



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**CIENCIAS MÉDICAS**

**“Variación genética de dinucleótidos (AC)<sub>n</sub> del extremo 5’ del gen  $\beta$ -  
globina y su relación con anemia de células falciformes”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS**

**P R E S E N T A:**

**E U G E N I A D O L O R E S R U I Z C R U Z**

**TUTORES PRINCIPALES DE LA TESIS**

**DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA.**

**DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ.**

**Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.**

Ciudad Univeristaria, CD. MX.

Julio 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Colaboradores**

Q.F.B. Arcelia Hernández Maya. H.G.Z.24, IMSS, Poza Rica, Ver.

Dra. Carmela Hernández Carvajal, H.G.Z.1, IMSS, Acapulco, Gro.

Q.B.P. Beatriz Nieva García, H. Pediatría C.M.N. Siglo XXI, IMSS, Cd. de México.

Dr. Paul Delgado Olguín, Q.F.B. Jorge N. García Azuara, Q.F.B. Eva C. Morales Almazán, Q.F.B. Evet Sánchez, Unidad de Investigación en Genética Humana, C.M.N. Siglo XXI, IMSS, Cd. de México.

Aprobado por la comisión de Investigación y Ética del Hospital de Pediatría,  
C.M.N. Siglo XXI, IMSS.



---

DIRECCIÓN REGIONAL SIGLO XXI  
DELEGACIÓN 3 SUROESTE DEL DISTRITO FEDERAL  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA C.M.N. SXXI  
DIVISIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN MÉDICA

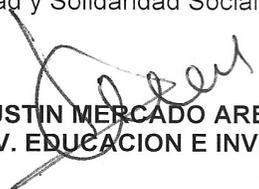
FECHA: Abril 1°, 2002.

**DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOZA**  
**UIM en Genética Humana**  
**Hospital de Pediatría CMN SXXI**  
**P r e s e n t e**

Por el presente le informo que su protocolo de investigación: "**POLIMORFISMOS DE REPETIDOS (AC)<sub>n</sub> DEL EXTREMO 5' DEL GEN  $\beta$  GLOBINA EN FAMILIAS PORTADORAS DE HEMOGLOBINA S**", fue **aprobado** por el Comité Local de Investigación y de Bioética con el Número de registro local: **2002/718/008**

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"Seguridad y Solidaridad Social"



**DR. AGUSTÍN MERCADO ARELLANO**  
**JEFE DIV. EDUCACION E INVESTIGACION**

c.c.p.- Dra. Eugenia Dolores Ruiz Cruz.- UIM en genética humana.

JAMA/mpcc\*

## **AGRADECIMIENTO INSTITUCIONALES**

Al **Instituto Mexicano del Seguro Social**, es un gran honor ser parte de esta gran institución que me ha proporcionado los medios para crecer como profesional.

Al **Posgrado en Ciencias Médicas, UNAM**, por su gran apoyo y asesoría durante el proceso de la Maestría.

Al **CONACYT**, por la beca recibida a lo largo de la maestría.

A todos los **Colaboradores**, que sin su apoyo no hubiera sido posible culminar la tesis.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi esposo **Francisco**

Quien ha estado a mi lado proporcionándome su amor, fortaleza, apoyo e impulsándome para que cada día crezca como persona y mejore profesionalmente, gracias por compartir esta hermosa vida, te amo.

A mis **Padres**

Por ser mis pilares, mi apoyo, por su enseñanzas y su amor incondicional. Gracias por darme la vida y estar a mi lado en todo momento.

A la **Dra. Rosenda Peñaloza**

Por sus enseñanzas, su valiosa guía, su apoyo incondicional, su paciencia y por propocionarme su amistad que es invaluable, ha sido un placer enorme trabajar a su lado.

Al **Dr. Fabio Salamanca**

Por permitirme formar parte de su quipo de trabajo, es un honor y un gran ejemplo.

A todos mis **Amigos y Compañeros.**

Por su cariño y apoyo incondicional, es bueno saber que cuento con ustedes.

