

11216



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRÍA

7

HAPLOTIPO BANTÚ EN PACIENTES CON ANEMIA DE
CÉLULAS FALCIFORMES Y SU RESPUESTA AL
TRATAMIENTO CON HIDROXIUREA

TESIS

Para obtener el grado de especialista en:

Genética Médica

Presenta

Dra. Eugenia Dolores Ruiz Cruz

I. M. S. S. C. M. N.
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
OCT 11 2002
DEPTO. DE ENSEÑANZA
Cotutor **Dr. Fabio A. Salamanca Gómez**

Tutor: **Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa**

Cotutor **Dr. Fabio A. Salamanca Gómez**



IMSS

MÉXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRÍA

**HAPLOTIPO BANTÚ EN PACIENTES CON ANEMIA DE CÉLULAS
FALCIFORMES Y SU RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
HIDROXIUREA**

TESIS.

Para obtener el grado de especialista en:

Genética Médica.

Presenta

Dra. Eugenia Dolores Ruiz Cruz.¹

Tutor de tesis: Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa.¹

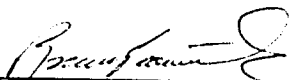
Cotutor: Dr. Fabio Salamanca Gómez.¹

Colaboradores: Q.F.B. Arcelia Hernández Maya²
Dr. José Santos Flores²
Dra. Carmela Hernández Carvajal.³
Q.B.P. Beatriz Nieva García⁴
Q.F.B. Jorge Norberto García Azuara.¹

Hospitales.

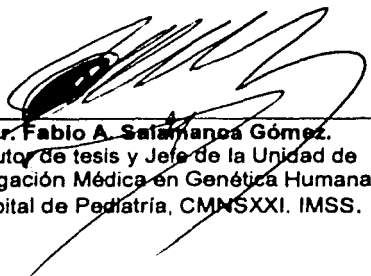
1. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Coordinación de Investigación en Salud. Hospital de Pediatría, CMN S XXI, IMSS*.
2. Hospital General de Zona, Poza Rica Veracruz, IMSS.
3. Hospital General de Zona, Acapulco Guerrero, IMSS.
4. Laboratorio de hematología, Hospital de pediatría CMN SXXI, IMSS.

Tutor de tesis.

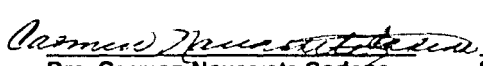


Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa.
Investigador, Unidad de Investigación Médica
en Genética Humana. Hospital de Pediatría.
CMN Siglo XXI, IMSS.

Sinodales.



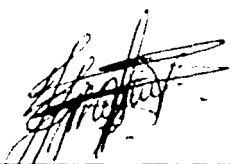
Dr. Fabio A. Salazar Gómez.
Cofundador de tesis y Jefe de la Unidad de
Investigación Médica en Genética Humana.
Hospital de Pediatría, CMNSXXI. IMSS.



Dra. Carmen Navarrete Cadena
Médico Adscrito e Investigador,
Servicio de Genética, UIMGH.
Hospital de Pediatría, CMN SXXI.
IMSS.



Dr. Diego J. Arenas Aranda
Investigador, UIMGH.
Hospital de Pediatría. CMNSXXI.
IMSS.



Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel.
Médico Adscrito, Servicio de Genética,
UIMGH. Hospital de Pediatría, CMN SXXI.
IMSS.

Dedicada.

A mis Padres, **Teresa y Marcelo**
y a mi **Esposo Francisco**.
Por todo su apoyo, confianza y amor.

A mis maestros.
Dra. Rosenda, Dr. Fabio, Dra. Carmelita, Dr. Diego,
Dr. Dilijh, Dra. Ma. Antonieta, Dr. Ramón
y en especial al Dr. Jesús Guizar^f.
Por sus valiosas enseñanzas y paciencia.

A mis amigos.
Juan Carlos y Cony.
Por su compañía y amistad.

Agradecimientos.

A la Dra. Rosenda Peñaloza por su amistad, enseñanzas y apoyo incondicional en la dirección de la presente tesis.

Al Dr. Fabio Salamanca por su confianza y sus opiniones acertadas.

A los colaboradores: Q.F.B. Arcelia Hernández, Dr. José Santos, Dra. Carmela Hernández, Q.B.P. Beatriz Nieva, y Q.F.B. Jorge Norberto García, por su valiosos apoyo y tiempo que otorgaron.

A todo el personal de la Unidad de Investigación en Genética Humanan, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, por las facilidades otorgadas durante la realización del presente trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

Resumen	2
Generalidades	3
Organización y localización cromosómica de los genes β -globínicos	3
Anemia de células falciformes	4
Fisiopatología	4
Cuadro clínico	4
Tratamiento	6
Hidroxiurea en Anemia de células falciformes	6
Efectos clínicos y hematológicos	7
Mortalidad y morbilidad	7
Determinantes para la respuesta de hidroxiurea	7
Administración	9
Justificación	10
Hipótesis	10
Pacientes, material y métodos	10
Descripción general del estudio	13
Metodología	13
Aspectos éticos	14
Recursos humanos y físicos	14
Resultados	15
Discusión	24
Conclusiones	26
Bibliografía	27
Anexos	31

RESUMEN

Antecedentes. La Anemia de células falciformes (ACF) es una de las enfermedades hereditarias más comunes en el mundo, las manifestaciones clínicas más importantes son anemia hemolítica, predisposición a infecciones y episodios de vaso-oclusión dando como resultado crisis de dolor y/o falla orgánica, por lo que la morbi-mortalidad es elevada, siendo un problema de salud pública. Existe evidencia de la utilidad terapéutica de niveles altos de hemoglobina fetal, que al disminuir los síntomas mejora la calidad y tiempo de vida en pacientes con ACF. Uno de los fármacos utilizados con esta finalidad es la hidroxurea que ha demostrado incrementar los niveles de hemoglobina fetal en algunos pacientes con ACF. Se han asociados factores que influyen en la respuesta al tratamiento con hidroxurea como haplotipo, células F, leucocitos y neutrófilos.

Objetivos. 1) Analizar los haplotipos en individuos con ACF y tratamiento con hidroxurea. 2) Evaluar los efectos de la hidroxurea con niveles de hemoglobina fetal y la cuantificación de células sanguíneas ACF. 3) Comparar los parámetros clínicos y hematológicos antes y después del tratamiento. 4) Evaluar el potencial terapéutico de la hidroxurea en pacientes pediátricos con

Material y Métodos. Se confirmó el diagnóstico y clasificó la gravedad de Anemia de células falciformes en 24 pacientes. Se incluyeron tres pacientes que presentaban crisis dolorosas graves requiriendo hospitalización por tres o más ocasiones en un año, quienes recibieron tratamiento con hidroxurea 10 mg/kg/día, dos de ellos por seis meses y uno por 12 meses. Durante este tiempo se evaluó y monitorizó a los pacientes con exploración física, BHC, pruebas de función hepática y renal y niveles de hemoglobina fetal. Posteriormente se compararon los datos obtenidos antes y después del tratamiento

Antes de iniciar el tratamiento se tomó una muestra de sangre periférica, para la obtención de DNA y establecer los haplotipos por medio de técnicas moleculares

Resultados. 1) *Hematológicos y bioquímicos.* se encontraron cambios importantes al comparar los resultados antes y después del tratamiento con hidroxurea en, hemoglobina fetal, hemoglobina total, volumen corpuscular medio, leucocitos, neutrófilos y plaquetas. En las pruebas de función hepáticas se elevaron ligeramente los niveles de deshidrogenasa láctica y la bilirrubina total (a expensas de la indirecta), pero comparando los niveles de bilirrubina antes y después del tratamiento disminuyeron. Las pruebas renales se encontraron dentro de límites normales. 2) *Cuadro clínico* las crisis dolorosas y transfusiones antes del tratamiento fueron >3 por año, comparados ≤ 1 después del tratamiento 3) *Haplotipos:* 2 pacientes fueron homocigotos para el haplotipo Bantú y uno heterocigoto Bantú/Arabia-saudi.

Conclusiones. 1) El uso de hidroxurea en los tres pacientes con Anemia de células falciformes a dosis bajas, mejora el cuadro clínico de los pacientes presentando descenso en el número y duración de crisis dolorosas, frecuencia de transfusiones y hospitalizaciones. 2) La hidroxurea fue bien tolerada y no se presentaron cuadros de mielotoxicidad. 3) Los tres pacientes con haplotipo Bantú respondieron favorablemente al tratamiento con hidroxurea 4) Se requieren estudios con mayor número de pacientes y un seguimiento a largo plazo para generalizar los datos a la población pediátrica mexicana.

GENERALIDADES.

La hemoglobina S (HbS) es una de las hemoglobinopatías más frecuente en el mundo, encontrándose con la mayor frecuencia en África Central y costas del Mediterráneo, así como en aquellas regiones del mundo donde hubo inmigración de esta población como sucedió en las costas de México desde la época de la colonia¹. En México la frecuencia génica de esta hemoglobinopatía en mestizos costeros es de 0.025 y en mestizos indígenas 0.01². Este es un padecimiento autosómico recesivo, ocasionado por una mutación puntual (GAG->GTG) en el sexto codón del gen β -globina que en estado homocigoto produce la Anemia de células falciformes y constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en los pacientes con esta patología³⁻⁶.

Organización y localización cromosómica de los genes β -globínicos.

Las hemoglobinas son un conjunto de proteínas complejas localizadas en el interior de los eritrocitos, cuya función principal es la de transportar el oxígeno a todas las células del organismo. Están constituidas por un grupo hemo (Protoporfina tipo IX y un átomo de hierro) que es constante en todas las hemoglobinas, y cuatro cadenas polipeptídicas; un par de la familia alfa con 141 aminoácidos cada una y el otro par de la familia beta de 146 aminoácidos. La familia alfa esta constituida por los genes zeta ($\zeta 2$) y alfa ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), localizados en el cromosoma 16p13.3, incluyendo varios pseudogenes. La familia de los genes beta que comprenden los genes ϵ , $\zeta\gamma$, $\lambda\gamma$, δ y β y dos pseudogenes beta localizados uno en 5' del gen ϵ y el otro entre $\lambda\gamma$ y δ , ubicados en una longitud de 70 Kb en el cromosoma 11p15.5^{8,9} (figura 1)



Figura 1. Representación esquemática de la familia β -globina

Las diferencias entre las distintas hemoglobinas (normales y anormales) radica precisamente en los tipos de cadenas de globinas que las constituyen. Las hemoglobinas normales pueden ser clasificadas de acuerdo con el periodo en el que se presentan durante el desarrollo del individuo en Embriónicas [Gower I ($\zeta 2$ $\epsilon 2$), Portland ($\zeta 2\gamma 2$) y Gower II ($\alpha 2\epsilon 2$)], Fetal ($\alpha 2\gamma 2$) y del Adulto [A ($\alpha 2\beta 2$) y A2 ($\alpha 2\delta 2$)]. La familia de los genes β -globínicos se expresan en dirección 5' -> 3' y requieren elementos de control local (promotores y aumentadores) y distales (DCR o elemento de control de locus, LCR)^{6,11}.

