosa de 0,5%.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Fig. 28: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de ADN humano normal, digerido con Msp I y Beta-1-IFN. 1-10: ADN de individuos nro.: 230, 231, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 239 y 240. 11: 10 pg de Beta-1-IFN. Se observan 2 bandas de ca. 4,5 y ca. 2,5 kb. Gel de agarosa de 0,8%.





4,5 kb

2,6

1 2 3 4 5 6

Fig. 29: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de ADN humano digerido con Msp I y Beta-1-IFN. 1y 2: ADN humano normal, individuos nro.: 62 y 78. 3y 4: ADN de pacientes de leucemia linfocítica aguda, individuos nro.: L185 y L2533. 5 y 6: ADN de pacientes de leucemia linfocítica crónica, individuos nro.: L202 y L204. Gel de agarosa de 0,8%.

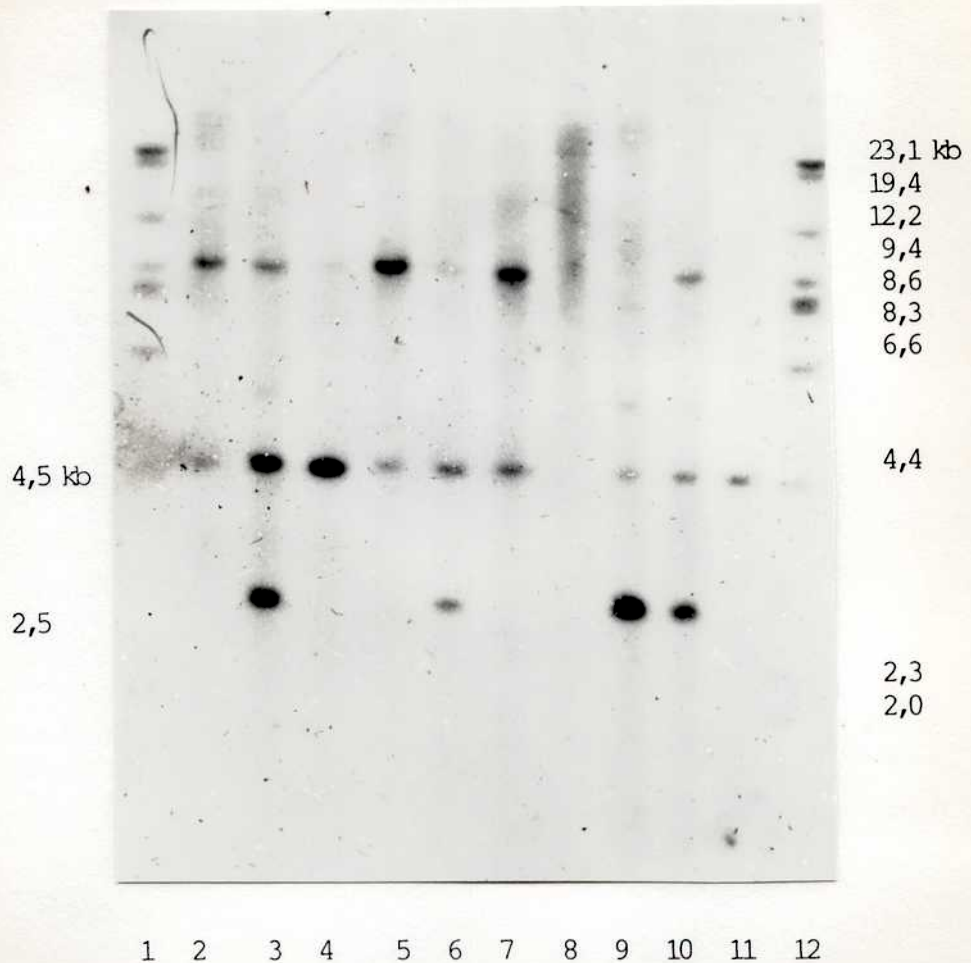


Fig. 30: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de ADN humano digerido con Msp I y Beta-1-IFN: 1 y 12: Controles de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 2: ADN normal de individuo nro.: 365. 3-11: ADN de pacientes de leucemia mieloide crónica, individuos nro.: 610, 639, 655, 620, 449, 589, 579, 652, y 6. No se observan diferencias significativas con respecto a los individuos normales. Las bandas de alto peso molecular, que se observan, corresponden a digestión parcial. Comparese individuos 620, 639 y 652 con los mismos individuos de la fig. 27, las bandas superiores desaparecen al digerir el ADN con un exceso de Msp I. Gel de agarosa de 0,5%.

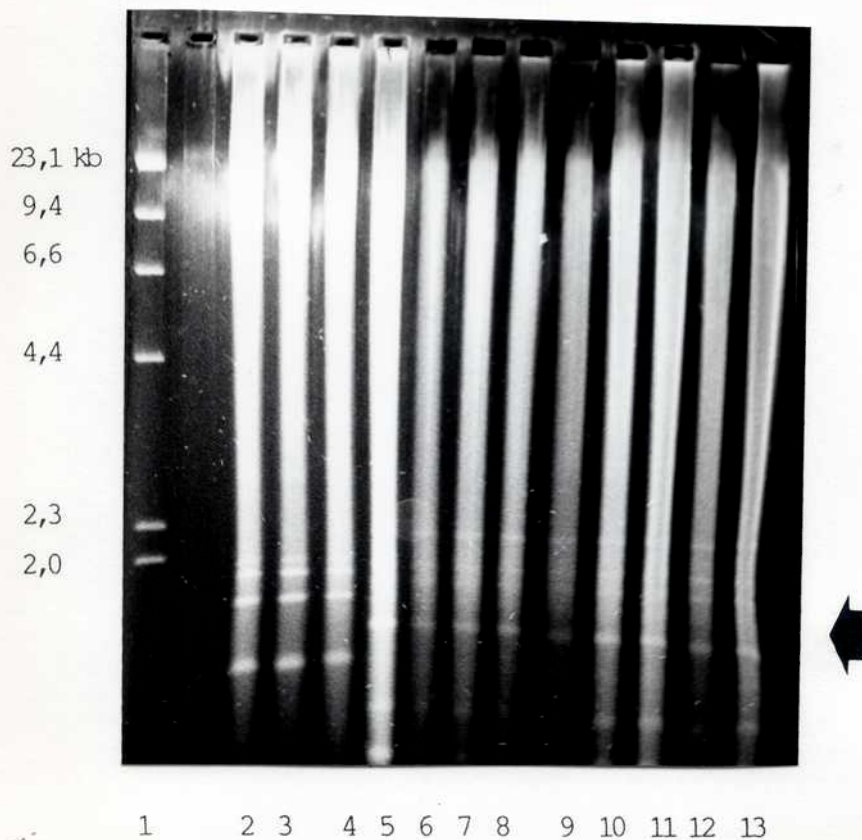
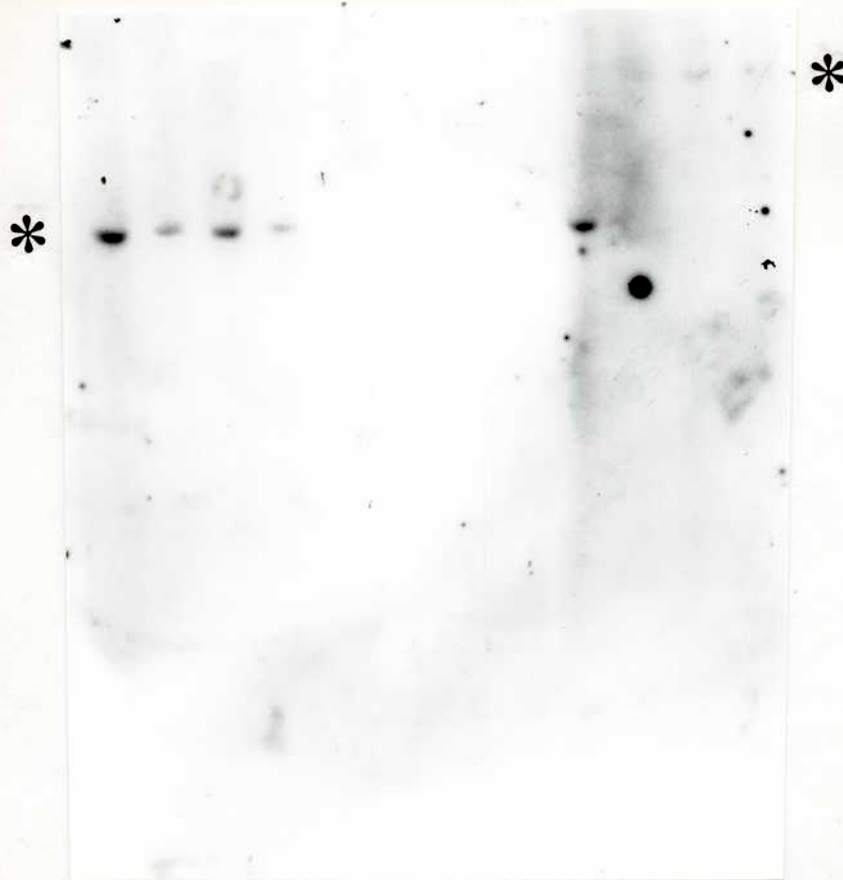


Fig. 31: Digestión de ADN humano normal, con Kpn I y Xba I  
 1: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 250 ng. 2-4:  
 ADN humano digerido con Kpn I, individuos nro.: 44,130 y  
 428. 5-13: ADN humano digerido con Xba I, individuos nro.:  
 397, 439, 162, 169, 129, 43, 44, 130 y 428. Observese el ADN  
 satélite con ambas enzimas. Gel de agarosa de 0,8%.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 32: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de ADN humano normal digerido con Xba I y Kpn I y Beta-1-IFN, dando como resultado un patrón monomórfico. 1-12: ADN correspondiente a la figura 31, pero con el ADN invertido, es decir a la izquierda se observa Xba I y a la derecha KpnI.

## Hibridación de ADN de Gamma-IFN con ADN humano:

Se digirió ADN de 9 individuos con las enzimas de restricción: Bam HI, Eco RI, Hinc II, Kpn I, Pvu II y XbaI (fig. 36, 37 y 41 a), que resultaron ser monomórficos para Gamma-IFN (34b, 38 - 40 y 41b).

Se encontró un polimorfismo para Gamma-IFN y Hind III (fig. 33 y 34a) con una banda de aproximadamente 8,3 kb, mayoritariamente presente y una banda adicional de alrededor de 2,3 kb, en sólo 2 individuos (fig. 34b y 35).

Se analizaron 33 individuos normales y 23 individuos leucémicos. De los 23 leucémicos, 18 sufrían de leucemia mieloide crónica, 2 de tricoleucemia, y 3 de leucemia linfocítica crónica.

Es decir de los 56 individuos estudiados, sólo el 0,03 % (2 individuos) mostraron bandas adicionales.