## INDICE

Indice.....	6
Indice de figuras y tablas.....	7
Abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
Antecedentes.....	13
Pregunta de investigación.....	24
Justificación.....	24
Objetivos.....	25
Clasificación de la investigación.....	25
Diseño de la muestra.....	25
Criterios de selección	
Criterios de inclusión	
Criterios de eliminación	
Tamaño de la muestra	
Variables	
Metodología.....	28
Descripción general	
Análisis estadístico.....	30
Aspectos éticos.....	30
Resultados.....	31
Discusión.....	40
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	45
Anexos #1, hoja de captura.....	50
Anexos de metodología # 2, consentimiento informado.....	52
Anexos de metodología # 3, extracción de DNA.....	54
Anexos de metodología # 4, técnica de PCR.....	55
Anexos de metodología # 5, electroforesis en geles de agarosa.....	56
Anexos de metodología # 6, electroforesis en geles de poliacrilamida...	57
Anexos de metodología # 7, secuencia Sanger .....	58

**INDÍCE DE FIGURAS Y TABLAS**

Figura 1..... 14

Figura 2..... 17

Figura 3..... 19

Figura 4..... 31

Figura 5..... 35

Figura 6..... 35

Figura 7..... 36

Figura 8..... 37

Figura 9..... 39

Tabla 1..... 32

Tabla 2..... 33

Tabla 3..... 34

Tabla 4..... 38

## ABREVIATURAS

ACF: Anemia de células falciformes  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
dNTPs: Dideoxinucleósidos  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
Gro: Guerrero  
GWAS: *Genome wide association study*  
HbF: Hemoglobina Fetal  
HbA: Hemoglobina A  
HbS: Hemoglobina S  
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social  
LCR: Región controladora de locus  
LD: Desequilibrio de ligamiento  
NaCl: Cloruro de sodio  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
RAN: Traducción sin ATG asociada a repeticiones  
RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica  
RNA: Ácido ribonucleico  
SCD: *Sickle cell disease*  
SSR: Repeticiones cortas en tándem  
UIMGH: Unidad de Investigación en Genética Humana  
Ver: Veracruz

## RESUMEN

### VARIACIÓN GENÉTICA DE DINUCLEÓTIDOS (AC)<sub>n</sub> DEL EXTREMO 5' DEL GEN β-GLOBINA Y SU RELACIÓN CON ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES.

**Antecedentes.** La familia de los genes β-globina, es un excelente candidato para investigar patrones de variantes polimórficas, además cuenta con diversos STR, incluyendo la región de repetidos (AC/TG)<sub>n</sub>, que muestran una tasa de recombinación entre 3 y 30 veces mayor a la esperada y una alta recombinación de secuencia-específica. Los repetidos (AC/TG)<sub>n</sub> se encuentran entre -2678 a -2648 del extremo 5' del gen β-globina y pocos estudios se han enfocado a descifrar el papel que juegan los repetidos (AC/TG)<sub>n</sub> en la recombinación, si existe variación en ellos o si existe alguna asociación entre la longitud de los repetidos y la gravedad de hemoglobinopatías, en particular, la anemia de células falciformes (ACF).

**Justificación.** Algunas variantes polimórficas en las familias de los genes β-globina han sido ampliamente estudiados, pero no así la región de repetidos dinucleótidos (AC)<sub>n</sub> en el extremo 5' del gen β-globina. El interés en esta región principalmente está dado por: 1) el incremento en el número y variedad de marcadores genéticos que dan la oportunidad de analizar la diversidad genética entre e intra-poblaciones y su evolución, 2) algunos polimorfismos están relacionados con efectos en el fenotipo, y 3) permiten construir diferencias étnicas y entre individuos con o sin implicaciones para la salud.

**Objetivo.** Describir la variación genética de los repetidos (AC)<sub>n</sub> del extremo 5' del gen β-globina en los pacientes estudiados y comparar la gravedad de la enfermedad en pacientes con anemia de células falciformes y el nivel de hemoglobina fetal.