Los hemoglobinas anormales pueden ser debidas a modificaciones del DNA, como son mutaciones de una o varias bases, deleciones o entrecruzamiento desigual de regiones específicas que se traducen en pérdida de la expresión o mal procesamiento del mRNA. La hemoglobina S, es una hemoglobina ocasionada por la mutación puntual (GAG -> GTG) en el sexto codón de la cadena de β -globina³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES.

Fisiopatología.

Los hematíes con hemoglobina SS, al sufrir desoxigenación cambian su forma de disco bicóncavo por el de una semiluna alargada o de hoz (falciforme). La desoxihemoglobina S se agrega para formar polímeros alargados y cilíndricos en la mayoría de los hematíes, estas fibras se alinean y distorsionan la célula haciendo que adopte la forma de hoz. Las moléculas individuales de hemoglobina S (HbS) forman un polímero compacto constituido por 14 filamentos con una configuración helicoidal. En una amplificación de los contactos entre un par de filamentos alineados muestran que la valina de la β -globina anormal forma un contacto hidrófobo con un sitio aceptor de una cadena beta de la molécula adyacente¹²⁻¹⁴.

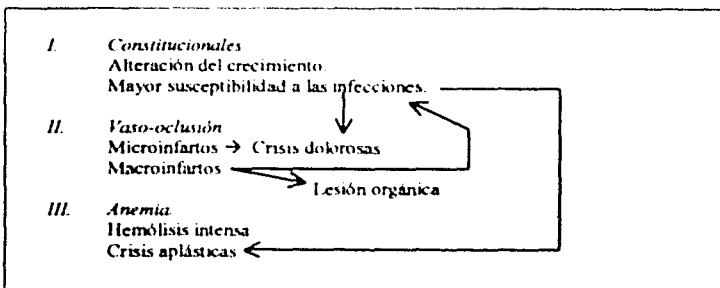
La rigidez de los hematíes dada por la polimerización de la hemoglobina, impide el libre flujo de los hematíes por los capilares y puede producir obstrucción, causando hipoxia tisular, mayor desoxigenación y mayor formación de drepanocitos. La formación de drepanocitos es dependiente de oxígeno, sin embargo, el cambio continuo de la forma celular daña la membrana de los eritrocitos, alterando el intercambio iónico y pérdida consecutiva de potasio y agua dando lugar a formas falciformes irreversibles^{15,16}.

Cuadro clínico.

Los heterocigotos tienen muy pocos problemas clínicos ya que los hematíes AS requieren una tensión de oxígeno mucho menor para formar drepanocitos que los hematíes SS, en consecuencia, los individuos con rasgo falciforme solamente presentarán crisis drepanocíticas en caso de hipoxia intensa¹⁷.

Los pacientes homocigotos para HbS, presentan una variedad de problemas clínicos (cuadro 1) que se inician durante el primero año de vida, una vez que se ha substituido la mayor parte de la hemoglobina fetal por hemoglobina S⁷⁻⁸.

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas de la anemia de células falciformes



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Alteraciones constitucionales.** Dentro de las manifestaciones generales se encuentra el retraso en el crecimiento y desarrollo, el peso es más afectado que la talla. Aunque el peso promedio en los niños generalmente esta disminuido, en escolares y adolescentes es variable. Además presentan mayor susceptibilidad a las infecciones¹⁷⁻²⁰.
- **Anemia.** Los homocigotos SS padecen una anemia hemolítica crónica intensa con valores de hematocrito entre el 18 y 30%. La destrucción de los hematíes es independiente de la edad celular. La vida media de los hematíes en esta situación es de 10 a 15 días en lugar de 120 días normales. Aquellas que tienen cantidades relativamente elevadas de hemoglobina fetal (HbF) poseen una vida media más larga. Como consecuencia de la ruptura eritrocitaria acelerada, los pacientes presentan datos clínicos y de laboratorio característicos de anemia drepanocítica. La hemólisis es principalmente extravascular, la anemia se hace más intensa si se suprime la eritropoyesis "anemia aplásica", dadas por dos causas principales infección y deficiencia de ácido fólico^{8, 17}.
- **Fenómenos de oclusión-vascular.** La morbi-mortalidad de la Anemia de células falciformes se debe principalmente a este fenómeno, dando dos cuadros clínicos: a) Microinfartos, se caracterizan por la presencia de crisis dolorosa recurrente, estos episodios son de inicio rápido y atacan diversas partes del organismo en particular extremidades, abdomen, tórax, espalda y articulaciones. Aproximadamente una de cada tres están precedidas por una infección bacteriana o viral. Su frecuencia es variable y en algunos individuos las crisis aparecen con más frecuencia en tiempo de frío^{8, 21-22}. b) Macroinfartos, la vaso-oclusión grave se debe a efectos acumulativos de los episodios recurrentes, existen signos objetivos de lesión anatómica o funcional en diversos órganos pero los más frecuentemente afectados son: pulmones, riñón, hígado, huesos y piel^{8, 17-24}.
- **Cardiopulmonar.** La lesión progresiva del lecho vascular pulmonar, se asocia a hipertensión pulmonar e hipertrofia muscular derecha, también se puede presentar insuficiencia cardíaca congestiva por sobrecarga impuesta debido a la intensa anemia e hipoxemia^{8, 17-23}.
- **Hepatobiliar.** Por la anemia hemolítica crónica, los pacientes presentan ictericia y mayor tendencia a la formación de cálculos biliares. También pueden presentar infartos hepáticos que pueden infectarse y formar abscesos^{17, 24}.
- **Gentourinario.** El ambiente hipertónico y ácido de la médula renal favorece la transformación falciforme de los glóbulos rojos, dando lugar a microinfartos, prácticamente todos los pacientes presentan isostenuria, y es común la hematúria probablemente por lesiones papilares. La falla renal, aparece de forma crónica progresiva y es una forma común de muerte en pacientes adultos. Los varones pueden presentar priapismo por oclusión del flujo venoso del cuerpo cavernoso^{17, 24}.
- **Esquelético.** La aparición de infartos óseos produce anomalías radiográficas como vértebras biconcavas, además de incrementar la trabeculación y esclerosis ósea. La

necrosis aséptica de la cabeza del fémur es frecuente y puede producir una considerable invalidez.^{8, 17, 24}

- **Piel.** A menudo aparecen úlceras cutáneas crónicas en la porción distal de las extremidades inferiores.^{17, 24}
- **Neurológico.** El paciente tiene alrededor de un 25% de probabilidad de presentar alguna complicación neurológica en su vida, la más frecuente es la hemiplejía y la principal complicación es la trombosis cerebral, pero también puede presentar hemorragia subaracnoidea.^{8, 17, 24, 26}

Las características clínicas y de laboratorio son influenciadas por los niveles en sangre de HbF, a mayor cantidad (12 2% ± 2 4) menor severidad del cuadro clínico, y a menor cantidad (<9 8%) mayor gravedad del cuadro clínico, debido a que la HbF es un potente inhibidor de la polimerización de la desoxihemoglobina S. Estas observaciones sugieren estrategias terapéuticas enfocadas a preservar o reactivar la producción de hemoglobina fetal después del nacimiento.^{21, 27-28}

TRATAMIENTO.

Hasta la fecha no hay un tratamiento curativo del padecimiento y el manejo es sintomático, con transfusiones sanguíneas, administración de antibióticos, analgésicos, hidratación, etc. En algunos países se han realizado trasplantes de médula ósea, cuya decisión es difícil por el promedio de mortalidad en pacientes pediátricos y la potencial morbilidad por el rechazo al injerto.²⁹ También se han ensayado agentes con actividad antidrepanocítica como aspirina, metil-acetil-fosfato o succinildisalicilato, que transforman la Hb S en carboxihemoglobina o metahemoglobina. Otros de los agentes utilizados son aquellos que elevan la hemoglobina fetal como la 5-azacitidina que es antineoplásico que desmetila la molécula de DNA, logrando un incremento de 70 a 80% de HbF.^{30, 31} y el butirato de sodio que inhibe la desacetilación de las histonas, pero no se recomienda para el tratamiento ya que se encuentra en fase experimental.³² Actualmente los estudios se encuentran enfocados hacia tratamientos menos agresivos y dentro de estos se encuentra la hidroxiurea.

Hidroxiurea en Anemia de células falciformes.

La hidroxiurea es un fármaco sintético, inhibidor de la ribonucleótido reductasa y agente citotóxico de fase específica S que arresta la síntesis de DNA. Se puede administrar oralmente y se convierte en radicales libres de óxido nítrico *in vivo*, y se transporta a las células por difusión simple.³³⁻³⁴ Es ampliamente utilizado en el tratamiento antineoplásico.

Los estudios preclínicos demuestran que la hidroxiurea incrementa la hemoglobina fetal, y en estudios clínicos la hidroxiurea ha incrementado los reticulocitos F y la hemoglobina fetal.³⁵ Los mecanismos por los cuales se incrementa la HbF aún no están completamente claros, pero los estudios *in vitro* de cultivos en unidades formadoras de brotes eritroides (BUF-e) sugieren la relación entre la regeneración celular y la diferenciación. La rápida regeneración o expansión de la producción de células F, es

inducida en los precursores de eritrocitos en la médula ósea al administrarse hidroxiurea; la cinética de regeneración eritroide determina si la célula expresa HbF o sólo HbA³⁶. Probablemente los precursores eritroides primitivos mantienen la capacidad de expresar los genes gama globínicos, por medio de factores de transcripción eritroides tipo Krüppel que alteran la maduración de los precursores eritroides, favoreciendo la expresión de genes gama globínicos e incrementando concomitantemente la eritropoyesis y la producción de células F³⁷.

Otros estudios sugieren nuevos mecanismos de acción de la hidroxiurea. La peroxidación de hidroxiurea puede generar óxido nítrico (NO) que es un potente vasodilatador. En ratas, la hidroxiurea conduce a la formación de nitrosohemoglobina S, este complejo puede detectarse después de 30 minutos de administrarse el tratamiento y persiste por cuatro horas aproximadamente. El NO incrementa la afinidad de la HbS al oxígeno reduciendo la polimerización, pero estos resultados no han sido confirmados. Quizás la hidroxiurea incremente la afinidad del oxígeno a la HbS o promueva la vasodilatación, reduciendo la polimerización y por lo tanto disminuye la oclusión microvascular³⁸⁻³⁹.