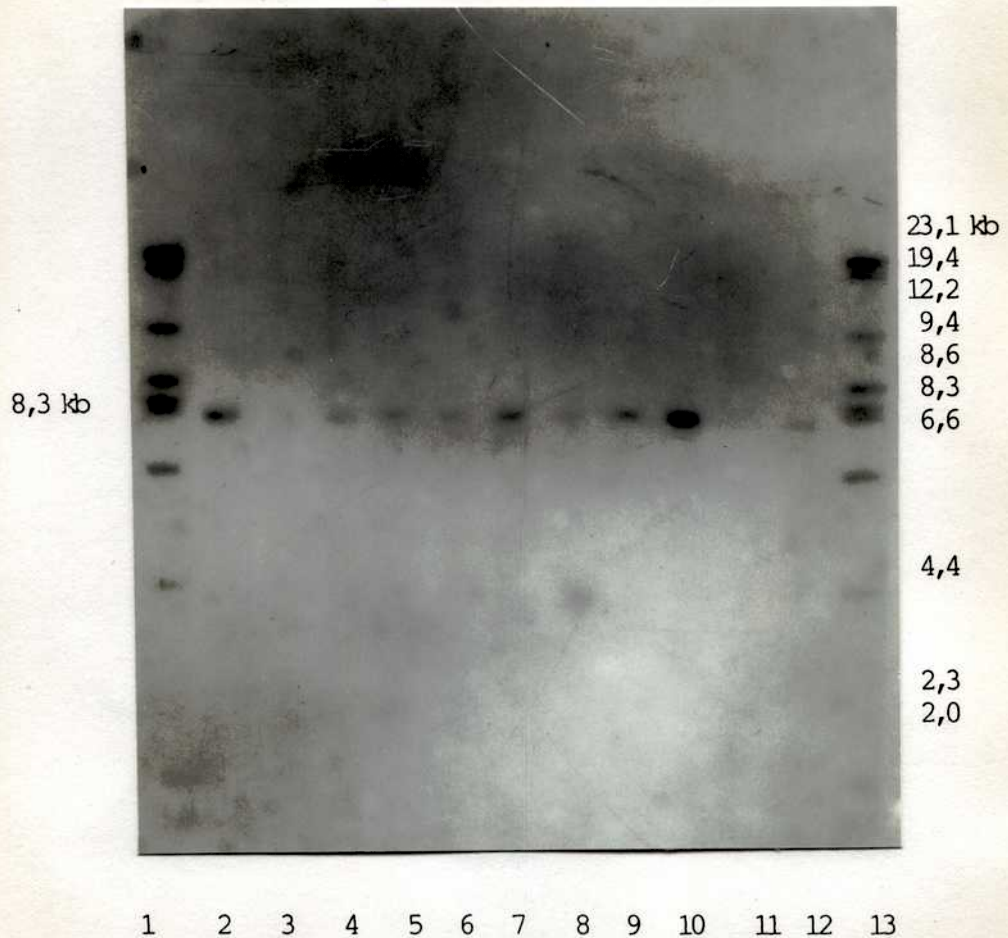


Fig. 33: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Gamma-IFN y ADN humano normal, digerido con Hind III. 1 y 13: Controles de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 2-12: Individuos nro.: 364, 249, 358, 360, 356, 268, 366, 383, 385, 225 y 286. Observese una banda de ca. 8,3 kb. Gel de agarosa de 0,5%.

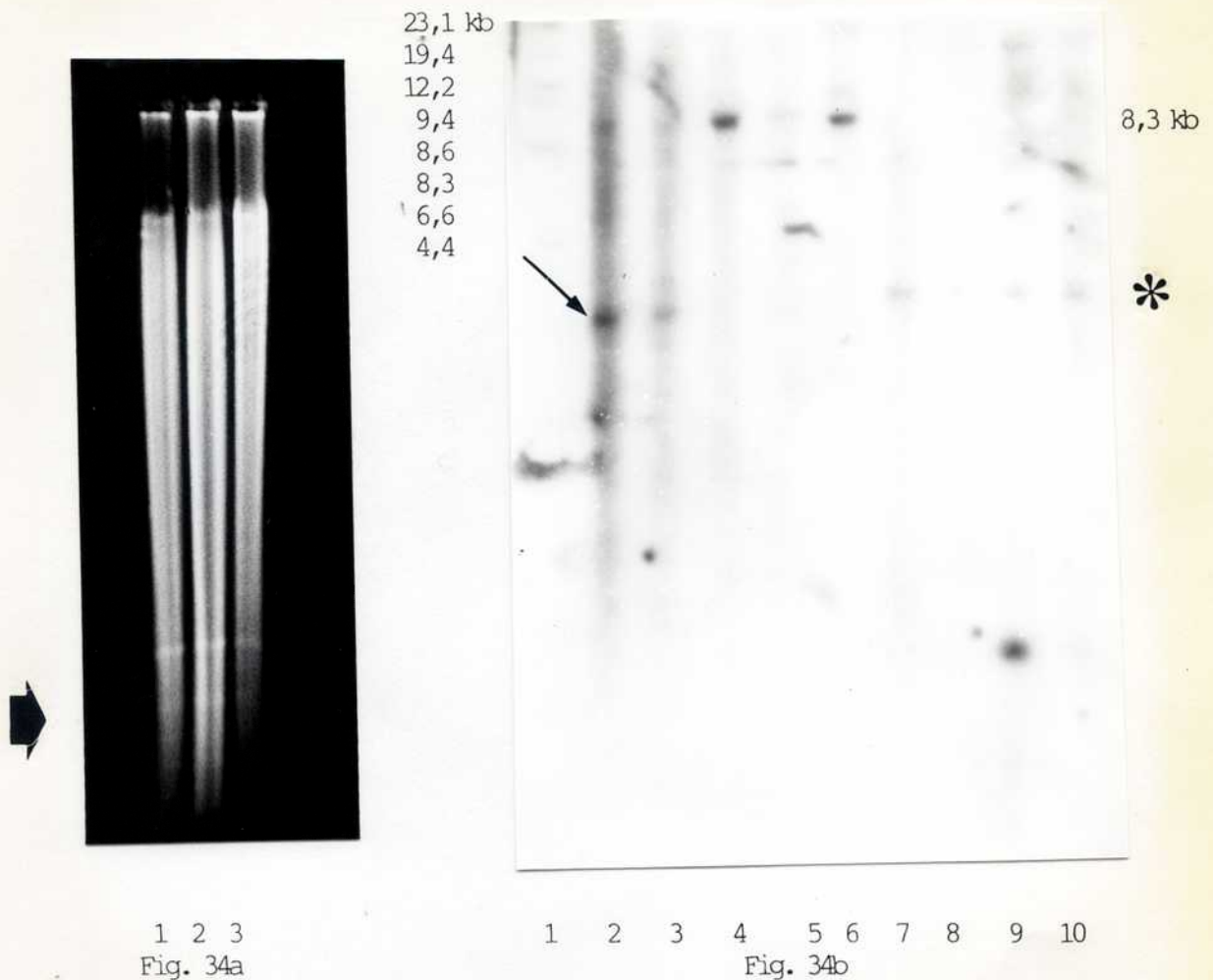


Fig. 34a: Digestión de ADN humano normal con Hind III. 1-3: Individuos nro.: 98, 100 y 96. Observese el ADN satélite. Gel de agarosa de 0,5%. Fig. 34b: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Gamma-IFN y ADN humano normal digerido con HInd III y con Pvu II. 1: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 2-6: ADN humano digerido con Hind III, individuos nro.: 281, 269, 80, 224 y 230 respectivamente. Observese la presencia de una banda adicional de 2,3 kb en las calles 2 y 3. 7-10: ADN humano digerido con Pvu II, individuos nro.: 80, 230, 203 y 206. Gel de agarosa de 0,8%.

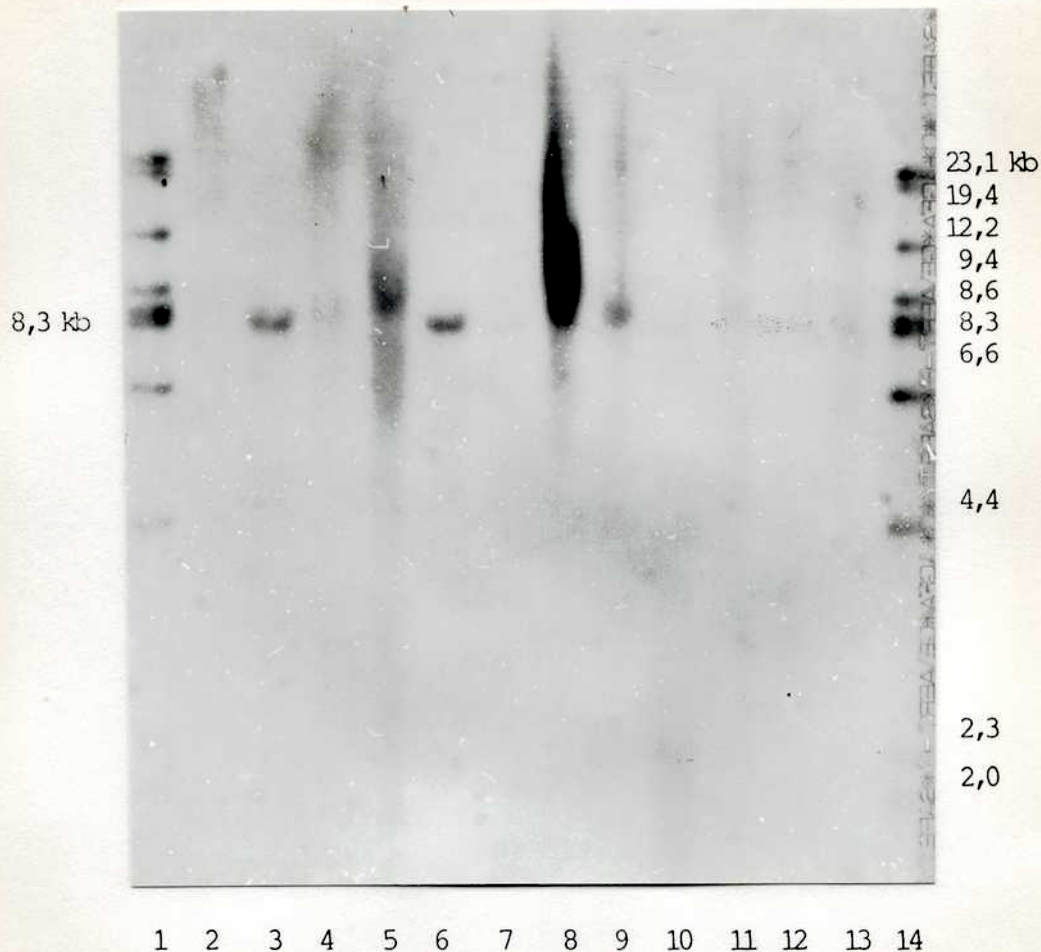


Fig. 35: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de ADN humano leucémico, digerido con Hind III. 1 y 14: Controles de peso molecular, Lambda Hind III, 5 ng, más Lambda Sma I, 5 ng. 2-13: ADN de pacientes con leucemia mieloide crónica, individuos nro.: 610, 449, 465, 817, 466, 652, 731, 653, 581, 589, 658 y 579. Se observa la misma banda de ca. 8,3 kb, mayoritariamente presente en los individuos normales. Gel de agarosa de 0,5%.



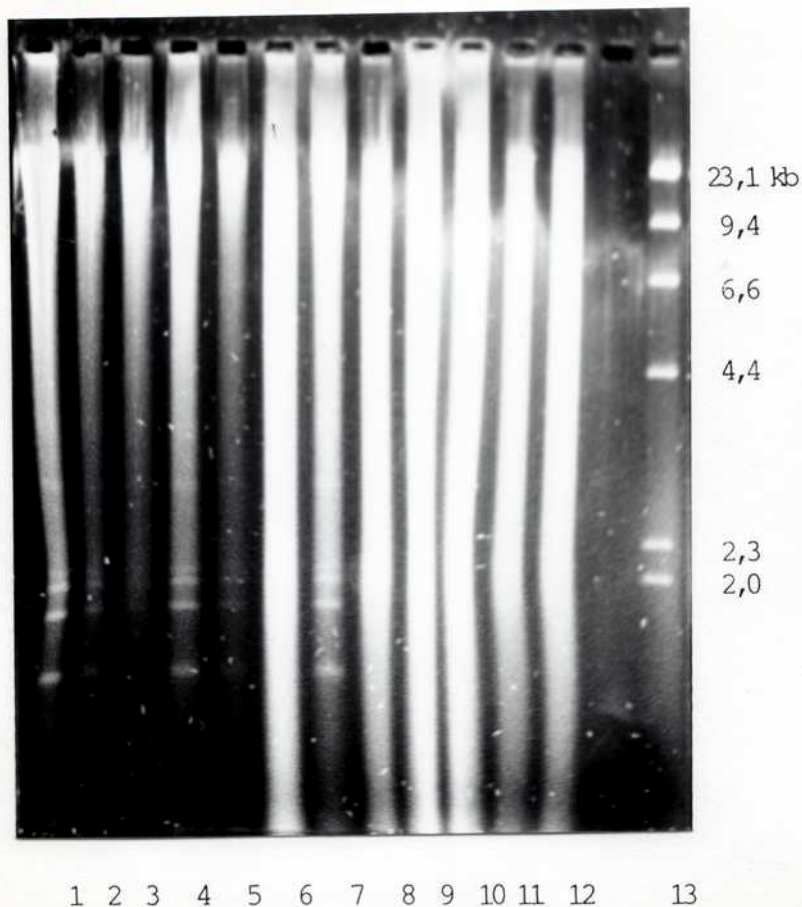


Fig. 36: Digestión de ADN humano normal con Kpn I y Hinc II. 1-5 y 7: ADN digerido con Kpn I, individuos nro.: 43, 42, 164, 169, 167 y 397, respectivamente. Se observa ADN satélite. 6, 8-12: ADN digerido con Hinc II, individuos nro.: 428, 130, 44, 43, 42 y 164, respectivamente. 13: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 250 ng. Gel de agarosa de 0,8%.