**Metodología.** Se captaron a todos los pacientes registrados con el diagnóstico de Anemia de células falciformes que acudieron de enero del 2000 a Julio del 2001 a los hospitales de Acapulco, Guerrero y Poza Rica, Veracruz, del IMSS. Se confirmó el diagnóstico de anemia de células falciformes y se identificaron a los pacientes con cuadros grave o leve de acuerdo a la evaluación clínica y hematológica. Se tomó una muestra de 5 ml de sangre periférica previo consentimiento informado, se extrajo el

DNA de leucocitos y amplificó la región de repetidos (AC/TG)<sub>n</sub> de la región 5' del β-globina. Se analizaron los tamaños de los repetidos por electroforesis vertical de poliacrilamida de todas las muestras, comparadas con controles de peso molecular conocidos. Los resultados se analizaron con estadística descriptiva, obtención de frecuencias génicas y medidas de diversidad nucleotídica basada en el número observado de repetidos microsatélites.

**Conclusiones.** La variabilidad en la región de repetidos (AC/GT)<sub>n</sub> del extremo 5' del gen β-globina, fue mayor a lo reportado previamente, las frecuencias alélicas observadas fueron: 14.6%, 10.4%, 52.1%, 10.4% 12.5% para los alelos con 14, 15, 16, 17 y 18 repetidos AC, respectivamente. Todos los alelos se encontraron con una frecuencia mayor a 0.05 y la heterocigocidad observada fue del 62.5%. No se encontró asociación entre el número de repetidos (AC)<sub>n</sub> y la severidad del cuadro clínico o la elevación de hemoglobina fetal, obteniendo un coeficiente de correlación (r)= -0.1498 para el número de repetidos (AC)<sub>n</sub> y la gravedad de cuadro clínico, y una (r)=0.1181 para el número de repetidos (AC)<sub>n</sub> y niveles de HbF. También se observó una mayor frecuencia de persistencia de HbF en pacientes ACF (20.83%), comparada con lo informado en la literatura.

## ABSTRACT

### GENETIC VARIATION OF (AC)<sub>n</sub> DINUCLEOTIDE REPEAT AT THE 5'-END OF THE β-GLOBIN GENE AND ITS RELATIONSHIP WITH SICKLE CELL DISEASE

**Background.** The β-globin gene cluster is an excellent candidate to investigate patterns of polymorphic variants, has various STR and including the region with repeats (AC/TG)<sub>n</sub>, which show a recombination rate between 3 and 30 times higher than expected and a high sequence-specific recombination. Repeats (AC/TG)<sub>n</sub> are between -2678 to -2648 from the 5'-end of the β-globin gene, and few studies have focused on deciphering the role played by repeats (AC/TG)<sub>n</sub> in recombination, if there is variation in them or if there is any association between the length of the repeats and the severity of hemoglobinopathies, in particular, sickle cell disease (SCD).

**Justification.** Some polymorphic variants in the β-globin gene region, have been extensively studied, but not the region (AC)<sub>n</sub> dinucleotide repeat at the 5' end of the β-globin gen. The interest in this region is mainly due by: 1) the increase in the number and variety of genetic markers, offers additional opportunity to analyze human evolution and genetic diversity between and intra-populations, 2) some genomic polymorphisms are related to effects on the phenotype, and 3) constitute ethnic differences and human individuality with or without health implications.

**Objective.** To describe the genetic variation the region (AC)<sub>n</sub> dinucleotide repeat at the 5' end of the β-globin gen, in the patients studied and to compare the severity of the disease in patients with SCD and the level of fetal hemoglobin.