Efectos clínicos y hematológicos. En los estudios multicéntricos, como el HUG-KIDS (ensayo clínico con hidroxiurea en pacientes pediátricos)⁴⁰ han demostrado que la hidroxiurea reduce a la mitad la frecuencia de hospitalización, la incidencia de crisis de dolor, el síndrome agudo pulmonar y las transfusiones sanguíneas, además de reducir la duración de las crisis dolorosas o del síndrome agudo pulmonar⁴⁰. El incremento de la HbF en promedio es del 18% en los primeros seis meses y 9% en los siguientes seis meses, aunque estos resultados no se encuentran en todos los pacientes. En pacientes adultos se observó que la aparición de mielotoxicidad suele presentarse antes de alcanzar la dosis máxima tolerada de hidroxiurea, sin embargo los pacientes pediátricos parecen tener mejor respuesta que los adultos⁴¹. Otros de los beneficios del tratamiento son: incremento de la vida media de los glóbulos rojos, reducción de la hemólisis, mayor capacidad al esfuerzo físico anaeróbico y aeróbico y los cambios hematológicos incluyen: incremento en el volumen corpuscular medio, concentración media de hemoglobina y la disminución en la cuenta de leucocitos⁴².

Mortalidad y morbilidad. Han disminuido en forma significativa en los pacientes tratados con hidroxiurea en comparación con los tratados con placebo. Son los resultados más importantes de los estudios multicéntricos⁴⁰.

Determinantes para la respuesta de hidroxiurea. Los individuos con mejor respuesta al tratamiento fueron aquellos que presentaban una cuenta alta de neutrófilos y reticulocitos antes de iniciar el tratamiento, los que disminuían gradualmente a lo largo del tratamiento^{41, 43}.

Otros factores estudiados para determinar la respuesta al tratamiento con hidroxiurea son los polimorfismos genéticos. Los **haplotipos** (Grupo de alelos estrechamente ligados, que se heredan como unidad, patrón de presencia o ausencia de fragmentos de restricción) en la familia de genes beta globínicos (figura 2), cuya caracterización ha permitido descifrar el origen de la mutación en cinco regiones geográficas principales.

Esto ha permitido conocer los mosaicos culturales y étnicos de ciertas poblaciones y explicar, al menos parcialmente, la heterogeneidad clínica de la drepanocitosis⁴⁴⁻⁴⁵.

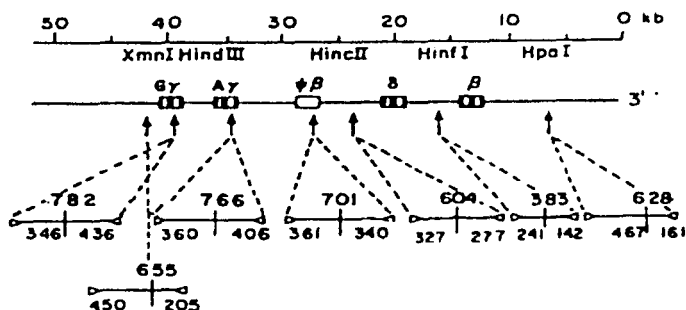


Figura 2. Sitios de corte de endonucleasas de restricción que permiten conocer los haplotipos ligados a la mutación beta-S. En la parte superior se muestra el tamaño de la región donde se encuentran los polimorfismos y las enzimas utilizadas y en la parte inferior el tamaño de los productos esperados por PCR y restricción (Tomada de Sutton M. 1989)⁴⁶.

De esta manera, se han descrito distintos haplotipos ligados a la mutación beta-S. Cuatro son los más frecuentes en población africana: Bantú -Ban-, Benín -Ben-, Senegal -Sen-, Camerún -Cam¹ y el Arabia-India que posteriormente se dividió en Árabe-saudí y Asiático⁴⁷⁻⁴⁹. La ausencia o presencia de fragmentos de restricción correspondientes a cada tipo de haplotipo se muestra en la tabla 1.

En estudios previos realizados en esta Unidad, los haplotipos más frecuentes fueron el Bantú en primer lugar y Benín en segundo⁵⁰, ambos se asocian a un cuadro clínico de mayor gravedad⁵¹.

Tabla 1. Ausencia o presencia de fragmentos de restricción para cada haplotipo.

Haplotipo	Endonucleasas de restricción.						
	Xmn I	Hind III	Hind III	Hinc II	Hinc II	Hinf I	Hpa I
Bantú	-	+	-	-	-	-	+
Benín	-	-	-	-	+	+	-
Senegal	-	+	-	+	+	+	+
Camerún	-	+	+	-	+	+	+
Arabia-saudí	+	+	-	+	+	-	+
Asiático	-	-	-	-	+	-	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estudios preliminares se refiere que los pacientes que presentan el haplotipo de la región de África Central (Bantú) se asocian a una pobre respuesta. Pero estos resultados aún no son concluyentes⁴¹.

Administración. En estudios previos, diferentes autores han empleado la hidroxiurea en pacientes con Anemia de células falciformes, a una dosis entre 25 y 50 mg/kg/día que resultaron ser muy tóxicas y prohibitivas, por lo que actualmente se encuentran realizando un estudio multicéntrico en colaboración de diversos institutos y universidades en los Estados Unidos^{40,43,52}. En 1998 la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó la utilización de la hidroxiurea como tratamiento para pacientes con Anemia de células falciformes, refiriendo que pacientes menores de 18 años que presenten cuadros graves de crisis vaso-oclusivas puede administrárseles el tratamiento de 10-20 mg/kg/día con seguimiento riguroso.

JUSTIFICACIÓN.

La Anemia de células falciformes es una de las enfermedades hereditarias más comunes en el mundo, las manifestaciones clínicas más importantes son anemia hemolítica, predisposición a infecciones y episodios de vaso-oclusión dando como resultado, crisis de dolor y/o falla orgánica, por lo que la morbi-mortalidad es elevada, siendo un problema de salud pública. Existe evidencia de la utilidad potencial terapéutica de niveles altos de hemoglobina fetal, disminuyendo los síntomas y por lo tanto mejorando la calidad y tiempo de vida en pacientes con Anemia de células falciformes. Uno de los fármacos utilizados con esta finalidad es la hidroxiurea, la que en nuestro país es poco utilizada para el tratamiento de esta enfermedad. Además, varios estudios se han enfocado a la búsqueda de determinantes de la respuesta a hidroxiurea, entre los que se encuentran los polimorfismos genéticos. Por tal motivo este estudio está enfocado a buscar si el haplotipo es un determinante para la respuesta al tratamiento con hidroxiurea y si nos da la oportunidad de aportar conocimientos sobre el comportamiento de los procesos hereditarios en la Anemia de células falciformes y su respuesta al tratamiento

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿El haplotipo Bantú en pacientes con Anemia de células falciformes influye en la respuesta al tratamiento con hidroxiurea?

HIPÓTESIS.

Ho: Los pacientes con Anemia de células falciformes y haplotipo Bantú responden favorablemente al tratamiento con hidroxiurea, elevando los niveles de hemoglobina fetal.

Ha: Los pacientes con Anemia de células falciformes y haplotipo Bantú no responden al tratamiento con hidroxiurea y los niveles de hemoglobina fetal permanecen bajos.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar los haplotipos en individuos con Anemia de células falciformes y tratamiento con hidroxiurea.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar los efectos de la hidroxiurea con los niveles de hemoglobina fetal y el número de células sanguíneas
2. Comparar los parámetros clínicos y hematológicos de los pacientes con Anemia de células falciformes antes y después del tratamiento
3. Evaluar el potencial terapéutico de la hidroxiurea en pacientes pediátricos con Anemia de células falciformes

PACIENTES, MATERIALES Y METODOS:

Diseño.

Presentación de tres casos clínicos.

Diseño de la muestra

1. Definición del universo: Todos los pacientes con diagnóstico de Anemia de células falciforme.
2. Definición de la muestra: Pacientes con Anemia de células falciformes con cuadro clínico grave del Registro de Anemia de células falciformes de los Hospitales Generales de Zona de Poza Rica, Ver. y Acapulco, Gro.

Criterios de selección.

- Criterios de inclusión:
 1. Pacientes con Anemia de células falciformes confirmada.
 2. Pacientes cuyos padres y abuelos hayan nacido en México
 3. Pacientes con edad mayor de 12 meses
 4. Pacientes de uno y otro género
 5. Pacientes que tengan por lo menos uno de los siguientes criterios:
 - a. Tres o más crisis de vaso-oclusión, caracterizados por crisis de dolor requiriendo hospitalización y aplicación de analgésicos
 - b. Un episodio de síndrome pulmonar agudo, definido como dolor torácico agudo con infiltración pulmonar identificada por radiografía.
 - c. Complicaciones neurológicas como isquemia transitoria o convulsiones y confirmada con encefalograma y estudios de imagen.
 - d. Priapismo definida como erección dolorosa persistente.
 - e. Necrosis ósea por isquemia, definida como dolor en hombro o cadera con daño funcional y radiografía anormal
- Criterios de no-inclusión
 1. Pacientes que no quieran participar en el estudio.
 2. Pacientes con antecedentes neoplásicos
 3. Pacientes positivos para el virus de inmunodeficiencia humana.
 4. Enfermedad renal o hepática (ALT >300 UI o albúmina >2.0 g/dl, creatinina >2.5 mg/dl).
 5. Complicaciones neurológicas como hemorragia o trombosis dentro de los dos años previos.
 6. Transfusión reciente con niveles de hemoglobina A mayor a 10%
- Criterios exclusión.
 1. Osteomielitis bacteriana
 2. Accidente cerebro-vascular durante el tratamiento
 3. Alteraciones hemáticas como son mielosupresión o neoplasias durante el tratamiento
 4. Presencia de mielotoxicidad definida como cuenta de neutrófilos $<1.5 \times 10^9/l$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

disminución de la hemoglobina total >20% de la cantidad inicial o Hb <5.0 g/dl y/o trombocitopenia <80 x 10⁹/l.

5. Muerte.

Tamaño de la muestra.

Tres pacientes aceptaron ingresar al tratamiento.

Variables.

Variables independientes.

Haplotipo.

Tratamiento con hidroxiurea.

Variables dependientes.

Respuesta a tratamiento.

Hemoglobina fetal.

Descripción operativa.