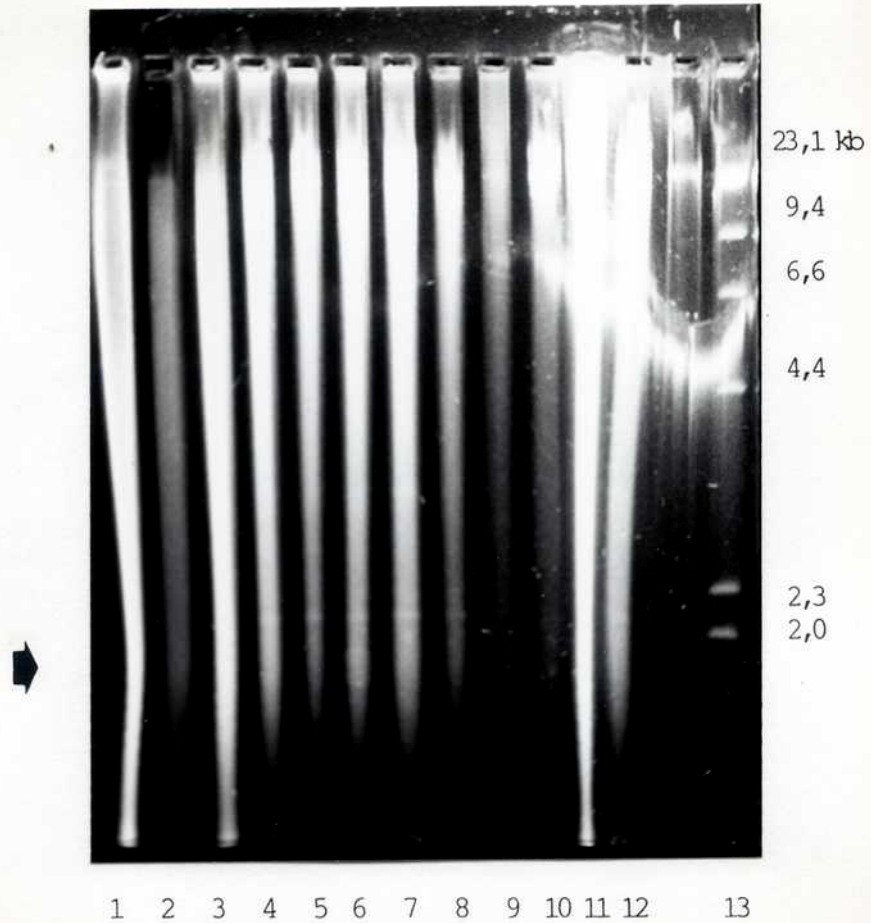
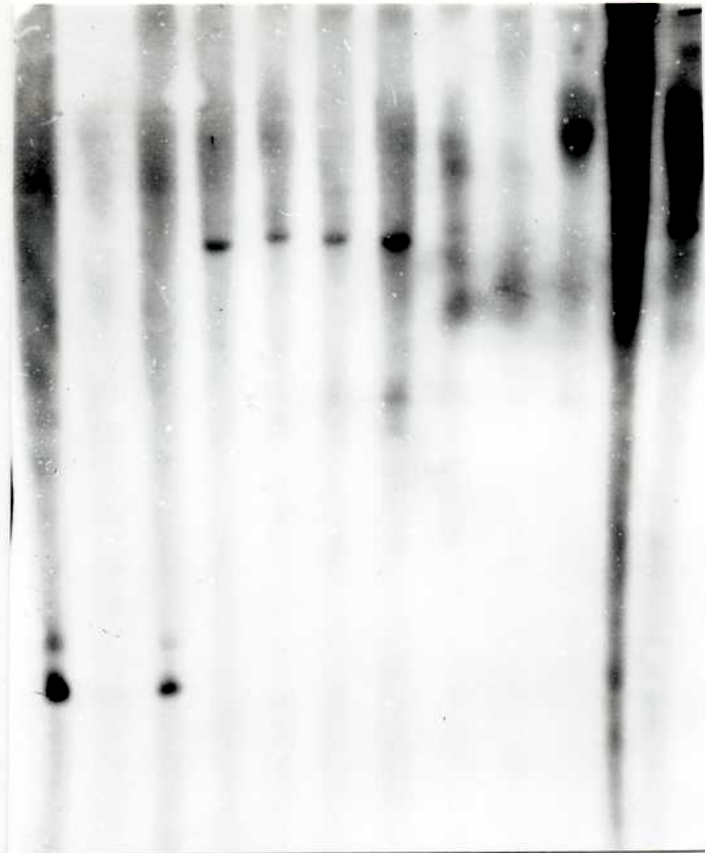


Fig. 37: ADN humano normal, digerido con Hinc II y Bam HI. 1-3: ADN digerido con Hinc II, individuos nro.: 169, 434 y 397. 4-12: ADN digerido con Bam HI, individuos nro.: 428, 130, 44, 43, 42, 167, 212, 169 y 397, respectivamente. Observese ADN satélite. 13: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 250 ng. Gel de agarosa de 0,8%.



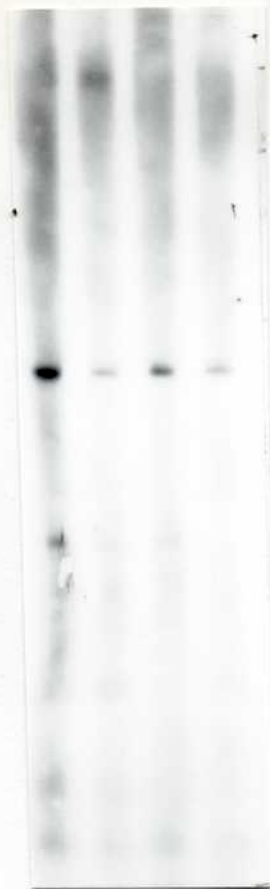
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 38: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Gamma-IFN y ADN humano normal, digerido con Hinc II y Bam HI. "Southern" correspondiente al gel de la fig 33. Se observa un patrón monomórfico, para ambas enzimas.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 39: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Gamma-IFN y ADN humano normal, digerido con Kpn I y Hinc II. "Southern" correspondiente al gel de la fig. 36. Se observa un patrón monomórfico.

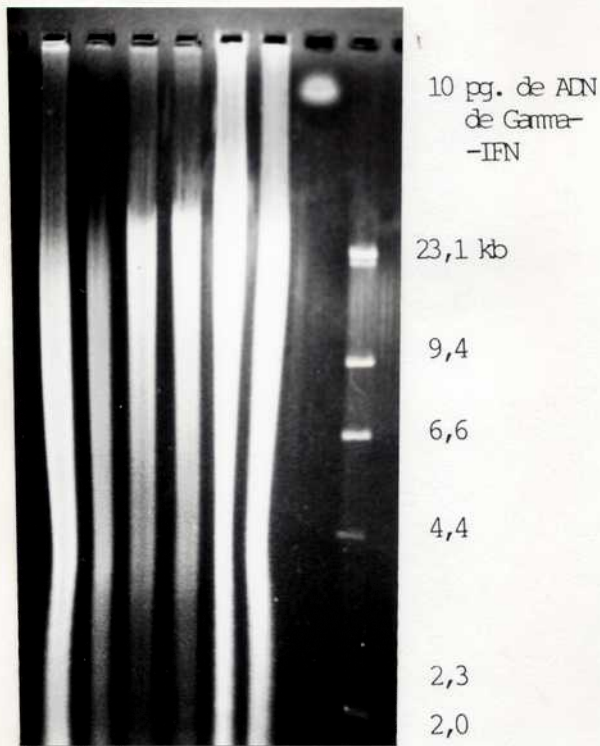


1 2 3 4  
Fig. 40a

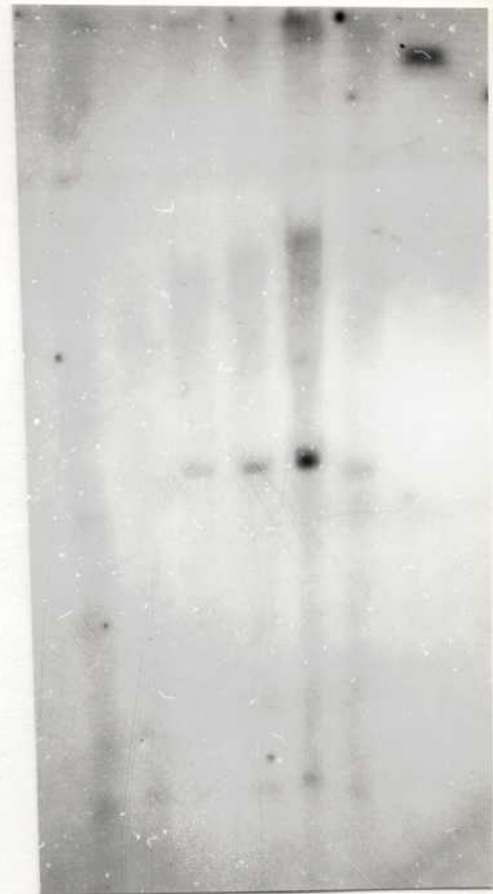


1 2 3  
Fig. 40b

Fig. 40: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Gamma-IFN y ADN humano normal, digerido con Xba I y Kpn I. Se observan algunas calles correspondientes al gel de la fig. 31. 40a: 1-4 ADN digerido con Xba I, individuos nro.: 428, 130, 44 y 43, respectivamente. 40b: 1-3: ADN digerido con Kpn I, individuos nro.: 428, 130 y 44, respectivamente. Se observa un patrón monomórfico.



1 2 3 4 5 6 7  
Fig. 41a



1 2 3 4 5 6  
Fig. 41b

Fig. 41a: Digestión de ADN humano normal con Eco RI y Bam HI. 1 y 2: ADN digerido con Eco RI, individuos nro.: 428 y 397. 3-6: ADN digerido con Bam HI, individuos nro.: 397, 130, 428 más 130 y 428 solo, en función de resolver una supuesta diferencia en el tamaño de las bandas, al hibridarlo. Gel de agarosa de 0,5%. 7: Control de peso molecular, Lambda Hind III, 250 ng. 41b: Autorradiografía correspondiente a la hibridación de Gamma-IFN con el ADN del "Southern" de la fig. 41a. Se observa un patrón monomórfico.



5 - Msp I (Beta-1-IFN)	y	Sst I (Beta-1-IFN)
1 locus		1 locus
6 - Bgl II (Alpha-IFN)	y	Sst I (Beta-1-IFN)
2 loci		1 locus

Los otros haplotipos posibles no pudieron ser reconstruidos por falta de datos. Por este motivo, por ejemplo de los 3 loci polimórficos descritos para Msp I y Alpha-IFN, sólo habían suficientes datos de 2 loci., del tercero no se podían discriminar bien, varias clases genotípicas.

Se diseñó un programa con la planilla de cálculos del Lotus (programa de IBM). Se da como ejemplo desarrollado, el caso de uno de los dos loci de Bgl II (Alpha-IFN) y el locus de Msp I (Beta-1-IFN):

Genotipos (fenotipos):

	Bgl II (Alpha-IFN)	Msp I (Beta-1-IFN)	Nro. de individuos
1 -	5,3 +/--- kb	4,5/4,5 kb	n = 7 1
2 -	5,3 +/--- kb	4,5/2,5 kb	n = 9 2
3 -	5,3 +/--- kb	2,5/2,5 kb	n = 3 3
4 -	5,3 -/4,5 kb	4,5/4,5 kb	n = 1 4
	5,3 -/4,5 kb	4,5/2,5 kb	n = 1 5
6 -	5,3 -/4,5 kb	2,5/2,5 kb	n = 0 6
			N 21
N = tamaño de la muestra			



Recuérdese que no se pudo distinguir entre el genotipo homocigota 5,3 +/5,3 + kb y el genotipo heterocigota 5,3 +/5,3 - kb, por ello se los agrupa en la clase fenotípica 5,3 +/- kb.