**Methodology.** All the patients registered with the diagnosis of SCD, who attended from January 2000 to July 2001 at the hospitals of Acapulco, Guerrero and Poza Rica, Veracruz, IMSS, were recruited. The patients classified according to clinical and haematological in severe or mild disease. A sample of 5 ml of peripheral blood was taken, after acceptance of informed consent, the DNA was extracted from leukocytes and amplified the region (AC)<sub>n</sub> dinucleotide repeat at the 5' end of the β-globin gen. The sizes of the repeats of all the samples, we analyzed by vertical polyacrylamide electrophoresis, and compared with known molecular weight controls. The results we

analyzed with descriptive statistics, gene frequencies and measurements of nucleotide diversity we obtained analyzing the observed number of dinucleotide repeat.

**Conclusions.** The variability of the region with repeats (AC/TG)<sub>n</sub> of the 5' end of the β-globin gene was found, higher than previously reported. The allelic frequencies were of 14.6%, 10.4%, 52.1%, 10.4%, and 12.5% for the alleles with 14, 15, 16, 17 and, 18 repeated (AC)<sub>n</sub>, respectively. We found an allelic frequency greater than 0.05 and, the observed heterozygosity was 62.5%. No association was found between the number of repeated (AC)<sub>n</sub> and the severity of the clinical picture or the elevation of fetal hemoglobin, obtaining a correlation coefficient (r) = -0.1498 for the number of AC repetitions and the severity of the clinical picture, and one (r) = 0.1181 for the number of repeated (AC)<sub>n</sub> and HbF levels. A higher frequency of persistence of HbF was also observed in SCA patients (20.83%), compared with that reported in the literature.

## VARIACIÓN GENÉTICA DE DINUCLEÓTIDOS (AC)<sub>n</sub> DEL EXTREMO 5' DEL GEN β-GLOBINA Y SU RELACION CON LA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES.

### ANTECEDENTES.

#### ***Repeticiones cortas en tándem.***

Las repeticiones cortas en tándem (SSR o STR, *Simple Sequence Repeats* o *Short Tandem Repeats*), secuencias también conocidas como microsatélites, son repetidos de nucleótidos que constan de 1 a 6 pares de bases (pb), se encuentran a lo largo del genoma eucarionte, varían en tamaño y son altamente polimórficos los cuales pueden ser usado como marcadores genéticos. Las repeticiones que se observan con mayor frecuencia en el genoma son las repeticiones de homonucleótidos, dinucleótidos y trinucleótidos, aunque también se observan secuencias de tetranucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos. Se estima que existen más de 1 millón de loci de STR en el genoma humano y constituyen aproximadamente el 3% del DNA genómico, muchos de estos loci han sido implicados en la regulación de la expresión génica (Gymrek et al. 2016; Quilez et al. 2016). Los STR pueden encontrarse como motivos simples (CT)<sub>n</sub> o (AC)<sub>n</sub> y su longitud es variable ya que son susceptibles a presentar una alta tasa de mutación, del orden de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-3</sup> por generación. Una de las causas por las que ocurren estas mutaciones son por entrecruzamiento desigual (*crossing over*) (Chakraborty et al. 1997; Ellegren 2014). Los STR se localizan frecuentemente en regiones no codificantes, proporcionando una alta inestabilidad caracterizada por pequeños cambios durante el crecimiento celular y actualmente las herramientas tecnológicas como la secuenciación de alto rendimiento, han reconocido con mayor precisión a los STR, formando catálogos que revelan a los STR como altamente multialélicos y pueden contribuir con más mutaciones *de novo* que cualquier otra clase de variante. Aprovechando estos hallazgos, diversos estudios han mostrado que los STR desempeñan un papel generalizado en la regulación de la expresión génica y en los diferentes fenotipos moleculares. Estos análisis sugieren que los STR son un depósito valioso de variación génica, pero poco apreciado que probablemente haga contribuciones significativas a las enfermedades monogénicas, los rasgos complejos y

el cáncer. Los datos proporcionados por los estudios en estas regiones, nos dan la oportunidad de conocer la semejanza y variabilidad entre individuos, poblaciones y especies (Lander ES, *et al.* 2001; Sun JX, *et al.* 2012).