Variables independientes:

- Haplotipo: Grupo de alelos estrechamente ligados, que se heredan como unidad.
Haplotipos: Presencia o ausencia de fragmentos de restricción por endonucleasas, asociados no al azar en la familia de genes β -globínicos a lo largo de 70 kb de la región cromosómica 11p15.5.
Tipo de variable: cualitativa.
Escala de medición: nominal (presencia o ausencia)

- Tratamiento. Administración de hidroxiurea con fines terapéuticos.
Tratamiento: Administración de hidroxiurea, inhibidor de la ribonucleótido reductasa y un agente citotóxico de fase específica S que arresta la síntesis de DNA, el cual se administró a dosis de 10 mg/kg/día vía oral mínimo por seis meses.
Tipo de variable: cuantitativa.
Escala de medición: continua (miligramos).

Variables dependientes

- Respuesta a tratamiento. Proceso de evolución del padecimiento posterior a la administración del tratamiento.
Respuesta al tratamiento. Se evaluó hematológica y clínicamente por medio de varios parámetros.
 1. Número de crisis vaso-oclusivas identificadas por crisis dolorosas requiriendo hospitalización y/o analgésicos por vía intramuscular o intravenosa.
Tipo de variable: cuantitativa
Escala de medición: discreta
 2. Número de transfusiones sanguíneas.
Tipo de variable: cuantitativa
Escala de medición: discreta
 3. Complicaciones secundarias a vaso-oclusión como:
 - Síndrome pulmonar agudo, definido como dolor torácico agudo con infiltración pulmonar identificada por radiografía.
 - Complicaciones neurológicas como isquemia transitoria o convulsiones y/o

accidentes cerebro-vasculares, confirmado por el servicio de Neurología por criterios clínicos, de imagen y/o electroencefalograma.

- Priapismo definida como erección dolorosa persistente.
- Necrosis ósea por isquemia definida como dolor en hombro o cadera con daño funcional y radiografía anormal.
- Daño renal definido como alteración funcional identificado por examen general de orina (EGO), química sanguínea y ultrasonograma (USG) renal

Tipos de variables: cualitativas.

Escala de medición: nominal (ausencia o presencia).

4. Parámetros hematológicos.

- Hemoglobina, cuantificación en una muestra de sangre periférica (g/dl).
- Volumen corpuscular medio (fl)
- Leucocitos ($\times 10^9/l$)
- Cuenta absoluta de neutrófilos ($\times 10^9/l$).
- Plaquetas ($\times 10^9/l$)

Tipos de variables: cuantitativas

Escala de medición: continua.

- Hemoglobina fetal Tipo de hemoglobina que presenta dos cadenas globínicas alfa y dos gamas, que normalmente en el adulto se encuentra < 1%.

Hemoglobina fetal. Se realizó con precipitación con álcalis y colorimetría.

Tipo de variable: cuantitativa

Escala de medición: continua (Porcentaje)

Descripción general del estudio.

Se confirmó y clasificó la gravedad de la enfermedad en un grupo de pacientes con cuadro clínico de Anemia de células falciformes captados por los servicios de Hematología de los Hospitales Regionales de Zona de Acapulco Guerrero y Poza Rica Veracruz, a quienes se les tomó una muestra de sangre periférica y se procesó para obtener DNA genómico y realizó amplificación de las regiones adecuadas de la familia de genes beta globínicos y la restricción para identificar haplotipos correspondientes. Posteriormente se identificaron los pacientes con cuadro clínico grave de Anemia de célula falciformes quienes ingresaron al estudio y se inicio tratamiento con hidroxiurea por un mínimo de seis meses, previo consentimiento informado

Se les dio seguimiento realizándoles examen físico completo, biometría hemática completa (BHC), cuantificación de HbF, Química sanguínea, electrolitos, pruebas funcionales hepáticas y renales para evaluar su respuesta clínica

Finalmente se analizaron los resultados comparando los parámetros clínicos, hematológicos y bioquímicos obtenidos al inicio y al final del tratamiento.

Metodología.

Se capturaron a todos los pacientes registrados con Anemia de células falciformes de enero del 2000 a Julio del 2001 en los Hospitales de Acapulco, Guerrero y Poza Rica, Veracruz. Se confirmó el diagnóstico del Anemia de células falciformes y se identificaron a los pacientes con cuadros graves, de acuerdo a la evaluación clínica y hematológica todos estos datos se vaciaron en una hoja de recolección (anexo 1). Esta evaluación consta de historia clínica completa, revisión de expediente clínico, biometría

hemática completa y electroforesis ácida para cuantificación y tipificación de hemoglobinas. También se tomó una muestra de sangre periférica para la obtención de DNA y análisis de haplotipos.

Posteriormente se evaluaron los antecedentes clínicos y hematológicos y se eligieron a cuatro pacientes quienes presentaron un cuadro clínico grave (con tres o más crisis dolorosas por año), a los padres se les planteó la administración de hidroxiurea a su hijo, en dosis de 10 mg/kg/día, explicándoles con detalle beneficios y efectos secundarios del tratamiento, al aceptar los padres firmaron una carta de consentimiento con los datos antes especificados (anexo 2).

Tres de ellos aceptaron y antes de administrarles tratamiento se realizaron pruebas de función hepática y renal para descartar cualquier tipo de alteración en estos órganos. Se inició el tratamiento con hidroxiurea por un mínimo de seis meses y se evaluó mensualmente por medios de exploración clínica completa, exámenes de laboratorios (BHC, química sanguínea, electrolitos, prueba de funcionamiento hepático y renal y cuantificación de hemoglobina fetal).

Se realizó la extracción de DNA por el método rutinario para el análisis de los haplotipos moleculares en la familia de las beta-globinas, amplificando las regiones, cortando con enzimas de restricción específicas y posteriormente se observaron en geles de agarosa al 2%. Las técnicas se describen en los (anexos 3, 4 y 5)

Análisis estadístico.

Se realizó descripción de cada una de las variables estudiada en los tres pacientes

Aspectos éticos.

El protocolo fue aceptado por el comité de Ética e Investigación del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI con el número 2000/718/47

En vista de ser un ensayo clínico, el riesgo al que se someten los pacientes es mayor al mínimo, por lo tanto se les aclaró por escrito y de manera independiente a cada miembro participante, los riesgos y beneficios que este estudio les proporciona. Se otorgó una carta de consentimiento para participar en el ensayo, la cual fue firmada por los padres, cumpliendo con los artículos 100 y 103 que estipula la Ley General de Salud

Recursos: humanos y físicos.

La Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, en colaboración con los servicios de Hematología de los Hospitales Generales de Zona de Acapulco, Gro. y Poza Rica, Ver., disponen del personal capacitado para llevar a cabo los estudios clínicos y paraclínicos, así como para su interpretación y seguimiento de los pacientes.

El Laboratorio de genética molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, dispone de personal capacitado en el manejo de diversas metodologías moleculares y de equipo mínimo para implementarlas, como termocicladores, sistema de electroforesis, centrifugas de velocidad variable, cuarto frío, campana de flujo laminar, etc.

RESULTADOS

Se capturaron un total de 24 pacientes con Anemia de células falciformes, todos homocigotos para hemoglobina S, 11 fueron hombres y 13 mujeres, 19 originarios de Guerrero y 5 de Veracruz, el rango de edad fue de 30 a 270 meses.

El 79.2% de los pacientes presentaron síntomas entre el sexto y doceavo mes de edad, en un sólo caso la Anemia de células falciformes fue un hallazgo clínico al presentar una fractura de tibia y peroné.

Peso

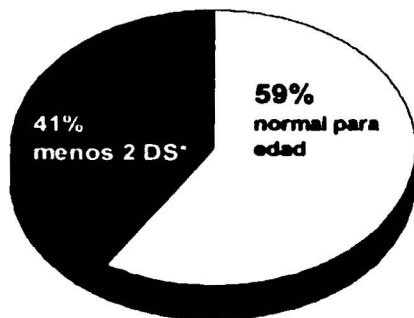


Figura 3 Representa los porcentajes de peso en los 24 pacientes estudiados.
*Desviación estándar.

Talla

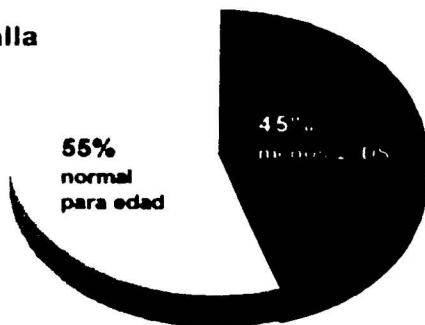


Figura 4. Representa los porcentajes de talla en los 24 pacientes estudiados.
*Desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De los 24 pacientes estudiados solamente cinco presentaron hemoglobina fetal >9% y el resto <2%.

En la tabla 2 se describen los hallazgos clínicos de los 24 pacientes y en la tabla 3 se comparan los hallazgos clínicos y hematológicos de pacientes con HbF elevada vs. HbF baja.

Tabla 2. Hallazgos clínicos de los 24 pacientes.

Características clínica	Número de pacientes (%)
<i>Transfusiones por año</i>	
≥ 2 por año	6 (25)
< 2 por año	18 (75)
<i>Crisis dolorosa por año</i>	
≥ 3 por año	4 (16.6)
2 por año	8 (33.3)
< 2 por año	12 (59)
<i>Infecciones con tx. antibióticos</i>	
≥ 3 por año	12 (50)
< 3 por año	12 (50)
<i>Esplenectomía antes del 1º año de vida</i>	2 (8.3)
<i>≥ 1 Episodio agudo pulmonar por año</i>	1 (4.2)
<i>Necrosis ósea por isquemia</i>	1 (4.2)

Tabla 3. Características hematológicas y clínicas de los 24 pacientes comparando a los portadores de HbF elevada vs HbF baja.

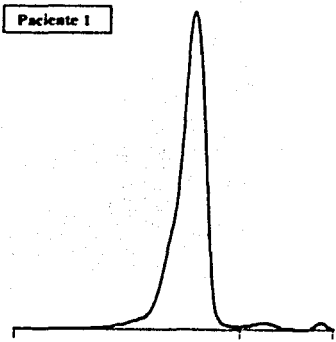
Variable	Media \pm DS* Con HbF baja	Media \pm DS Con HbF elevada
Hemoglobina fetal (%)	0.1	13.5 \pm 5
Nivel de hemoglobina (g/dl).	8.2 \pm 1	9 \pm 2
Hematocrito (%)	25.6 \pm 4	27 \pm 2.7
Volumen (fl)	93 \pm 8	91 \pm 15
Hemoglobina corpuscular media de (pg)	31 \pm 2	30 \pm 5
Leucocitos $\times 10^9/l$	12 \pm 3	9 \pm 3.8
Neutrófilos $\times 10^9/l$	5.6 \pm 2.5	4.8 \pm 2
Crisis dolorosas por año	2.1	0.2
Transfusiones por año	1.3	0
Infecciones por año	2.1	0.2

*Desviación estándar.