**Gametas:**

Bgl II (Alpha-IFN)	Msp I (Beta-1-IFN)	frec. de haplotipos
<u>5,3 + kb</u>	<u>4,5 kb</u>	$p_1$
<u>5,3 + kb</u>	<u>2,5 kb</u>	$p_2$
<u>5,3 - kb</u>	<u>4,5 kb</u>	$p_3$
<u>5,3 - kb</u>	<u>2,5 kb</u>	$p_4$

$$\text{frec. alélica (4,5 kb)} = \hat{p}_1 + \hat{p}_3$$

$$\text{frec. alélica (2,5 kb)} = \hat{p}_2 + \hat{p}_4$$

$$\hat{p}_3 = \left( \frac{n_3}{N} \right)^{1/2} = 0,2182$$

$$\hat{p}_4 = \left( \frac{n_5}{N} \right)^{1/2} = 0$$

Por conteo:

$$\text{frec. alélica (4,5 kb)} = (n_1 + n_4 + 0,5 (n_2 + n_5)) / N$$

$$\text{frec. alélica (4,5 kb)} = 0,6190$$

$$\text{frec. alélica (2,5 kb)} = (n_3 + n_6 + 0,5 (n_2 + n_5)) / N$$

$$\text{frec. alélica (2,5 kb)} = 0,3810$$

$$\hat{p}_1 = \text{frec. alélica (4,5 kb)} - \hat{p}_3 = 0,4008$$

$$\hat{p}_2 = \text{frec. alélica (2,5 kb)} - \hat{p}_4 = 0,3810$$

Es decir de los valores observados se estiman las frecuencias gaméticas:

$$\hat{p}_1 \quad 0,4008$$

$$\hat{p}_2 \quad 0,3810$$

$$\hat{p}_3 \quad 0,2182$$

$$\hat{p}_4 \quad 0$$

Genotipos esperados	frec. esperadas	fenotipos
$p_1 p_1$	0,1607	1
$p_1 p_2$	0,1527	2
$p_1 p_3$	0,0875	1
$p_1 p_4$	0,0000	2
$p_2 p_2$	0,1451	3
$p_2 p_3$	0,0831	2
$p_2 p_4$	0,0000	3
$p_3 p_3$	0,0476	4
$p_3 p_4$	0,0000	5
$p_4 p_4$	0,0000	6

Genotipo 1:

	frec. esperada	frec. esperada relativa	nro. de $p_1$	nro. de $p_3$
$\hat{p}_1 \hat{p}_1$	0,1607	0,6474	2	0
$\hat{p}_1 \hat{p}_3$	0,0875	0,3525	1	1



Suma 42 (el doble del tamaño muestral)

Los resultados de las frecuencias haplotípicas de esta primera ronda, se utilizan para calcular los genotipos esperados nuevamente y continuar los cálculos para estimar las frecuencias en varias rondas más, en forma iterativa. Se dejó de iterar, cuando variaba sólo a partir del tercer decimal.

Se resumen las frecuencias haplotípicas estimadas:

1 - Msp I (Alpha-IFN): N = 67

a -

8,6 kb	7,1 + kb	$\hat{p}_1$	0,0341
<hr/>		1	
7,5 kb	7,1 + kb	$\hat{p}_2$	0,2270
<hr/>		2	
8,6 kb	7,1 - kb	$\hat{p}_3$	0,5554
<hr/>		3	
7,5 kb	7,1 - kb	$\hat{p}_4$	0,1834
<hr/>		4	

b -

8,6 kb	11,3 kb	$\hat{p}_1$	0,3418
<hr/>		1	
7,5 kb	11,3 kb	$\hat{p}_2$	0,2363
<hr/>		2	
8,6 kb	3,1 kb	$\hat{p}_3$	0,2477
<hr/>		3	
7,5 kb	3,1 kb	$\hat{p}_4$	0,1740
<hr/>		4	

2 - Msp I (Alpha-IFN) y Msp I (Beta-1-IFN):

N = 14

a -

<u>11,3 kb</u>	<u>4,5 kb</u>	$\hat{p}_1 = 0,3031$
----------------	---------------	----------------------

<u>11,3 kb</u>	<u>2,5 kb</u>	$\hat{p}_2 = 0,0718$
----------------	---------------	----------------------

<u>3,1 kb</u>	<u>4,5 kb</u>	$\hat{p}_3 = 0,1968$
---------------	---------------	----------------------

<u>3,1 kb</u>	<u>2,5 kb</u>	$\hat{p}_4 = 0,4281$
---------------	---------------	----------------------

b -

<u>7,1 + kb</u>	<u>4,5 kb</u>	$\hat{p}_1 = 0,1540$
-----------------	---------------	----------------------

<u>7,1 + kb</u>	<u>2,5 kb</u>	$\hat{p}_2 = 0,1492$
-----------------	---------------	----------------------

<u>7,1 - kb</u>	<u>4,5 kb</u>	$\hat{p}_3 = 0,3459$
-----------------	---------------	----------------------

<u>7,1 - kb</u>	<u>2,5 kb</u>	$\hat{p}_4 = 0,3507$
-----------------	---------------	----------------------

3 - Msp I (Alpha-IFN) y Sst I (Beta-1-IFN)

N = 8

a -

<u>11,3 kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_1$	=	0,0004
<u>11,3 kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_2$		0,6082
<u>3,1 kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_3$	=	0,1870
<u>3,1 kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_4$		0,2042

b -

<u>7,1 + kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_1$	=	0,1875
<u>7,1 + kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_2$		0,1623
<u>7,1 - kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_3$		0,0000
<u>7,1 - kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_4$		0,6501

4 - Bgl II (Alpha-IFN) y MspI (Beta-1-IFN):

N = 21

a

$$\frac{5,3 + kb}{4,5 kb} \hat{p}_1 = 0,4449$$

$$\frac{5,3 + kb}{2,5 kb} \hat{p}_2 = 0,3251$$

$$\frac{5,3 - kb}{4,5 kb} \hat{p}_3 = 0,1740$$

$$\frac{5,3 - kb}{2,5 kb} \hat{p}_4 = 0,0558$$

b -

$$\frac{2,7 + kb}{4,5 kb} \hat{p}_1 = 0,3355$$

$$\frac{2,7 + kb}{2,5 kb} \hat{p}_2 = 0,2886$$

$$\frac{2,7 - kb}{4,5 kb} \hat{p}_3 = 0,2834$$

$$\frac{2,7 - kb}{2,5 kb} \hat{p}_4 = 0,0923$$



5 - Msp I (Beta-1-IFN) y Sst I (Beta-1-IFN): N = 16

<u>4,5 kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_1 = 0,0935$
<u>2,5 kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_2 = 0,0002$
<u>4,5 kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_3 = 0,4689$
<u>2,5 kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_4 = 0,4372$

6 - Bgl II (Alpha-IFN) y Sst I (Beta-1-IFN): N = 30

a -

<u>5,3 + kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_1 = 0,1000$
<u>5,3 + kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_2 = 0,7691$
<u>5,3 - kb</u>	<u>12,5 kb</u>	$\hat{p}_3 = 0,0000$
<u>5,3 - kb</u>	<u>2,45 kb</u>	$\hat{p}_4 = 0,1308$

b -

$2,7 + kb$	$12,5 kb$	$\hat{p}_1$	0,1000
<hr/>			
$2,7 + kb$	$2,45 kb$	$\hat{p}_2$	0,7091
<hr/>			
$2,7 - kb$	$12,5 kb$	$\hat{p}_3$	0,0000
<hr/>			
$2,7 - kb$	$2,45 kb$	$\hat{p}_4$	0,1908
<hr/>			

Desequilibrio gamético:

Luego de calcular las frecuencias de los diversos haplotipos, se calcularon los desequilibrios gaméticos (Hedrick, 1983, pág 342) para cada caso.

$$\text{Desequilibrio gamético} = D \quad x_1 x_4 - x_2 x_3$$

Siendo:

$$x_1 = \hat{p}_1 \quad x_2 = \hat{p}_3 \quad x_3 = \hat{p}_2 \quad x_4 = \hat{p}_4$$

Es decir:

$$D = \hat{p}_1 \hat{p}_4 - \hat{p}_3 \hat{p}_2$$

Para cada valor de desequilibrio gamético, se calcula el valor de chi cuadrado para ver si el desequilibrio es significativamente distinto de cero.

$$X^2 = (2 N D)^2 / (x_1 x_2 x_3 x_4)$$

Suponiendo 2 genes, gen 1 y gen 2, cada uno con dos alelos (1 y 2):

$$x_1 = \text{frec. alelo 1 del gen 1} \quad x_2 = \text{frec. alelo 2 del gen 1}$$

$$x_3 = \text{frec. alelo 1 del gen 2} \quad x_4 = \text{frec. alelo 2 del gen 2}$$

Se construyó una matriz con los valores de desequilibrio gamético y sus correspondientes chi cuadrado, que se muestran entre paréntesis.

Loci	7,5/8,6	7,1	3,1	5,3	2,7	4,5/2,5	12,5/2,45
7,5/8,6		0,1199 *	0,001				
		(38,84)	(0,002)				
7,1						0,0024 *	0,1219 *
						(0,0045)	(9,3216)
3,1						0,1156 *	0,1136 *
						(7,0338)	(6,7264)
5,3						0,0317	0,0130
						(1,1467)	(0,4764)
2,7						0,0511	0,0191
						(2,3796)	(0,8233)
4,5/2,5							0,0408
							(1,9814)
12,5/2,45							

2  
\* X significativa no sólo para un nivel de significación del 5 %, sino que también para un nivel de significación del 1

## DISCUSION

Se estudió el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la clase I de la familia de genes Alpha-IFN, del gen Beta-1-IFN y del gen Gamma-IFN.

Se analizó ADN de una muestra de individuos normales y de una muestra de individuos leucémicos.

### Tamaño de la muestra:

Se agruparon juntas las muestras normales y de leucémicos para cada locus polimórfico, salvo para Sst I y Beta-1-IFN, pues no pareció haber diferencias estadísticamente significativas entre los individuos normales y los leucémicos. Esto permitió aumentar el tamaño de la muestra, el cual fue diferente para los distintos loci estudiados.

Aumentar el tamaño de la muestra permite estimar mejor las frecuencias alélicas, pues la muestra es más representativa de la población de la que se la extrajo. Es decir los estimadores muestrales se acercan más a los parámetros poblacionales.

Por otra parte es importante estudiar un número grande de individuos no emparentados, en función de descubrir polimorfismos, que es lo que se hizo.

### Loci polimórficos:

Se hallaron 2 loci polimórficos para Bgl II. Los 2 loci parecen ser dominantes, es decir se observa presencia o ausencia de bandas. Uno de los loci se definía por la presencia o ausencia de una banda de 5,3 kb y el otro locus se definía por la presencia o ausencia de una banda de 2,7 kb.

En ambos casos no se pudo discriminar entre los homocigotas 5,3 +/5,3 + kb o 2,7 +/2,7 + kb, o sea cuando la banda estaba en doble dosis y los heterocigotas 5,3 +/5,3 - kb o 2,7 +/2,7- kb, o sea cuando la banda estaba en simple dosis. Esto suele ocurrir con los loci que segregan en forma dominante.

El tamaño de la muestra fue de 84 individuos. Se supuso que la muestra se hallaba en equilibrio de Hardy y Weinberg para poder estimar las frecuencias alélicas y luego, el contenido de información polimórfico:

$$\text{frec. (5,3 + kb)} = 0,78$$

$$\text{frec. (5,3 - kb)} = 0,22$$

$$\text{P.I.C.} = 0,28$$

$$\text{E.S.} = 0,03$$

$$\text{frec. (2,7 + kb)} = 0,69$$

$$\text{frec. (2,7 - kb)} = 0,31$$

$$\text{P.I.C.} = 0,34$$

$$\text{E.S.} = 0,03$$

Se confirmaron los 3 loci polimórficos previamente descriptos (Ohlsson et al., 1985) para Msp I y Alpha-IFN. Los loci eran:

- 1 - Locus de 8,6/7,5 kb, con una segregación codominante.
- 2 - Locus de 11,3/3,1 kb también codominante, aunque no siempre se pudo distinguir entre las 3 clases genotípicas, por lo que se agruparon juntas las clases: 11,3/11,3 kb y 11,3/3,1 kb, en la clase fenotípica 11,3/-- kb.
- 3 Locus de 7,1 +/-7,1 - kb, que segrega en forma dominante. En este caso también se agruparon juntas a las clases genotípicas: 7,1 +/-7,1 + kb y 7,1 +/-7,1 -, en la clase fenotípica 7,1 +/--- kb.

El tamaño de la muestra fue de 67 individuos. Para poder estimar las frecuencias de los loci de 11,3/3,1 kb y de 7,1 +/-7,1 - kb, se supuso que la muestra estaba en equilibrio de Hardy y Weinberg. En cambio para el locus de 8,6/7,5 kb se pudo investigar si el equilibrio existía y se concluyó con que no existía. La muestra no se hallaba en equilibrio de Hardy y Weinberg.

Las frecuencias estimadas y los contenidos de información polimórficos fueron:

frec. (8,6 kb) = 0,59

frec. (7,5 kb) = 0,41

P.I.C. = 0,37

E.S. = 0,04

frec. (11,3 kb) = 0,56

frec. (3,1 kb) = 0,44

P.I.C. = 0,37

E.S. = 0,04

frec. (7,1 + kb) = 0,29

frec. (7,1 - kb) = 0,71

P.I.C. = 0,32

E.S. = 0,04

Se halló un RFLP para Sst I y Beta-1-IFN. Ohlsson et al. (1985), describieron un polimorfismo para Sst I y Beta-1-IFN, para una muestra normal. El locus era de 9,4/2,6 kb. En cambio el hallado durante la presente investigación resultó ser de 12,5/2,45 y segregaba en forma codominante.

Las frecuencias alélicas resultaron ser diferentes significativamente, entre la muestra normal y la leucémica, para nuestra población.

Las frecuencias alélicas y los contenidos de información polimórficos para la muestra normal y para la leucémica, se detallan a continuación (N = tamaño de la muestra):

- Normales:

N = 48

frec. (12,5 kb) = 0,14

frec. (2,45 kb) = 0,86

P.I.C. = 0,23

E.S. = 0,04

- Leucémicos totales: N = 26  
(5 tricoleucémicos, 2 sufrían de leucemia linfocítica crónica y  
19 de leucemia mieloide crónica)

frec. (12,5 kb) = 0,27

frec. (2,45 kb) = 0,73 P.I.C. = 0,32

E.S. = 0,06

- Leucémicos mieloides crónicos: N = 19

frec. (12,4 kb) = 0,32

frec. (2,45 kb) = 0,68 P.I.C. = 0,34

E.S. = 0,07

Cuando se investigó si las muestras se hallaban en equilibrio de Hardy y Weinberg se encontró con que la muestra normal y la de leucémicos totales se hallaba en equilibrio, pero la muestra de enfermos de leucemia mieloide crónica no estaba en equilibrio de Hardy Weinberg (se discute más adelante este punto).

Se confirmó un locus polimórfico previamente descrito por Ohlsson et al. (1985) para Msp I y Beta-1-IFN como 3,9/2,5 kb. El locus aquí descrito, era de 4,5/2,5 kb y segregaba en forma codominante (vease más adelante). El tamaño de la muestra fue de N = 199. Sus frecuencias alélicas así como el contenido de información polimórfico fueron:

frec. (4,5 kb) = 0,69

frec. (2,5 kb) = 0,31 P.I.C. = 0,34

E.S. = 0,02

Se comprobó que estaban en equilibrio de Hardy y Weinberg así como la población estudiada por Ohlsson et al. (1985).



Para Gamma-IFN sólo se halló un polimorfismo raro con Hind III. De 56 individuos estudiados, todos mostraban una banda de ca. 8,3 kb y sólo 2, o sea el 0,03 %, mostraron una banda adicional de ca. 2,3 kb.

#### Segregación de los loci:

Para averiguar como segrega un locus es necesario analizar ADN de familias y observar segregación de bandas u alelos. En nuestro caso esto no fue posible y solo se compararon intensidades de bandas.

De todas maneras, como se estudiaron un gran número de individuos no emparentados, es de esperar que aparezcan los diferentes alelos, o por lo menos los que no son muy raros (frecuencia menor que 1 %).

Sería interesante corroborar algunas de las segregaciones propuestas, estudiando familias, en especial para Bgl II y Alpha-IFN y Sst I y Beta-1-IFN.

#### RFLPs de los genes de interferón en otra población:

La población estudiada por Ohlsson y colaboradores (1985) estaba formada por caucásicos del Norte. La población aquí investigada estaba formada por caucásicos latinoamericanos, que es la población mayoritaria de la Argentina.

Se compararon las frecuencias alélicas de Msp I y Alpha-IFN, para el locus de 8,6/7,5 kb y las genotípicas o mejor dicho fenotípicas, pues hubo que agrupar dos clases en una, para los otros 2 loci.

Para el locus de 8,6/7,5 kb las diferencias no fueron significativas ( $\chi^2 = 3,36 < 3,84$ , valor de tablas para un grado de libertad y con un nivel de significación del 5 %). Por lo contrario, las diferencias fueron significativas para los loci de 11,3/3,1 kb y 7,1 +/7,1 - kb, a juzgar por los valores de chi cuadrado ( $\chi^2 = 5,42$  y  $\chi^2 = 15,38$ , respectivamente).

Los contenidos de información polimórficos, fueron (Ohlsson et al., 1987):

P.I.C. 0,37 para el locus de 8,6/7,5 kb

P.I.C. = 0,26 para el locus de 11,3/3,1 kb

P.I.C. = 0,18 para el locus de 7,1 +/7,1 - kb

El primero de estos P.I.C.s coincide con el aquí descrito, pero los otros dos, son menores que los aquí presentados. Como ya se aclaró en la introducción, los contenidos de información polimórficos, calculados para loci dominantes (presencia vs. ausencia de bandas), son sobreestimaciones del polimorfismo. Es decir que es necesario tomar con prudencia, los valores para los dos últimos loci.

Las diferencias en las frecuencias y en los P.I.C.s puede deberse a el hecho de provenir las dos muestras de poblaciones diferentes. Si bien ambas son de origen caucásico, pudieron haber llegado originalmente a la Argentina, por azar, un grupo de individuos, cuyas frecuencias alélicas eran distintas de las que se establecieron en el Norte. O bien pudieron haber sido originalmente iguales y luego con el tiempo, por deriva genética (ver más abajo) y también, al mezclarse con la población previamente existente en el país, se modificaron las frecuencias alélicas.

Con respecto al locus Sst I y Beta-1-IFN, como se dijo más arriba había una diferencia en el tamaño de uno de los dos alelos entre ambas poblaciones, la investigada por Ohlsson et al (1985) y la nuestra. Ohlsson y colaboradores sólo analizaron una muestra normal y no leucémica.

Los tamaños de las bandas, aquí presentados, fueron calculados mediante una curva de calibración. Además la banda de 12,5 kb aquí descripta coincidía casi perfectamente con la banda de 12,2 kb del marcador de peso molecular Lambda Sma I, en todos los geles analizados. Este marcador se sembraba junto con Lambda Hind III en las calles marginales del gel, al lado del ADN humano. Luego se lo hibridaba con Lambda Hind III, radioactivamente marcado junto con la sonda molecular humana. Es decir se pudo determinar con mucha precisión.

No obstante, la diferencia entre el tamaño de las bandas, puede deberse a un error de medición en cualquiera de las dos poblaciones. Si así no fuera, se trataría entonces de alelos diferentes: 12,5 y 9,4. La otra banda en juego de 2,6 kb, descrita por Ohlsson et al. (1985), parece coincidir con la de 2,45 kb, aquí hallada.

Si se considerase a las bandas de 12,5 y 9,4 kb como iguales, la diferencia entre las frecuencias alélicas entre ambas poblaciones resultaría ser significativa ( $\chi^2 = 15,59$   $P > 1\%$ ).

En el caso del locus polimórfico para Msp I y Beta-1-IFN, no hubo diferencias alélicas significativas entre la población estudiada por Ohlsson et al. (1985) y la estudiada aquí, ( $\chi^2 = 0,22 < 3,84$  para un grado de libertad y un nivel de significación del 5%). Esto es así si se considerasen idénticas las bandas de 3,9 y 4,5 kb, descritas para las poblaciones del Norte y del Sur, respectivamente.

El contenido de información polimórfico, presentado por Ohlsson et al. (1987) fue menor que el de nuestra población (0,34):

$$P.I.C. = 0,25$$

En este caso, así como para Sst I y Beta-1-IFN, existió una discrepancia en el tamaño de las bandas, pues Ohlsson et al., informaron acerca de una banda de 3,9 kb y de otra de 2,5 kb. Esta última coincide con la nuestra, en cambio la banda de mayor peso molecular difiere, de la banda de ca. 4,5 kb, aquí presentada. De todos modos la diferencia en este caso es menor que en el de Sst I. Resulta interesante destacar que la discrepancia se produce en la zona de relativo alto peso molecular.

#### Equilibrio de Hardy y Weinberg:

El principio de Hardy y Weinberg establece que las frecuencias genotípicas para un locus, después de una generación de apareamiento al azar, pueden ser representadas por una función binomial (para un locus dialélico) o multinomial (para un locus multialélico) (Hedrick, 1983).

función binomial:

$$p^2 + 2 p q + q^2 = 1$$

$p^2$  = frecuencia genotípica de un homocigota

$2 p q$  = frecuencia genotípica de los heterocigotas

$q^2$  = frecuencia genotípica del otro homocigota

La función multinomial, se extiende la binomial, aclarando que:

$$p_i^2 + 1/2 P_{ij}^2$$

$p_i$  = frecuencia alélica

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

$H$  = frecuencia de heterocigotas

$j$  es diferente de  $i$ ,  $n$  = nro. de alelos

Además, en ausencia de factores que alteren las frecuencias génicas o alélicas y si se mantiene el apareamiento al azar en la población, las proporciones genotípicas propuestas por Hardy y Weinberg no se alterarán a lo largo del tiempo (Hedrick, 1983). Sería necesario además que la población fuese infinitamente grande, lo cual sólo se cumpliría en una población ideal (Dobzhansky, 1980a).

Las frecuencias alélicas pueden ser alteradas por factores determinísticos o sea dirigidos, o por factores estocásticos, es decir aleatorios. La mutación recurrente, la migración recurrente y la selección serían procesos determinísticos. La deriva genética, en cambio, sería un proceso estocástico (Dobzhansky, 1980b).

Como lo explica muy bien Dobzhansky (1980b), las fluctuaciones en las tasas de mutación, migración y selección natural, los sucesos únicos como una mutación nueva favorable, el desarrollo de una población nueva a partir de uno o unos pocos individuos (efecto fundacional), los incidentes selectivos únicos y los cruzamientos únicos, constituyen también fenómenos estocásticos.

La deriva genética parece ser un proceso estocástico muy importante, debido a accidentes de muestreo en poblaciones pequeñas. Este puede ser el caso de muchas poblaciones originales pequeñas, que colonizaron nuevos lugares geográficos, en especial si permanecen aisladas y en ausencia de factores como la selección natural.

Inicialmente la frecuencia de muchos genes es uniforme, luego de generación en generación la varianza estadística crecerá. Es decir se produce un desplazamiento genético al azar, una deriva genética, que hace que con el tiempo las frecuencias alélicas varíen, llegando incluso, en algunos casos, a fijarse algún alelo en la población (frecuencia igual a 1)

Otra alternativa sería que el pequeño (relativamente hablando) grupo migratorio que llegó, tenía frecuencias alélicas distintas, tal vez con algunos alelos con mayor y otros con menor frecuencia que la población grande original e incluso con alguno o algunos alelos ausentes.

Una generación se forma a partir de una muestra de gametas tomadas del acervo génico o gamético, de la generación anterior. En una población pequeña, como puede ser el caso de una población fundadora, los errores de muestreo serán mayores, es decir, no estarán igualmente representadas todas las gametas de la generación anterior (Dobzhansky, 1980b).

Por todo lo anterior, no es raro que la población aquí estudiada, de caucásicos latinoamericanos y la del norte, de caucásicos europeos (Ohlsson et al., 1985), tengan en algunos casos frecuencias génicas o genotípicas, diferentes.