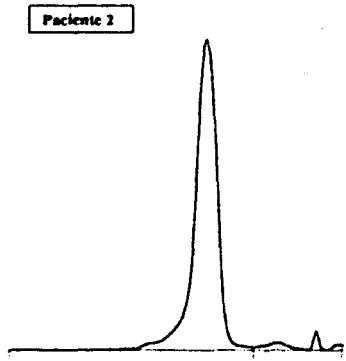
TRATAMIENTO CON HIDROXIUREA.

De estos 24 pacientes cuatro tuvieron un cuadro clínico grave caracterizándose principalmente por episodios de crisis dolorosas, pero solamente los padres de tres pacientes aceptaron el tratamiento de sus hijos. Dos mujeres y un varón con 96, 116 y 144 meses de edad, paciente 1, 2 y 3 respectivamente. El criterio para incluir a los tres pacientes fue la presencia de tres o más crisis dolorosas por año (rango 3 a 5) con duración de dos horas o más, requiriendo analgésicos y hospitalización. El paciente 3 además presentaba necrosis ósea por isquemia en la cabeza del fémur izquierdo.

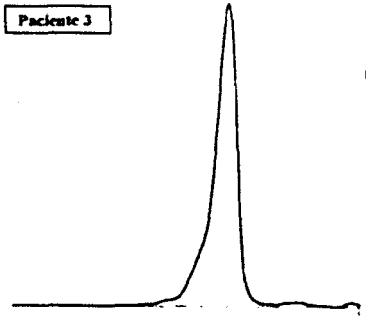
En la figura 5, se muestra la electroforesis ácida para diferenciar los diversos tipos de hemoglobinas, ninguno de ellos tuvo hemoglobina fetal elevada, y las concentraciones de hemoglobina S fueron paciente 1 (97.1%), paciente 2 (95.6%) y paciente 3 (97.8%).



Fracción	%
Hb S	97.1
Hb A2	2.9



Fracción	%
Hb S	95.8
Hb A2	4.4



Fracción	%
Hb S	97.8
Hb A2	2.2

Figura 5. Resultados de la electroforesis para cuantificar cada tipo de hemoglobina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 4, se muestran las características clínicas y hematológicas durante un año antes del tratamiento con hidroxiurea.

La pruebas funcionales hepáticas antes del tratamiento: proteínas total, albúmina, globulina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa láctica, bilirrubina directa y colesterol todas fueron normales, solamente la bilirrubina total se encontraba ligeramente elevada a expensa de la indirecta en los tres pacientes con un rango de 3 a 5.27 mg/dl. Las pruebas de función renal antes del tratamiento; examen general de orina (pH, densidad, proteínas, glucosa, acetona, hemoglobina, bilirrubina y células en sedimento) y química sanguínea (creatinina, nitrógeno ureico en sangre y electrolitos) se encontraron normales en los tres pacientes.

Tabla 4. Características hematológicas y clínicas de los pacientes antes del tratamiento.

Variable	Antes del tratamiento		
	P1	P2	P3
Crisis dolorosas por año	4	5	5
Transfusiones por año	6	2	3
Infecciones por año	3	2	4
Hemoglobina (g/dl)	6.9	7.8	7.7
Hematocrito (%)	23.2	24.2	24
Volumen corpuscular medio (fl)	110	66	97
Hemoglobina corpuscular media (pg)	33	32	30
Leucocitos $\times 10^9/l$	16.7	15.3	14.7
Neutrófilos $\times 10^9/l$	6.5	10.1	10.3
Plaquetas $\times 10^9/l$	531	377	547
Reticulocitos (%)	17	44	9.2
Hemoglobina fetal (%)	0	0	0

La tabla 5, muestra los datos clínicos y hematológicos de los tres pacientes posterior al tratamiento con hidroxiurea.

Después de seis meses (P1 y P2) y doce meses (P3) de tratamiento tres parámetros de laboratorio se encontraron alterados: La deshidrogenasa láctica se incrementó en los tres pacientes (262, 226 y 193 IU/l), la bilirrubina indirecta se encontraba elevada en los tres pacientes (3, 2,2 y 1.5 mg/dl), sin embargo los niveles fueron menores a los obtenidos antes de iniciar con el tratamiento y la cuenta absoluta de plaquetas se encontró elevada en un sólo paciente ($711 \times 10^9/l$)

Los estudios de gabinete realizados como parte del control y seguimiento de los pacientes fueron tomografía axial computarizada de cerebro reportándose normal en los tres pacientes, ultrasonograma abdominal se informa que el paciente 1 presentó cálculos biliares y el paciente 2 presentó lodo biliar y los estudios radiográficos de columna y huesos largos se observan características normales.

Tabla 5. Características hematológicas y clínicas de los pacientes después del tratamiento

Variable	Después del tratamiento						
	3 meses			6 meses			1 año
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P3
Crisis dolorosas	0	1	1	0	0	0	0
Transfusiones	1	0	0	0	0	0	1
Infecciones	0	1	0	0	0	0	0
Hemoglobina (g/dl)	7.6	8.1	7.5	7.9	8.4	8.2	8.5
Hematocrito (%)	23	26.1	24	22.2	29.3	26	25.4
Volumen corpuscular medio (fl)	100	66.7	89	101	94.8	74.1	88
Hb corpuscular media (pg)	33.1	20	22	38	30.7	27	31
Leucocitos $\times 10^9/l$	11.7	14.5	10.8	7.4	12.5	8.9	8.6
Neutrófilos $\times 10^9/l$	5.3	7.2	6.4	5.3	5.9	7	6.7
Plaquetas $\times 10^9/l$	706	796	826	421	484	711	686
Reticulocitos (%)	13	27	8	9	14	7	9
Hemoglobina fetal (%)	12	9.8	9.7	12.5	9.8	10	12

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HAPLOTIPOS

Se obtuvieron los haplotipos de los tres paciente a los que se les administró tratamiento con hidroxíurea, dos presentaron haplotipo Bantú en forma homocigota y uno fue heterocigoto con haplotipo Arabia-saudi / Bantú. A continuación se muestran los resultados.

Extracción de DNA.

Se estudiaron un total de tres pacientes todos originarios de Poza Rica Veracruz. Se obtuvo DNA a una concentración entre 100 – 200 ng/ μ l y una pureza cercana a 1.8. La concentración y pureza obtenida es óptima para llevar a cabo la amplificación de los siete sitios de restricción de la familia de genes β -globínicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la figura 6 se observan las bandas correspondientes al DNA que se obtuvo de glóbulos blancos. Se verifica su integridad del producto al constatar que no existe barrido por debajo de las bandas, lo que indicaría la degradación de ácido nucleico.

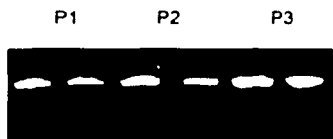


Figura 6. Muestra las bandas de DNA genómico integro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron las amplificaciones de las siete regiones de interés, según la técnica de Sutton⁴⁸, obteniéndose los productos de amplificación esperados (figura 7).

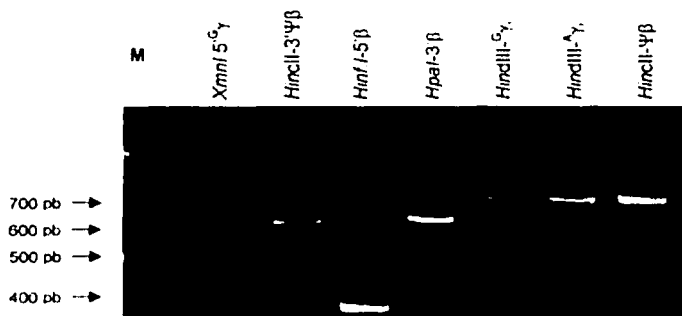


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se observan las bandas de los productos amplificados correspondientes a las regiones de interés. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular, escala de 100 pb

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fragmentos de restricción.

De las figuras 8 a 13, se observan los productos de amplificación y los de restricción esperados con las enzimas *Xmn*I 5^oγ, *Hind*III-C_γ, *Hind*III-Δ_γ, *Hinc*II-Ψβ, *Hinc*II-3^oΨβ, *Hinf*.I-5^oβ y *Hpa*I-3^oβ.

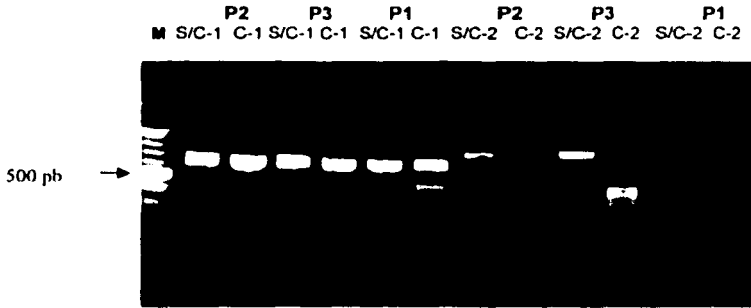


Figura 8. Electroforesis de las amplificaciones sin cortar (S/C) y cortadas (C) con las enzimas 1 - *Xmn*I 5^oγ y 2 - *Hind*III-C_γ, en los tres pacientes (P) En el camil M se observa el marcador de peso molecular, escalera de 100 pb

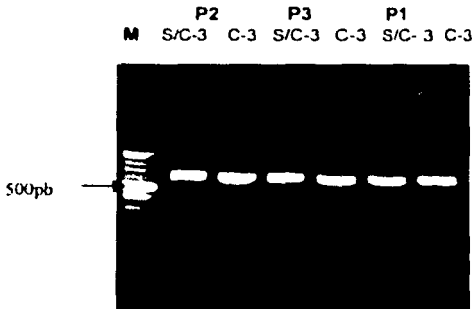


Figura 9. Electroforesis de las amplificaciones sin cortar (S/C) y cortadas (C) con la enzima *Hind*III-Δ_γ, en los tres pacientes (P) En el camil M se observa el marcador de peso molecular, escalera de 100 pb

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

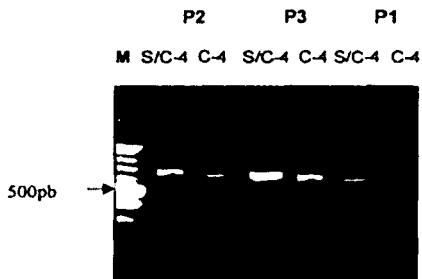


Figura 10. Electroforesis de las ampliaciones sin cortar (S/C) y cortadas (C) con *HincII-1'*. En el carril M se observa el marcador de peso molecular, escala de 100 pb