### Haplotipos y desequilibrio gamético:

Se reconstruyeron los haplotipos mediante el método de aproximación por iteración de Ceppellini et al. (19 ). De los 11 desequilibrios gaméticos estimados, 4 resultaron ser significativamente distintos de 0, con un nivel de significación del 1 %.

Los desequilibrios gaméticos o de ligamiento significativos, se producían entre:

- El locus de 7,1 +/-7,1 - kb y el locus de 7,5/8,6 kb, ambos para Msp I y Alpha-IFN.
- El locus de 7,1 +/-7,1 - kb de Msp I y Alpha-IFN y el locus de 12,5/2,45 para Sst I y Beta-1-IFN.
- El locus de 11,3/3,1 kb para Alpha-IFN y el de 4,5/2,5 kb para Beta-1-IFN, ambos loci con Msp I.
- El locus de 11,3/3,1 kb para Msp I y Alpha-IFN y el locus de 12,5/2,45 para Sst I y Beta-1-IFN.

Esto significa que habría desequilibrio de ligamiento dentro de la familia de genes Alpha-IFN y entre Alpha y Beta-1-IFN. Además, si dos loci se encuentran en desequilibrio de ligamiento, cualquiera de los dos no aportará información adicional al otro.

Por otra parte el desequilibrio gamético, corrobora la cercanía física entre estos genes. Sin embargo, es necesario aclarar que la recombinación no depende solo de la distancia, sino también de ciertas áreas ("puntos calientes") cromosómicas. En estas zonas, la recombinación se produce más frecuentemente. (Kobori et al., 1986).

## Contenido de información polimórfico (P.I.C.):

Recordemos que el contenido de información polimórfico que se explicó en la introducción (Botstein et al., 1980), se podía clasificar en:

P.I.C. > 0,5 es altamente informativo

0,5 > P.I.C. > 0,25 es razonablemente informativo

P.I.C. < 0,25 es levemente informativo

Salvo el locus de 5,3 +/- 5,3 - kb para Bgl II y Alpha-2-IFN y el locus de 12,5/2,45 para Sst I y Beta-1-IFN que resultaron ser levemente informativos, todos los demás loci fueron razonablemente informativos.

Resulta interesante destacar que el P.I.C. para la muestra normal de Sst I y Beta-1-IFN era levemente informativo, mientras que para las muestras leucémicas (una general y otra solo de leucémicos mieloides crónicos), el P.I.C. resultó ser razonablemente informativo, lo que lo convertiría en un marcador genético interesante.

## Polimorfismo a nivel génico y a nivel protéico:

Como ya se dijo (ver introducción), la mayor parte de los polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) descritos para un gran número de loci, en diferentes especies, parecen ser neutros. Esto parece ser así, pues las mutaciones se encuentran en zonas no codificadoras y no regulatorias del gen, generalmente lejos, en pares de bases, del mismo.

En algunos de los loci polimórficos aquí analizados, las diferencias parecen ser neutras, no se expresan a nivel de las proteínas. Esto parece ocurrir con Msp I y Beta-1-IFN y Sst I y Beta-1-IFN, pues este gen no tiene sitios internos de restricción para ambas enzimas.

Para Alpha-IFN, el tema es más complicado, pues si bien Alpha-2-IFN, que es el gen que se utilizó como sonda molecular,

no tiene sitios internos para Msp I, puede ser que los otros genes de la familia si posean algún sitio interno de reconocimiento de Msp I. En el caso de Bgl II, el gen Alpha-2-IFN posee 2 sitios internos y por ejemplo el gen Alpha-1-IFN posee un solo sitio Msp I interno.

Como ya se dijo, los polimorfismos a nivel del ADN para IFN, hallados por Ohlsson et al (1985), los llevaron a proponer el estudio de las diferencias individuales en la producción de interferón y en la resistencia a enfermedades, controlada por los interferones. Es decir tal vez estos polimorfismos o por lo menos alguno de ellos no fuesen neutros.

Finter (1991), en una conferencia dictada, acerca de por qué hay tantos subtipos diferentes de Alpha-IFN, dijo que habría dos explicaciones alternativas:

- Los diferentes subtipos serían el resultado de accidentes evolutivos de significado biológico neutro.
- Cada subtipo cumpliría una función específica en el cuerpo.

Finter (1991), propone para resolver esta cuestión, estudiar qué subtipos particulares de IFN-Alpha se producen en diferentes circunstancias; determinar si los interferones difieren mucho en sus propiedades biológicas in vitro o si tienen actividades únicas y por último comparar, en estudios clínicos, el comportamiento de subtipos individuales y de mezclas de subtipos.

Kawade (1991) enfatiza el hecho de la falta de información suficiente sobre el funcionamiento de los interferones en forma fisiológica, en un animal intacto y no in vitro. Si bien lo anterior ya se está realizando, aún falta investigar mucho, para responder a estos interrogantes.

Por otra parte, especialmente en las tricoleucemias (Quesada et al., 1984; Coci et al., 1987; Golomb & Ratain, 1987), pero también en las leucemias mieloides crónicas, el interferón exógeno cumple un papel terapéutico importante (Ogura et al., 1990), que deja interrogantes acerca del interferón endógeno y fisiológico. Cabe preguntarse si los polimorfismos génicos (Alpha, Beta-1 y Gamma-IFN), juegan algún rol en estas enfermedades.



En células linfoides derivadas de pacientes con tricoleucemia o con leucemia linfática crónica, no se pudieron detectar receptores celulares para Gamma-IFN (Pestka et al., 1987).

En la presente investigación no se hallaron diferencias significativas entre normales y leucémicos, en todos los casos, salvo en uno (Sst I y Beta-1-IFN). No obstante es necesario recalcar que la expresión de un gen tiene varios niveles de regulación, sobre todo en eucariontes donde hay compartimentalización. Aquí solo se analizó el nivel genómico, aclarando también que sólo se pudieron detectar diferencias que alterasen a los sitios de restricción investigados. Es decir, hay una subestimación de la variabilidad genética existente.

Además, aun en el caso en que no se hallaran diferencias significativas en las frecuencias alélicas, ni la aparición de alelos nuevos (patrón de hibridación diferente), es necesario investigar citológicamente las células, en especial la de los pacientes leucémicos.

Díaz et al., (1986) investigaron pacientes de leucemia monocítica aguda y descubrieron una translocación del gen Beta-1-IFN del brazo corto del cromosoma 9 en donde se halla normalmente, al brazo largo del cromosoma 22, t(9;11)(p22;q23). El agrupamiento de genes Alpha-IFN, permanecía en su sitio original.

Cuando analizaron las muestras mediante Southern, observaron al hibridar con Alpha y con Beta-1-IFN que los patrones de hibridación permanecían inalterados. Esto implicaba que las secuencias regulatorias de la transcripción del gen Beta-1-IFN, se translocaron junto con éste, al cromosoma 11.

De lo anterior se deduce que pueden ocurrir reordenamientos cromosómicos que no se manifiesten en un análisis de hibridación molecular en membranas de Southern. Se ponen de manifiesto, en cambio, con una hibridación in situ, es decir citológica. Es por ello que para completar el presente estudio, sería interesante realizar una investigación citológica que por distintos motivos no pudo realizarse hasta ahora. De todas maneras, hasta ahora no se han descrito alteraciones citológicas visibles, que afecten al cromosoma 9, en las tricoleucemias.

No obstante, pueden descartarse grandes reordenamientos como deleciones o inserciones, dentro del agrupamiento de genes Alpha

y el gen Beta-1-IFN, pues se hubiesen detectado modificaciones en el patrón de hibridación para varias enzimas estudiadas. Esto parece ser así tanto para los individuos normales como para los leucémicos.

Con respecto al sistema Sst I y Beta-1-IFN, las diferencias alélicas y genotípicas, entre normales y leucémicos parecían ser significativas, a juzgar por las pruebas de contingencia y de heterogeneidad. Es importante aclarar que cuando la muestra está formada por menos de 50 individuos, es necesario tomar con precaución los resultados que de allí se extraigan (Hedrick, 1983). Lo mismo ocurre si alguna clase analizada posee menos de 5 individuos. Esto ocurre con este sistema.

Es necesario entonces, aumentar el tamaño de la muestra. Si bien en la presente investigación esto no se pudo realizar, sería importante tomarlo en cuenta para un futuro. De todas maneras, la misma muestra, igualmente pequeña fue analizada para los otros sistemas y no se encontraron para ellos, diferencias significativas entre normales y leucémicos.

Las diferencias halladas entre normales y leucémicos para este locus podrían deberse a errores de muestreo, es decir la muestra estaría desviada. Este punto es más importante de lo que en principio parece. Vineis & Caporaso (1991), en un trabajo reciente, muy interesante, sobre RFLPs y cáncer humano, llaman la atención sobre falsas conclusiones a las que se pueden arribar debido a falta de información. Se transcribe traducido, un párrafo de su trabajo (Vineis & Caporaso, 1991, pag.: 29) por la claridad de conceptos:

"Las poblaciones normales deben ser estudiadas en función de tener claro la distribución alélica en los subgrupos étnicos. Esta información es absolutamente esencial en función de interpretar en forma válida, cualquier asociación observada, debido a que es un axioma que los grupos étnicos exhibirán variaciones genéticas. La incidencia de cáncer de muchos, sino todos los tipos tumorales, variará por motivos relacionados tanto con factores ambientales como genéticos y es posible que se produzcan confusiones si se ignora la variabilidad de los grupos étnicos".

A la luz del párrafo anterior, se entiende porque son importantes los errores de muestreo. Es decir, no se puede descartar a priori, que haya diferencias de subgrupos étnicos en juego, aun cuando se trate de la misma población caucásica latinoamericana.

Para resolver esta situación es importante, en primer término, ampliar el tamaño de la muestra normal, de manera de tener una representación mayor de la población, que englobase a los diferentes subgrupos. Luego o simultáneamente, ampliar la muestra de leucémicos, sobre todo la de leucémicos mieloides crónicos, que es donde las diferencias resultaron ser altamente significativas.

Hechas estas salvedades, volvamos ahora, al locus polimórfico Sst I y Beta-1-IFN. Como se dijo más arriba, la muestra normal y la leucémica total (tricoleucémicos, leucémicos linfocíticos crónicos y leucémicos mieloides crónicos) no se hallaban en equilibrio de Hardy y Weinberg. Cuando se analizaban sólo los individuos que sufrían leucemia mieloide crónica la muestra parecía estar en equilibrio de Hardy y Weinberg.

Esto último parece extraño, pues si hubiera errores de muestreo que explicasen el desvío del equilibrio de Hardy y Weinberg, es de esperar que estos errores se produjesen en una muestra menor como la de los leucémicos mieloides crónicos y no en las muestras mayores, sobre todo en la normal.

Una explicación posible podría ser que por algún motivo desconocido, el alelo minoritario en la población normal estuviese sufriendo algún tipo de presión de selección, que disminuyese su frecuencia. Esto explicaría en parte, el desvío del equilibrio de Hardy y Weinberg, de la muestra normal. Esta presión no se estaría ejerciendo en los individuos leucémicos mieloides crónicos y tal vez sí, en leucémicos en general. Pero, es necesario reiterar que estas conclusiones deben ser revisadas, cuando se amplíe el tamaño muestral.

Reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.):

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction) permite amplificar moléculas de ADN únicas o en muy pocas copias que se encuentran inmersas en un conjunto de secuencias genómicas (Innis & Gelfand, 1990). Por ejemplo mediante este método se puede detectar una célula tumoral dentro de un millón de células normales, siempre que se disponga de los "primers" específicos adecuados. Por el contrario para poder detectar un gen de copia única de aproximadamente 1 kb, es necesario digerir 10 ug de ADN humano, de esta manera se detectan 3 pg del ADN de interés. Es decir hay una gran diferencia en la sensibilidad de los métodos.

El método de P.C.R. se utiliza mucho en el diagnóstico de las enfermedades genéticas como por ejemplo en los casos de la hemofilia A y de la distrofia muscular de Duchenne.

El método de hibridación en membranas de Southern, permite una "vista panorámica" sobre el genoma, en particular sobre los polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción para un gran número de enzimas.

Una vez hallado un polimorfismo interesante, con un contenido de información polimórfico, por lo menos razonablemente informativo y hallada una asociación o correlación con alguna enfermedad, tal vez resulte útil utilizar la técnica del P.C.R., en algunos casos.

Como se dijo más arriba, esto requiere de la síntesis de los "primers" específicos. Es decir es posterior al descubrimiento de el o los polimorfismos de interés.

Para concluir diremos, que no resultó sencillo encontrar RFLP en los genes de interferón, pero se pudo hallar polimorfismos nuevos y confirmar para nuestra población, polimorfismos descritos en otras latitudes.

Gamma-IFN resultó particularmente difícil en esta búsqueda de polimorfismo, y ya había sido descrito en la literatura como un gen altamente conservado. No obstante se pudo hallar un polimorfismo nuevo (Gray & Goeddel, 1982).

Sería interesante ampliar las muestras de individuos normales y de leucémicos, en especial para el locus polimórfico de Sst I y Beta-1-IFN. También sería útil estudiar la segregación de los loci polimórficos, en familias informativas.

E. Rzentler

Foré ee Foré

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ambinder R.F., P.Charache. S.Staal, P.Wright, M.Forman, S.D.Hayward & G.S.Hayward. 1986.  
The Vector Homology Problem in Diagnostic Nucleic Acid Hybridization of Clinical Specimens  
Journal of Clinical Microbiology 24(1):16-20.

Ayala, F.J. 1980.  
Filogenias y macromoléculas  
En: Evolución. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.  
Pag.: 262-311.

Baird, P.A., T.W.Anderson, H.B.Newcombe & R. B.Lowry. 1988.  
Genetic Disorders in Children and Young Adults: A Population Study  
Am. J. Hum. Genet. 42: 677-693.

Bartholomew C. & J.D.Windass. 1989.  
Identification of a Functional Allele of a Human Interferon-Alpha Gene Previously Characterized as a Pseudogene  
J. Interferon Res. 9: 407-417.

Birnboim, H.C. & J.Doly. 1979.  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA  
Nucleic Acids Research 7(6): 1513-1523.

Bishop J.M. 1987.  
The Molecular Genetics of Cancer  
Science 235: 305-311.

Botstein D., R.L.White, M.Skolnick, & R.W.Davis. 1980.  
Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms  
Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.

Capobianchi M.R., F.De Marco, P.Di Marco, & F.Dianzani. 1988.

Acid-labile human interferon alpha production by peripheral blood mononuclear cells stimulated by HIV-infected cells  
Arch. Virol. 99: 9-19.

Capon D.J., H.M.Shepard, & D.V.Goeddel. 1985.

Two Distinct Families of Human and Bovine Interferon-Alpha Are Coordinately Expressed and Encode Functional Polypeptides  
Mol. Cell. Biology 5(4): 768-779.

Caruso A., R.Gonzalez, R.Stellini, A.Scalzini, L.Peroni, & A.Turano. 1990.

Interferon-Gamma Marks Activated T Lymphocytes in AIDS Patients  
Aids Research and Human Retriviruses 6(7): 899-904.

Ceppellini R., R.Siniscalco & C.A.B.Smith.

The Estimation of Gene Frequencies in a Random-Mating Population  
Hum. Gen. 20(2): 97-115.

Claiborne Stephens J., M.L.Cavanaugh, M.I.Gradie, M.L.Mador & K.K.Kidd. 1990.

Mapping the Human Genome: Current Status  
Science 250: 237-244.

Coci A., A.Castello, G.Pagnucco, U.Magrini, S.Merante, E.Brusamolino, G.Castelli, A.Canevari & C.Bernasconi. 1987.

Bone Marrow Histology in Patients with Hairy Cell Leukemia (HCL) treated by Human Lymphoblastoid interferon  
Hematologica 72:143-149.

Curling E.M.A., P.M.Hayter, A.J.Baines, A.T.Bull, K.Gull, P.G.Strange & N.Jenkins. 1990.

Recombinant human interferon-Gamma Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture  
Biochem J. 272: 333-337.

De Grado W.F., Z.Wasserman & V.Chowdhry. 1982.  
Sequence and structural homologies among type I and type  
II interferons  
Nature 300: 379-381.

Derynck R., R.Devos, E.Remaut, E.Saman, P.Stanssens,  
J.Tavernier, G.Volckaert, J.Content, E.De Clercq &  
W.Fiers. 1981.  
Isolation and Characterization of a Human Fibroblast  
Interferon Gene and its Expression in Escherichia coli  
Reviews of Infectious Diseases 3(6): 1186-1195.

Dianzani F., A.Dolei, & P.Di Marco. 1986.  
A New Type of Human Interferon Produced by Peripheral  
Blood Mononuclear Cells Treated with Inhibitors of  
Transcription  
J. Interferon Res. 6: 43-50.

Díaz M.O., M.M.Le Beau, P.Pitha, & J.D.Rowley. 1986.  
Interferon and c-myc Genes in the Translocation (9;11)  
(p22;q23) in Human Acute Monocytic Leukemia  
Science 231: 265-267.

Díaz M.O., C.M.Rubin, A.Harden, S.Ziemin, R.A.Larson,  
M.M.Le Beau & J.D.Rowley. 1990a.  
Deletions of Interferon Genes in Acute Lymphoblastic  
Leukemia  
The New England Journal of Medicine 322(2): 77-82.

Díaz M.O., C.M.Rubin, A.Harden, S.Ziemin, R.A.Larson,  
M.M.Le Beau & J.D.Rowley. 1990b.  
Correspondence  
The New England Journal of Medicine 323(2):131-132.

Díaz M.O., S.Ziemin, M.M.Le Beau, P.Pitha, S.D.Smith,  
R.R.Chilcote & J.D.Rowley. 1988.  
Homozygous deletion of the Alpha and Beta-1-interferon  
genes in human leukemia and derived cell lines  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5259-5263.

Dobzhansky, T. 1980a.  
Selección natural  
En: Evolución. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. Pag.:  
96-128.

Dobzhansky, T. 1980b.  
Poblaciones, razas, subespecies  
En: Evolución. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. Pág.:  
129-166.

Dover G, S. Brown, E. Coen, J. Dallas, T. Strachan &  
M. Trick. 1982.  
The Dynamics of Genome Evolution and  
Species Differentiation  
En: Genome Evolution. Dover & Flavell editores. Academic  
Press, London. The Systematics Association Special  
Volume No. 20: 343-372.

Duc-Goiran P., B. Robert-Galliot, J. Lopez, & C. Chany.  
1985.  
Unusual apparently constitutive interferons and  
antagonists in human placental blood  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5010-5014.

Duncan A.M.V., M. Buchwald & L.-C. Tsui. 1988.  
In situ hybridization of two cloned chromosome  
7 sequences tightly linked to the cystic fibrosis locus.  
Cytogenet. Cell Genet. 49: 309-310.

Epstein L.B. 1982.  
Interferon-Gamma: success, structure and speculation  
Nature 295: 453-454.

Feinstein S.I., Y. Mory, Y. Chernajovsky, L. Maroteaux,  
U. Nir, V. Lavie, & M. Revel. 1985.  
Family of Human Alpha-Interferon-Like Sequences  
Mol. Cell. Biology 5(3): 510-517.

Finter N.B. 1991  
Why Are There So Many Subtypes of Alpha-Interferons?  
J. Interferon Res., Special Issue: 185-194.

Gillespie D. & W. Carter. 1983.  
Concerted Evolution of Human Interferon Alpha Genes  
J. Interferon Res. 3(1): 83-88.

Golomb H.M. & M.J. Ratain. 1987.  
Recent advances in the treatment of Hairy-Cell Leukemia  
New England Journal of Medicine 316: 870-872.



Goren T., D.G.Fischer & M.Rubinstein. 1986 a.  
Human monocytes and lymphocytes produce different  
mixtures of Alpha-interferon subtypes  
J. Interferon Res. 6: 323-329.

Goren T., D.G.Fischer & M.Rubinstein. 1986 b.  
Priming of leukocytes selectively increases the level  
of some interferon-Alpha subtypes and not others  
Biochim. Biophys. Acta 887: 80-85.

Gray P.W. & D.V.Goeddel, 1982.  
Structure of the human immune interferon gene  
Nature 298: 859-863.

Gray P.W., D.W.Leung, D.Pennica, E.Yelverton,  
R.Najarian, C.C.Simonsen, R.Derynck, P.J.Sherwood,  
D.M.Wallace, S.L.Berger, A.D.Levinson & D.V.Goeddel.  
1982.  
Expression of human immune interferon cDNA in E. coli  
and monkey cells  
Nature 295: 503-508.

Gren E., V.Berzin, I.Jansone, A.Tsimanis, Y.Vishnevsky,  
& U.Apsalons. 1984.  
Novel Human Leukocyte Interferon Subtype and Structural  
Comparison of Alpha Interferon Genes  
J. Interferon Res. 4: 609-617.

Gusella J.F. 1986.  
DNA polymorphism and human disease  
Ann. Rev. Biochem. 55: 831-854.

Hames B.D. & S.J.Higgins (Editores). 1985.  
Nucleic acid hybridisation, a practical approach  
IRL Press Limited (Eds.), Oxford. 245 pág.

Hanahan D. 1983.  
Studies on Transformation of Escherichia coli with  
plasmids  
J. Mol.Biol. 166: 557-580.

Hedrick P.W. 1983.  
Genetics of Populations  
Science Books International. 629 pág.

Henco K., J.Brosius, A.Fujisawa, J.-I. Fujisawa, J.R.Haynes, J.Hochstadt, T.Kovacic, M.Pasek, A.Schambock, J.Schmid, K.Todokoro, M.Walchli, S.Nagata & C.Weissmann. 1985.

Structural Relationship of Human Interferon Alpha Genes and Pseudogenes  
J. Mol. Biol. 185: 227-260.

Henry L., J.Sizun, C.Turleau, J.Boue, M.Azoulay & C.Junien. 1984.

The gene for human fibroblast interferon (IFB) maps to 9p21  
Hum. Genet. 68: 67-69.

Hiscott J., K.Cantell & C.Weissmann. 1984.

Differential expression of human interferon genes  
Nucleic Acids Research 12(9): 3727-3746.

Hofmann V., J.Fehr, C.Sauter & J.Ottino. 1985.

Hairy cell leukemia: an interferon deficient disease?  
Cancer Treatment Reviews 12 (Supplement B):33-37.

Hotta K., K.J.Collier, & S.Pestka. 1986.

Detection of a Single Base Substitution between Human Leukocyte IFN-Alpha A and -Alpha 2 Genes with Octadecyl Deoxyoligonucleotide Probes  
Methods in Enzymology 119: 481-485.

Hotta,K., J.Monahan, K.J.Collier & S.Pestka. 1988.

Detection of Human Leukocyte Interferon-Alpha-A and Alpha-2 Genes in Genomic DNAs by the Use of Deoxyoctadecyloligonucleotide Probes  
J. Interferon Res. 8: 51-60.

Innis M.A. & D.H.Gelfand. 1990.

Optimization of PCRs

En: PCR Protocols A Guide to Methods and Applications  
Academic Press, Inc. San Diego.

Jeffreys A.J. 1982.

Evolution of Globin Genes

En: Genome Evolution. Dover & Flavell editores. Academic Press, London. The Systematics Association Special Volume No. 20: 157-176.

Jeffreys A.J., V.Wilson & S.L.Thein. 1985a.  
Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA  
Nature 314: 67-73.

Jeffreys A.J., V.Wilson & S.L.Thein. 1985b.  
Individual-specific 'fingerprints' of human DNA  
Nature 316: 76-79.

Kawade Y. 1991.  
Cytokine Network in Analogy to Language - A General View  
of Interferon Research from a Distance  
J. Interferon Res. Special Issue: 177-1833.

Knudson A.G., Jr. 1985.  
Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes  
Cancer Research 45: 1437-1443.

Kobori J.A., E.Strauss, K.Minard & L.Hood. 1986  
Molecular Analysis of the Hotspot of Recombination in  
the Murine Major Histocompatibility Complex  
Science 234: 173-179.