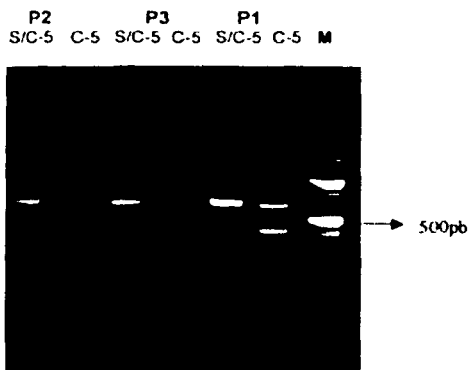


Figura 11. Electroforesis de las ampliaciones sin cortar (S/C) y cortada (C) con la enzima *HincII-3'*. En el carril M muestra el marcador de peso molecular, escala de 100 pb

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

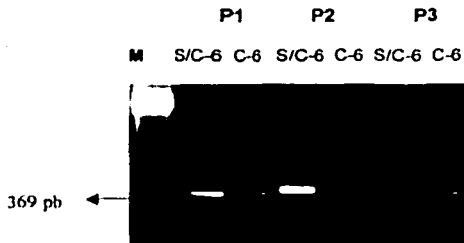


Figura 12. Electroforesis de las amplificaciones sin cortar (S/C) y cortadas (C) con la enzima *Hinf* I-5'β. En el carril M se observa el marcador de peso molecular, escalera de 123 pb

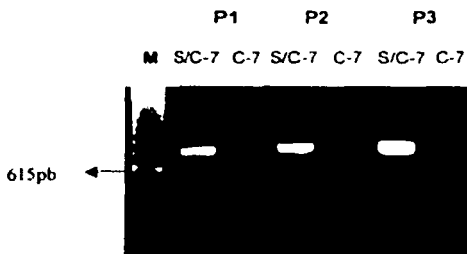


Figura 13. Electroforesis de las amplificaciones sin cortar (S/C) y cortadas (C) con la enzima *Hpa*I-3'β. En el carril M se observa el marcador de peso molecular, escalera de 123 pb

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los niveles altos de hemoglobina fetal se asocian con un curso clínico leve en los pacientes con Anemia de células falciformes⁵¹. Algunos pacientes con esta patología tienen una predisposición genética para presentar niveles altos de hemoglobina fetal, (persistencia hereditaria de hemoglobina fetal); sin embargo, esta condición es poco frecuente ya que se encuentra en uno de cada 188,000 individuos con Anemia de células falciformes^{53,54}. En este estudio encontramos que cinco de 24 pacientes (21%) (todos originarios del estado de Guerrero), presentaron niveles altos de hemoglobina fetal. Este hallazgo difiere de lo informado en la literatura, sin embargo, esta variación no puede generalizarse a la población de individuos con Anemia de células falciformes en el país, ya que pueden existir factores genéticos que incrementen la frecuencia de persistencia de hemoglobina fetal en los individuos originarios de las costas del Pacífico y que no han sido estudiados. Algunos de estos factores son los polimorfismos que afectan la expresión de los genes γ o del locus controlador de la producción de células F (FCF)^{55,56}, requiriendo estudios futuros.

El trasplante de médula ósea es el único tratamiento que hasta la fecha se considera curativo en pacientes con Anemia de células falciformes⁵⁷. El estudio multicéntrico realizado en Bélgica demostró una supervivencia del 93% y un 85% libres de síntomas⁵⁸, pero el mayor obstáculo para llevar a cabo este tratamiento es la falta de hermanos o familiares con HLA compatibles con los enfermos, por lo cual es necesario la búsqueda de tratamientos alternativos que puedan modificar la enfermedad en un plazo corto o medio. La hidroxiurea es un fármaco citotóxico que incrementa la hemoglobina fetal, la que inhibe la polimerización de la HbS^{13,14}, por lo que se eligió para el presente trabajo.

A los tres pacientes que se les administró una dosis baja de hidroxiurea por vía oral (10 mg/kg/día) dividida en dos tomas, debido a la presencia de efectos adversos como náuseas y vómitos que desaparecieron al dividir la dosis. Las respuestas hematológicas a la hidroxiurea son semejantes a las respuestas observada en otros estudios⁴⁰⁻⁴³, los cambios en los porcentajes de hemoglobina fetal proveen evidencia de eficacia hematológica. El descenso de los leucocitos es un cambio clínico relevante, ya que la leucocitosis ha sido asociada con mayor riesgo de complicaciones vaso-oclusivas debido a su adhesión al epitelio^{8,23}. Otros efectos hematológicos benéficos fueron descenso de crisis hemolíticas e incremento de hemoglobina total, hematocrito, volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media, evitando así transfusiones sanguíneas.

Uno de los parámetros que sugieren menor número de crisis hemolíticas es la cuantificación de bilirrubina, la que disminuyó en los tres pacientes. Todos los parámetros mencionados previamente pueden considerarse resultados de una buena respuesta al tratamiento con hidroxiurea, principalmente dos: la concentración de HbF y el volumen corpuscular medio⁵⁹, aunque la variación del volumen corpuscular medio, ha sido mínima se debe considerar que este fenómeno se presenta en otros estudios, reportándose que después de ocho meses de tratamiento su elevación es mayor⁵⁹, no así la hemoglobina fetal la cual se incrementa desde el primer mes de tratamiento y se pueden atribuir a ello los efectos benéficos clínicos más importantes, ya que el número

de crisis dolorosas y hemolíticas son inversamente proporcionales al nivel de HbF⁴¹ y al número de células F, que se asocian con las respuestas en VCM, número de neutrófilos, de reticulocitos y otros parámetros que también contribuyen al descenso de las crisis dolorosas y no solamente son debidos a cambios en la Hb F⁴³.

Los beneficios del tratamiento con hidroxiurea a dosis bajas se observaron por primera vez en el estudio realizado por Charache y cols⁴³, quienes administraron a 299 individuos con Anemia de células falciformes dosis escalonadas de hidroxiurea y observaron que se obtenían los mismos beneficios con dosis bajas (< o = 15 mg/Kg/día) que con la dosis máxima tolerada (35 mg/kg/día). Sin embargo, aquellos pacientes con dosis máxima toleradas presentaron frecuentemente cuadros clínicos de mielotoxicidad⁴³. La utilización de dosis bajas con hidroxiurea en nuestros pacientes fueron eficaces, presentando mejoría en el cuadro clínico, elevación de HbF, descenso de leucocitos y en general mejoría en los parámetros hematológicos, además, con este tratamiento se disminuyó el riesgo de presentar efectos adversos como mielotoxicidad. Es importante señalar que ninguno de nuestros pacientes presentó datos de mielotoxicidad (neutropenia o leucopenia grave y persistente). De los parámetros hematológicos, la trombocitosis presentada en un paciente no se asoció a ninguna otra complicación.

Los haplotipos de la familia de genes β -globínicos se han asociado con los diferentes grados de gravedad clínica en Anemia de células falciformes, esto probablemente está dado por las concentraciones de hemoglobina fetal^{6,54}. Los tres haplotipos más comunes en individuos con Anemia de células falciformes son: Senegal que se asocia con la forma más benigna de la enfermedad, el haplotipo Benin con cuadro clínico moderado y el haplotipo de la República de África Central (Bantú), éste se ha asociado con la forma más grave de la enfermedad y menor respuesta al tratamiento con hidroxiurea^{41,49,51}. En México se informa que los haplotipos Benin y Bantú son los más frecuentes en las poblaciones de la costa del Golfo⁵⁰. De nuestros pacientes, dos presentaron en forma homocigota el haplotipo Bantú, y uno fue heterocigoto Arabia-saudi/Bantú, este hallazgo es semejante a los informados en otros estudios donde los cuadros clínicos más graves presentan haplotipo Bantú^{49,51}. Este haplotipo también se ha asociado con una respuesta pobre al tratamiento⁴¹, sin embargo en nuestro estudio todos los pacientes presentaron una respuesta favorable al tratamiento. Para poder confirmar la eficacia de la hidroxiurea en niños, y determinar las complicaciones del tratamiento a largo plazo se deben realizar estudios más extensos.

La terapia con hidroxiurea no elimina por completo las manifestaciones clínicas de la Anemia de células falciformes y su efecto benéfico sólo se observa mientras se administre, pero demuestra la capacidad de estimular la producción de HbF con un riesgo mínimo de mielotoxicidad y esto mejora el estado clínico y por lo tanto la calidad de vida de los pacientes y familiares, así como una reducción significativa en el número y días de hospitalización y sin duda disminuye costos en instituciones de salud que brindan atención a estos pacientes. Sin embargo, no se debe administrar el tratamiento a todos los pacientes con Anemia de células falciformes, sino solamente aquellos que presenten un cuadro clínico grave (donde los beneficios sean mayores a los riesgos) y se les debe dar seguimiento clínico y paraclínico estricto.

CONCLUSIONES.

Tomando en consideración los datos encontrados en los 24 pacientes que se capturaron en este estudio, podemos plantear:

1. La frecuencia de niveles altos de hemoglobina fetal en individuos con Anemia de células falciformes en las costas del Pacífico, es mayor a la informada en estudios de otras poblaciones en el mundo
2. El cuadro clínico, es menos grave en los pacientes con HbF elevada comparado con aquellos que presentaron HbF con niveles bajos.

Respecto al tratamiento con hidroxiurea, podemos plantear:

1. El uso de hidroxiurea en los tres pacientes con Anemia de células falciformes a dosis bajas, mejoró el cuadro clínico presentando descenso en el número y duración de crisis dolorosas, frecuencia de transfusiones y de hospitalizaciones.
2. La hidroxiurea como tratamiento en los tres niños con Anemia de células falciformes, fue bien tolerada y el riesgo de presentar cuadros de mielotoxicidad es bajo.
3. Los pacientes homocigotos para el haplotipo Bantú y el heterocigoto Bantú/Arabia-saudí, respondieron favorablemente al tratamiento con hidroxiurea.
4. Se requiere estudios con mayor número de pacientes y con un seguimiento a largo plazo, para confirmar la eficacia de hidroxiurea y generalizar los resultados a la población de pacientes pediátricos con Anemia de células falciformes y sus efectos adversos que aún se desconocen

BIBLIOGRAFÍA.

1. Nagel RL, Rannery HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. *Hematol* 1990, 27 : 342 - 359
2. Lisker R. Estructura Genética de la población mexicana. Editorial Salvat 1981.
3. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543
4. Ingram VM. Gene mutation in human hemoglobin the chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 1957;180: 326 - 329.
5. Edelstein SJ, Telford JN, Crepeau RH. Structure of sickle cell hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:1104-1109
6. Finch JT, Perutz MF, Bertles JF, Dobler J. Structure of sickled erythrocytes and of sickle-cell hemoglobin fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, 70 718 - 721
7. Ashley-Koch, Q Yang, R S Olney. Sickle hemoglobin (Hb S) Allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000 151: 839-845
8. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factor for early death. *N Engl J Med* 1994; 330 1639-1644.
9. Efstratiadis A, Posakony WJ, Maniatis T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, Derie IJK, Forget BG, Weissman SM, Slightom JL, Blochl AE, Sathies O, Baralle FE, Shoulders CC, Proudfoot NJ. The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* 1980, 21: 653-668.
10. Crossley M, Orkin SH. Regulation of β -globin locus. *Current Opin Genes Dev* 1993; 3 232 - 237
11. Wood WG, Bunch C, Kelly S, Gunn Y, Breckon G. Control of haemoglobin switching by a developmental clock? *Nature* 1985, 313 320-323.
12. Dyjkes GW, Crepeau RH, Edelstein SJ. Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of the hemoglobin S. *J Mol Biol* 1979, 130 451-572.
13. Franklin BH. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337 762-769
14. Poillon WN, Kim BC, Castro O. Intracellular hemoglobin S polymerization and the clinical severity of sickle cell anemia. *Blood* 1998, 91: 1777-1783
15. Brugnara C, Kopin AS, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of cation content and cell volume in hemoglobin erythrocytes from patients homozygous hemoglobin C disease. *J Clin Invest* 1985, 75. 1608-1617
16. Brugnara C, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation de erythrocytes cation and water content in sickle cell anemia. *Science* 1986, 232 388-390
17. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol III. Ed International 2001. pp 4571 - 4636
18. Stevens MCG, Maude GH, Cupidore, Jackson H, Hayes RJ, Serjeant GR. Prepubertal growth and skeletal maturation in children with sickle-cell disease. *Pediatrncs* 1986, 78 124-132.
19. Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davies LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L. Parvovirus infections and hypoplastic crises in sickle-cell anemia. *Lancet*. 1981, 1: 664 - 668

20. Wang WC, Helms RW, Lynn HS, Redding-Lallinger R, Gee BE, Obene-Frempong K, et al. Effect of hydroxyurea of growth in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study. *J Pediatr* 2002; 140: 225-229.
21. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinner TR. Pain in sickle cell disease: rates an risk factor. *N Engl J Med* 1991; 325:11-16.
22. Ballas SK. Management of sickle pain. *Current Opinion Hematol* 1997; 4 : 104-111.
23. Castro O, Brambilla DJ, Thorington BD, Reinford CA, Scott RB, Gillett P, Vera JC, Levy PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *N Engl J Med* 1994; 84: 643-649.
24. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood* 1995; 86: 776-83.
25. Balkaran B, Char G, Morns JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stoke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease *J Pediatr* 1992; 120: 360-366.
26. Adams Robert. Stroke prevention and treatment in sickle cell disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 565-568
27. Noguchi CT, Rodgers GP, Serjeant G, Schechter AN. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle-cell disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 96-99.
28. Powars DR, Weirs JN, Chan LS, Schroeder WA. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that amelio-rates morbidity in sickle-cell anemia? *Blood* 1984; 63: 921-926
29. Castro Oswaldo. Management of sickle cell disease recent advances and controversiess. *Br J Haematol* 1999; 107: 2-11
30. Lavallo D, DeSimone J, Heller P. Fetal hemoglobin reactivation in baboons and man: a short perspective. *Am J Hematol* 1993; 42 91-95
31. Koshy M, Dorn L, Bressier L, Molokue R, Lavallo D, Talischy N, et al. 2-deoxy 5 azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. *Blood* 2000; 96: 2379-2384
32. Ikuta T, Kan YW, Swerdlow PS, Faller DV, Perrine SP. Alteratons in protein-DNA interactions in the gamma-globin gene promoter in response butyrate therapy. *Blood* 1998; 92 2924-2933
33. Rodriguez GI, Kuhn JG, Weiss GR, Hilsenbeck SG, Eckardt JR, Thurman A, Rinaldi DA, Hodges S, Von Hoff DD, Rowinsky EK. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood* 1998; 91: 1533-1541.
34. Young CW, Hodas S. Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism. *Science* 1968; 146: 1172-1174
35. Marcus SJ, Kinney TR, Schultz WH, O'Branski EE, Ware RE. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle-cell disease. *Am J Hematol* 1997; 54 40-46
36. Blau CA, Constantoulakis P, Al-Khatib A, Spadacino E, Goldwasser E, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Fetal hemoglobin in acute and chronic states of erythroid expansion. *Blood* 1993; 81 227-233

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

37. Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. FKL2-2: A novel Kruppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood* 2000; 95: 3578-3584.
38. Gladwin MT, Schechter AN, Shelhamer JH, Pannell LK, Conway DA, Hinczenko BW, Nichols JS, Pease-Fye ME, Noguchi CT, Rodgers GP, Ognibene FP. Inhaled nitric oxide augments nitric oxide transport on sickle cell hemoglobin without affecting oxygen affinity. *J Clin Invest* 1999; 104: 937-945.
39. Jiang J, Jordan SJ, Barr DP, Gunther MR, Maeda H, Mason RP. In vivo production of nitric oxide in rats after administration of hydroxyurea. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 1081-1086.
40. Wang WC, Lynn LW, Rogers ZR, Scott JP, Lane PA, Ware RE. A two-year pilot trial of hydroxyurea in very young children with sickle-cell anemia. *J Pediatr* 2001; 139: 790-796.
41. Steinberg MH, Lu Z-H, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Multicenter Study of Hydroxyurea. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. *Blood* 1997; 89: 1078-1088.
42. Ballas SK, Marcolina MJ, Dover GJ, Barton FB. Erythropoietic activity in patients with sickle cell anemia before and after treatment with hydroxyurea. *Br J Haematol* 1999; 105: 491-496.
43. Charache S, Barton FB, Moore RD, Terrin ML, Steinberg MH, Dover GJ, Ballas SK, McMahon RP, Castro O, Ominger EP. Hydroxyurea and sickle cell anemia. clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75: 300-326.
44. Nagel RL, Rannery HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. *Semin Hematol* 1990; 27: 342-359.
45. Nagel R. Seventy, pathobiology, epistatic effects and genetic markers in sickle cell anemia. *Semin Hematol* 1991; 28: 180-201.
46. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 1989; 32: 66-69.
47. El-Hazmi MAF. Haemoglobinopathies and enzymopathies in Saudi Arabia: the present status. *Acta Hematol* 1987; 78: 130-134.
48. Hundrieser J, Sanguasemsri T, Laig M, Flatz G. β -Globin gene linked DNA haplotypes and frameworks in three south-east Asian populations. *Hum Genet* 1988; 80: 90-94.
49. Powars DR. Sickle cell anemia β^s -gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Semin Hematol* 1991; 28: 202-208.
50. Peñaloza R, García-Carranca A, Sedas T, Alvarez C, Berumen J, Zavala C, Salamanca F. Frequency of haplotypes in the beta globin gene cluster a selected sample of the Mexican population. *Am J Hum Biol* 1995; 7: 45-49.
51. Chang YP, Maier-Redelsperger M, Smith KD, Conyu L, Ducroco R, Montlombert M, Belloy M, Elion J, Dover GJ, Giro R. The relative importance of the X-linked FCP locus and β -globin haplotypes in determining haemoglobin F level: a study of patients homozygous for β^s haplotypes. *Br J Haematol* 1997; 96: 806-814.

52. Rodgers GP, Dover GJ, Noguchi CT, Schechter AN, Nienhuis AW. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N Engl J Med* 1990;332:1037-1045.
53. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (Hb S) allele and sickle cell disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 839-845.
54. Thomas PW, Higgs DR, Serjeant GR. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol* 1997; 50: 121-126
55. Dover GJ, Smith KD, Chang YC, Purvis S, Mays A, Meyers DA, Sheils C, Serjeant G. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. *Blood* 1992; 80 :816-824.
56. Pissard Serge, Beuzard Y. A potential regulatory region for the expression of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Blood* 1994; 84: 331-338.
57. Vermynen C, Cornu G. Bone marrow transplantation for sickle cell disease: the european experience. *Am J. Pediatr Hematol Oncol* 1994; 16: 18-21.
58. Vermynen C, Cornu G, Ferster A, Brichard B, Ninane J, Ferrant A, Zenebergh A, Maes P, Dhooze C, Benoit Y, Beguin Y, Dresse MF, Saniban E. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. *Arch Pediatr* 1999, Suppl 2: 345-347.
59. Valafar H, Valafar F, Darvill A, Albersheim P, Kutlar A, Woods KF, Hardin J. Predicting the effectiveness of hydroxyurea in individual sickle cell anemia patients. *Artificial Intelligence in Med* 2000; 18: 133-148

ANEXO 1
Hoja de recolección de datos

Número de Familia: _____ Número de paciente: _____

Nombre de paciente: _____

Edad (años y meses): _____ Sexo: M F

Talla _____ Peso _____

Dirección y teléfono: _____

Antecedentes familiares de Anemia de Células Falciformes: _____

Árbol genealógico:

Número de familiares afectados: _____ Primer síntoma referido _____

Edad de inicio de la sintomatología (años y meses): _____

Cuadro clínico con el que inicio la sintomatología de la enfermedad:

Número de infecciones _____

Tipo: Vías respiratorias _____ Tratamiento _____

Gastrointestinales _____ Tratamiento _____

Osteomielitis bacteriana _____ Tratamiento _____

Otro tipo _____ Tratamiento _____

Numero de transfusiones _____

No de crisis dolorosas _____ Total de hospitalización _____

Lugar: Extremidades _____

Espalda _____

Tórax _____

Abdomen _____

Tiempo de duración _____

No de crisis convulsivas _____ Tratamiento _____

Cirugía _____

Esplenectomía _____ Fecha _____

Otras _____

Hospitalizaciones por Neumonía _____

Hospitalizaciones por alteraciones neurológicas graves como hemorragia o

trombosis _____

Secuelas _____

Priapismo _____

Exploración Física _____

Exámenes de laboratorio

Electroforesis de la hemoglobina _____

Hemoglobina (g/dl) _____ Hematocrito(%) _____ CMH (pg) _____ VCM(fL) _____

Leucocitos ($\times 10^9/L$) _____ Neutrófilos _____ Reticulocitos _____

Otros _____

Hemoglobina fetal (%) _____

Pruebas Funcionales hepáticas:

Pruebas funcionales renales:

Estudios de gabinete.