Koenig M., A.H.Beggs, M.Moyer, S.Scherpf, K.Heindrich,  
T.Bettecken, G.Meng, C.R.Muller, M.Lindlof,  
H.Kaariainen, A.de la Chapelle, A.Kiuru, M.-L.Savontaus,  
H.Gilgenkrantz, D.Récan, J.Chelly, J.-C.Kaplan,  
A.E.Covorne, N.Archidiacono, G.Romeo, S.Liechti-Gallati,  
V.Schneider, S.Braga, H.Moser, B.T.Darras, P.Murphy,  
U.Francke, J.D.Chen, G.Morgan, M.Denton, C.R.Greenberg,  
K.Wrogemann, L.A.J.Blonden, H.M.B.van Paassen, G.J.B.  
van Ommen & L.M.Kunkel. 1989.  
The Molecular Basis for Duchenne versus Becker Muscular  
Dystrophy: Correlation of Severity with Type of Deletion  
Am. J. Hum. Genet. 45: 498-506.

Kontsek P., L.Borecky, E.Kontsekova, M.Novak, &  
V.Krchnak. 1990.  
Antigenic Link Between Human Interferons-Alpha and  
Beta: The Common Epitope 1  
J. Interferon Res. 10: 119-128.

Laing, N.G., P.A.Akkari, D.C.Chandler, H.E.Thomas, M.G.Layton, M.E.Mears & B.A.Kakulas. 1990.  
Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene cDNA 8 Pst I and Tag I polymorphisms involve exon 51 of the Hind III map  
Nucleic Acids Research 18(14): 4284.

Landegren U., R.Kaiser, C.T.Caskey & L.Hood. 1988.  
DNA Diagnostics-Molecular Techniques an Automation  
Science 242: 229-237.

Lawn, R.M., M.Gross, C.M.Houck, A.E.Franke, P.V.Gray & D.V.Goeddel. 1981.  
DNA sequence of a major human leukocyte interferon gene  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(9): 5435-5439.

Maniatis T., E.F.Fritsch & J.Sambrook. 1982.  
Molecular Cloning  
A Laboratory Manual  
Cold Spring Harbor Laboratory. 545 pág.

May L.T., J.Ghrayeb, U.Santhanam, S.B.Tatter, Z.Sthoeger, D.C.Helfgott, N.Chiorazzi, G.Grieninger & P.B.Sehgal. 1988.  
Synthesis and Secretion of Multiple Forms of Beta-2-Interferon/B-Cell Differentiation Factor 2/Hepatocyte-stimulating Factor by Human Fibroblasts and Monocytes  
The Journal of Biological Chemistry 263(16): 7760- 7766.

May L.T., F.R.Landsberger, M.Inouye & P.B.Sehgal. 1985.  
Significance of similarities in patterns: An application to Beta interferon-related DNA on human chromosome 2  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4090-4094.

Miyata T., H.Hayashida, R.Kikuno, H.Toh, & Y.Kawade. 1985.  
Evolution of Interferon Genes  
En: Interferon 6 1985. Academic Press, London. Pag.:1-30.

Nagata S., N.Mantei & C.Weissmann. 1980 a.  
The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-Alpha  
Nature 287: 401-408.

Nagata S., H.Taira, A.Hall, L.Johnsrud, M.Streuli, J.Eosodi, W.Boll, K.Cantell & C.Weissmann. 1980 b.  
Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity  
Nature 284: 316-320.

Naylor S.L., A.Y.Sakaguchi, T.B.Shows, M.L.Law, D.V.Goeddeld & P.W.Gray. 1983.  
Human Immune Interferon Gene is located on Chromosome 12  
J. Exp. Med. 57: 1020-1027.

Nei, M. 1987  
Molecular Evolutionary Genetics  
Columbia Univ. Press. New York. Pág 166.

Ogura H., K.Tani, Y.Kozai, K.Watari, H.Kodo, K.Ozawa, S.Asano & F.Takaku. 1990.  
Effect of Interferon-Alpha in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia in the Accelerated Phase: Cytogenetic and Molecular Studies  
Jpn. J. Cancer Res. 81: 682-686.

Ohlsson M., J.Feder, L.L.Cavalli-Sforza, & A.Von Gabain. 1985.  
Close linkage of Alpha and Beta interferons and infrequent duplication of Beta interferon in humans  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4473-4476.

Ohlsson M., J.Feder, L.L.Cavalli-Sforza, & A.Von Gabain. 1987.  
En: Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques  
Human Gene Mapping 9 (1987): Update to the Ninth International Workshop on Human Gene Mapping. Cytogenet. Cell Genet. 46: 450.

Orkin S.H. 1984.  
Prenatal Diagnosis of Hemoglobin Disorders by DNA Analysis  
Blood 63(2): 249-253.

Orkin S.H. 1986.  
Reverse Genetics and Human Disease  
Cell 47: 845-850.

Owerbach D., W.J.Rutter, T.B.Shows, P.Gray, D.V.Goeddel & R.M.Lawn. 1981.

Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(5): 3123-3127.

Pearson P.L., K.K.Kidd, & H.F.Willard. 1987.

Report of the Committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques.

Cell Genet. 46: 390-394.

Pestka S., B.Kelder, P.C.Familletti, J.A.Moschera, R.Crowl & E.S.Kempner. 1983.

Molecular Weight of the Functional Unit of Human Leukocyte, Fibroblast, and Immune Interferons

The Journal of Biological Chemistry 258: 9706-9709.

Pestka S., J.A.Langer, K.C.Zoon & C.E.Samuel. 1987.

Interferons and their actions

Ann. Rev. Biochem. 56: 727-777.

Pitha-Rowe P.M. 1990.

A New class of Suppressor genes?

Cancer Cells 2: 215-216.

Preble O.T., R.J.Black, R.M.Friedman, J.H.Klippel & J.Vilcek. 1982.

Systemic Lupus Erythematosus: Presence in Human Serum of an Unusual Acid-Labile Leukocyte Interferon

Science 216: 429-431.

Quesada J.R., J.Reuben, J.T.Manning, E.M.Hersh J.U.Gutterman. 1984.

Alpha Interferon for induction of remission in Hairy-Cell Leukemia

The New England Journal of Medicine 310: 15-18.

Revel M. 1983.

Genetic and Functional Diversity of Interferons in Man

En: Interferon 5 1983. Academic Press, London. Pág.: 205-239.

Riggin C.H., JR., & P.M.Pitha. 1982.  
Methylation and a Polymorphic Restriction Site Adjacent  
to Human Beta-Interferon Gene  
DNA 1(3): 267-271.

Rinderknecht E., B.H.O'Connor & H.Rodriguez. 1984.  
Natural Human Interferon-Gamma  
Complete amino acid sequence and determination of sites  
of glycosylation  
The Journal of Biological Chemistry 259(11): 6790-6797.

Romeo G., G.Fiorucci & G.B.Rossi. 1989.  
Interferons in Cell Growth and Development  
Trends in Genetics 5(1): 19-24.

Rubinstein M. 1987.  
Multiple Interferon Subtypes: The Phenomenon and Its  
Relevance  
J. Interferon Res. 7: 545-551.

Rubinstein M., W.P.Levy, J.A.Moschera, C.-Y.Lai,  
R.D.Hershberg, R.T.Bartlett & S.Pestka. 1981.  
Human Leukocyte Interferon: Isolation and  
Characterization of Several Molecular Forms  
Archives of Biochemistry and Biophysics 210(1): 307-318.

Sagar A.D., L.T.May, & P.B.Sehgal. 1983.  
DNA Methylation and the Expression of Human Interferon  
Alpha-1-Related Genes and the Beta-1 Gene  
J. Interferon Res. 3(3): 365-369.

Sagar A.D., L.T.May & P.B.Sehgal. 1985.  
Rearrangement and amplification of human interferon-  
Beta-related DNA  
Genome Rearrangement, pág: 253-261.

Sehgal P.B. 1982.  
How Many Human Interferons Are There?  
En: Interferon 1982. Volume 4. Academic Press, London.  
Pág.: 1-22.

Sehgal P.B., A.Zilberstein, R.-M. Ruggieri, L.T.May  
A.Ferguson-Smith, D.L.Slate, M.Revel & F.H.Ruddle. 1986.  
Human chromosome 7 carries the Beta-2 interferon gene  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5219-5222.

Skolnick M.H. & R.White. 1982.  
Strategies for detecting and characterizing restriction  
fragment length polymorphisms (RFLP's)  
Cytogenet. Cell Genet. 32: 58-67.

Slate D.L., F.H.Ruddle & Y.H.Tan. 1981.  
Genetic Control of the Interferon System  
En: Interferon 3 1981. Academic Press, London. Pag.:  
65-76.

Southern E.M. 1975.  
Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments  
Separated by Gel Electrophoresis  
J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Sugimura H., N.E.Caporaso, R.V.Modali, R.N.Hoover,  
J.H.Resau, B.F.Trump, J.A.Lonergan, T.G.Krontiris,  
D.L.Mann, A.Weston & C.C.Harris. 1990.  
Association of Rare Alleles of the Harvey ras  
Protooncogene Locus with Lung Cancer  
Cancer research 50: 1857-1862.

Taya, Y., R.Devos, J.Tavernier, H.Cheroutre, G.Engler,  
& W.Fiers. 1982.  
Cloning and structure of the human immune interferon-  
Gamma chromosomal gene  
The EMBO Journal 1(8): 954-958.

Taniguchi T., N.Mantei, M.Schwarzstein, S.Nagata,  
M.Muramatsu & C. Weissmann. 1980.  
Human leukocyte and fibroblast interferons are  
structurally related  
Nature 285: 547-549.

Todokoro K., D.Kioussis & C.Weissmann. 1984.  
Two non-allelic human interferon alpha genes with  
identical coding regions  
The EMBO Journal 3(8): 1809-1812.



Tovey M.G., M.Streuli, I.Gresser, J.Gugenheim,  
B.Blanchard, J.Guymarho, F.Vignaux, & M.Gigou. 1987.  
Interferon messenger RNA is produced constitutively in  
the organs of normal individuals  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5038-5042.

Trent J.M., S.Olson, & R.M.Lawn. 1982.  
Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast,  
and immune interferon genes by means of in situ  
hybridization  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7809-7813.

Van Snick J. 1990.  
Interleukin-6: an overview  
Annu. Rev. Immunol. 8: 253-278.

Vineis P. & N.Caporaso. 1991.  
The analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism  
in Human Cancer: a review from an epidemiological  
perspective  
Int. J. Cancer 47: 26-30.

Von Gabain A., M.Ohlsson, E.Lindstrom, M.Lundstrom &  
E.Lundgren. 1986.  
Polymorphism and Gene Duplication in the Human IFN-Alpha  
and Beta Gene Family  
Chemica Scripta 26B: 357-362.

Weinberg R.A. 1989.  
Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Basis of  
Multistep Carcinogenesis  
Cancer Research 49: 3713-3721.

Weiss R.A. & C.J.Marshall. 1984.  
Oncogenes  
The Lancet ii: 1138-1142.

Weissenbach J., Y.Chernajovsky, M.Zeevi, L.Shulman,  
H.Soreq, U.Nir, D.Wallach, M.Perricaudet, P.Tiollais &  
M.Revel. 1980.  
Two interferon mRNA in human fibroblasts: In vitro  
translation and Escherichia coli cloning studies  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(12): 7152-7156.

White R., M.Leppert, D.T.Bishop, D.Barker, J.Berkowitz, C.Brown, P.Callahan, T.Holm & L.Jerominski. 1985.  
Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes  
Nature 313: 101-105.

Wilkinson M.F. & A.G.Morris. 1986.  
Preparation and Partial Purification of Human Interferon Delta  
Methods in Enzymology 119: 96-102.

Williard H.F., M.H.Skolnick, P.L.Pearson, & J.-L.Mandel. 1985.  
Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques.  
Cytogenet. Cell Genet. 40: 360-489.

Wilson V., A.J.Jeffreys, P.A.Barrie, P.G.Boseley, P.M.Slocombe, A.Easton & D.C.Burke, 1983.  
A Comparison of Vertebrate Interferon Genes Families Detected by Hybridization with Human Interferon DNA  
J. Mol. Biol. 166:457-475.

Wright A.F. 1986.  
DNA analysis in human disease  
J. Clin. Pathol. 39: 1281-1295.

Yamasaki K., T.Tagata, Y.Hirata, H.Yawata, Y.Kawanishi, B.Seed, T.Taniguchi, T.Hirano & T.Kishimoto. 1988.  
Cloning and Expression of the Human Interleukin-6 (BSF-2/IFN-Beta-2) Receptor  
Science 241: 825-828.