Radiografías _____

Ultrasonido _____

Tomografías _____

ANEXO 2 CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Para el Protocolo: "HAPLOTIPO DE PACIENTES CON ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES Y SU RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON HIDROXIUREA".

1. Información sobre el estudio.

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación. Los médicos de su hijo han determinado que presenta una enfermedad llamada *Anemia de células falciformes*. Esta es una enfermedad causada por alteraciones en el material hereditario, provocando que la hemoglobina de los glóbulos rojos no funcione adecuadamente. Los glóbulos rojos son células sanguíneas que transportan el oxígeno de los pulmones a todas las células y que deben tener una forma de disco bicóncavo, si esta forma se pierde, la célula puede ocluir (tapar) los vasos sanguíneos dando como resultado los síntomas de la enfermedad.

La hidroxiurea es un fármaco que inhibe una enzima llamada ribonucleótido reductasa; este medicamento oral aumenta la hemoglobina fetal (de bebé) en los glóbulos rojos que ayudan a mantener su forma normal y disminuir los episodios de dolor y el síndrome de tórax.

El propósito del estudio tiene fines terapéuticos y científicos, los resultados servirán para aportar nuevos conocimientos sobre la respuesta a hidroxiurea en pacientes con Anemia de células falciformes así como el comportamiento en los procesos hereditarios.

2. Procedimientos.

Su participación consiste en aceptar el tratamiento con el fármaco llamado hidroxiurea a dosis de 10mg/Kg/día por 6 meses y en donar 5-10 ml de sangre periférica, así como someterse a una serie de revisiones clínicas por hematología y servicios clínicos necesarios, exámenes de laboratorio y gabinete requeridos normalmente para establecer el diagnóstico y sus complicaciones de la enfermedad. La hidroxiurea puede provocar náuseas, vómito e irritación de la piel la que desaparece al disminuir la dosis.

La toma de muestra de sangre en este estudio implican un riesgo mínimo, que puede estar asociado con incomodidad, enrojecimiento o contusión en el sitio de la perforación de la piel, sin poner en riesgo la vida de su hijo.

3. Beneficios.

En la Anemia de células falciformes existen evidencias de disminuir las crisis dolorosas, síndrome pulmonar agudo y la transfusión sanguínea.

Al término del estudio, el investigador le proporcionará la información completa sobre los resultados del haplotipo obtenidos y se le notificará sobre cualquier procedimiento que pudiera recibir en beneficio de la enfermedad de su hijo.

En caso de que exista riesgo para alguno de sus familiares de padecer Anemia de células falciformes, se realizarán los estudios al alcance del médico y de la institución para diagnosticar el padecimiento. Así mismo se proporcionará un asesoramiento genético completo para usted y sus familiares.

4. Complicaciones.

Los efectos secundarios del tratamiento con hidroxiurea no están bien definidos. En estudios internacionales (Estados Unidos y Europa) de pacientes pediátricos con tratamiento por cinco años con este medicamento no han presentado complicaciones como leucemias o cáncer, pero por ser un fármaco mielotóxico existe esta posibilidad de riesgo.

5. Confidencialidad.

La información que se obtenga en este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin su consentimiento por escrito.

6. Participación / suspensión.

La participación de su hijo en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de retirar a su hijo en cualquier momento. Su decisión de rehusarse a participar o suspender el estudio no afectará la calidad ni la disponibilidad de su atención médica.

7. Consentimiento.

Una persona responsable de este estudio le ha explicado los pormenores del mismo y los riesgos y beneficios potenciales que esté implica. Usted a tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tiene alguna duda deberá comunicarse con las responsables del estudio Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa y/o Dra. Eugenia Dolores Ruiz Cruz. Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en el estudio.

Lugar: _____ Fecha _____

Nombre del paciente _____

Nombre de la Madre: _____ Firma _____

Nombre del Padre: _____ Firma _____ :

Testigo: _____ Firma _____

Testigo: _____ Firma _____

ANEXO 3

Método de extracción de DNA de muestras de sangre mediante SDS y NaCl.

- Tomar una muestra de 5 a 10 ml de sangre de un individuo y mezclarla con 500 μ l de EDTA al 0.5% (pH=7.6).
- Centrifugar a 3 Krpm durante 10 min.
- Tomar con pipeta Pasteur la capa de leucocitos de la interfase y pasarla a un tubo eppendorf limpio y esterilizado.
- Agregar al tubo 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos, mezclar vigorosamente hasta que se halla resuspendido la pastilla.
- Centrifugar a 3 Krpm por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante usando vacío.
- Repetir los pasos 4,5 y 6 por lo menos dos veces, hasta que la pastillas se encuentre blanca.
- Resuspender la pastilla en 886 μ l de NaCl a 5mM, agitar vigorosamente
- Agregar a cada tubo 46 μ l de SDS al 10%, agitar vigorosamente.
- Adicionar 308 μ l de NaCl saturado a cada tubo, agitar vigorosamente.
- Centrifugar 15 min. a 15 Krpm, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
- Realizar al menos dos extracciones fenólicas (fenol-cloroformo-isoamilico; 25.24:1), después se trabaja con la fase acuosa.
- Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol o dos volúmenes de etanol
- Centrifugar 5 min. a Krpm, eliminar el sobrenadante y lavar dos veces la pastilla con etanol al 70%.
- Resuspender la pastilla de DNA en 200 a 500 μ l de agua desionizada.
- Almacenar el DNA a -20° C

Espectrofotometría de luz ultravioleta (UV).

Mediante de esta técnica es posible calcular la concentración y pureza del DNA

La longitud de onda utilizada es de 260 nm

- La concentración se obtiene tomando como base la siguiente relación .
1 densidad óptica equivale a 50 μ g de DNA/ml

La pureza se obtiene Absorbancia a 260 nm/ absorbancia 280 nm
óptima = 1.8

ANEXO 4

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

1. Se seleccionará la región para amplificar por medio de la elección de oligonucleótidos de inicio (*primers*) para los siete sitios de restricción por endonucleasas que son los siguientes:

- 1). Para el sitio polimórfico XmnIregión 5' del gen $\alpha\gamma$
AACTGTTGCTTTATAGGATTT
AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC
- 2). Para el sitio polimórfico HindIIIregión IVSII de los genes $\alpha\gamma / \gamma$
AAGTGTGGAGTGTGCACATGA
TGCTGCTAATGCTTCATTACAA
TAAATGAGGAGCATGCACACAC
- 3). Para el sitio polimórfico HincII región de gen $\psi\beta$
GAACAGAAGTTGAGATAGAGA
ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT
- 4). Para el sitio polimórfico HincII región 3' del gen $\psi\beta$
TCTGCATTTGACTCTGTTAGC
GGACCCTAACTGATATAACTA
- 5). Para el sitio polimórfico HinfI región 5' del gen β
CTACGCTGACCTCATAAATG
CTAATCTGCAAGAGTGTCT
- 6). Para el sitio polimórfico HpaIregión 3' del gen β
TTCATACATAACAATACTCA
GAGGAGAGCTTACTTCCAA

2. Material necesarios

- Agua desionizada
- $MgCl_2$ 50mM
- Solución amortiguadora para la amplificación 10X.
- Mezcla de los cuatro deoxinucleósidos a una concentración de 25 mM
- Un par de primer a 20 pmol/ μ l
- DNA genómico 100 ng/ μ l
- *Taq* DNA polimerasa 5 U/ μ l
- Termociclador
- Material plástico, tubos eppendorf de 500 μ l y puntas desechables.
- Micropipetas.
- Microcentrifugas

3. Procedimientos:

- Se realizará una mezcla con todos los reactivos a excepción del DNA genómico, calculando la cantidad de reactivos para un volumen final de 25 μ l
- Posteriormente se colocará 1 μ l de DNA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Se colocarán los tubos en el termociclador, bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial 94°C (5 min).

seguida de 35 ciclos (a,b y c)

- a. Desnaturalización 94°C (1 min).
- b. Alineamiento 55°C (45 seg).
- c. Extensión por 45 seg. con las siguientes temperaturas correspondientes para cada par de *primers*; 52°C para *XmnI* 5'-G, 54°C para *HindIII*-G, 58°C para *HindIII*-A, 49°C para *HincII*-Ψβ, 47°C para *HincII*-3'Ψβ, 48°C para *Hinf*.I-5'β y 49°C para *HpaI*-3'β.

- Extensión final de 72°C por 10 min.

Restricción de los productos de PCR con endonucleasas.

1. Material.

- Productos de amplificación por PCR 3 μl.
- Agua bidestilada 5 μl
- Enzimas específicas 1 μl (*XmnI* 5'-G, *HindIII*-G, *HindIII*-A, *HincII*-Ψβ, *HincII*-3'Ψβ, *Hinf*.I-5'β y *HpaI*-3'β)
- Buffer específico para cada enzima 1 μl.

2 Procedimiento

- Se mezclan todos los materiales arriba señalados.
- Se agitan suavemente
- Se incuban a 37°C por 2 hrs
- Finalmente para observar los fragmentos de restricción se corren electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se observa con marcadores de peso molecular y luz UV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 5

Electroforesis en geles de agarosa.

1. Material

- Solución amortiguadora TAE 1x preparada a partir del stock 50x (Tris base 242g, ácido acético glacial 57.1 ml y EDTA 100 ml a 0.5 M y pH 8).
- Bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.
- Agarosa grado molecular.
- Marcador de peso molecular de 123 ó 50 ó 100 pb.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Fuente de poder.

2. Procedimiento

- Se prepara gel de agarosa al 2% (1g. Agarosa en 50 ml de solución amortiguadora).
- La mezcla se calienta en microondas hasta hervir.
- Una vez disuelta el agarosa completamente, se agrega 2 μl de Bromuro de etidio, agitándose para homogenizar.
- Se vierte la agarosa fundida, en la plataforma de la cámara previamente sellada y se inserta un peine a 3 mm de profundidad en la solución.
- Una vez que el gel haya polimerizado se retirará el peine cuidadosamente.
- Se añade a la cámara de electroforesis suficiente solución amortiguadora, hasta cubrir el gel
- Se coloca en los pozos formados por los peines 1 a 2 μl de la muestra mezclada con colorante (azul bromofenol)
- Se aplica una corriente de 100 volts por aproximadamente 20 min.
- Posteriormente se trasilumina con una lámpara de luz UV y se toman fotografías mediante el programa digital.