### STRs y sus efectos.

#### 1. Patogénicos.

Las expansiones de STR, se han implicado en docenas de trastornos. Diversos trabajos han demostrado que estas expansiones inducen una variedad de efectos patogénicos (Figura 1), incluyen agregación de poliglutamina (Mirkin SM. 2007), hipermetilación (Sutcliffe JS. *et al.* 1992), toxicidad por RNA (Galka-Marciniak P. 2012) y traducción sin ATG asociada a repeticiones (traducción RAN) (Pearson CE, *et al.* 2011). También se ha demostrado que las pequeñas repeticiones pueden afectar el empalme del RNA (Hefferon TW. *et al.* 2004) o la regulación de la expresión génica (Holoch D. y Moazed D. 2015). Muchos de estos mecanismos están presentes en múltiples loci, lo que indica que probablemente representan fenómenos de todo el genoma (Gymrek M. 2017; Bagshaw ATM. 2017).

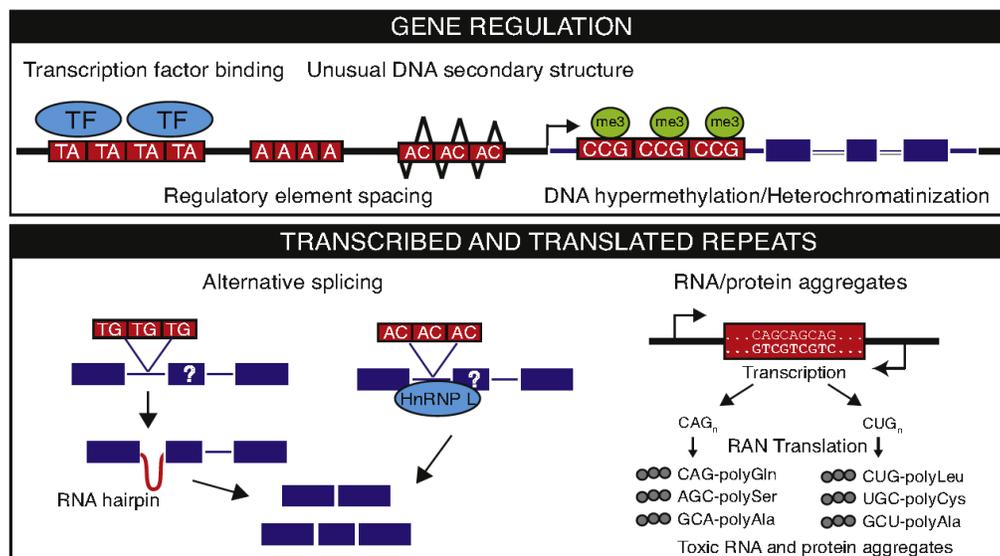


Figura 1. Esquema de los mecanismos propuestos para los STR que podrían regular la expresión y función de los genes, (Gymrek M. 2017).

## 2. Formación de estructuras no DNA-B

En algunos casos, los roles funcionales de los microsatélites se han relacionado con su potencial para adoptar estructuras diferentes al DNA-B. Estas incluyen varias conformaciones bien descritas que son energéticamente menos favorables que el DNA-B normal (Mirkin SM, 2008). El primero en descubrirse fue el DNA-Z, que se caracteriza por alternar los nucleótidos de purina y pirimidina, debido a que AC es el motivo dinucleótido más repetido entre los microsatélites de mamíferos, incluyen secuencias poli-AC y poli-CG de longitud moderada, el DNA-Z puede ser la variante conformacional más relevante para la función de los microsatélites en mamíferos. Cuando están presentes en regiones promotoras pueden unirse a diferentes proteínas que afectan la expresión génica (Wang G, 2007; Wong B, 2007, Bagshaw ATM, 2017).

## 3. *Hot spots* de recombinación meiótica.

Los primeros *hot spots* de recombinación meiótica en humanos se descubrieron en las regiones  $\beta$ -globina e insulina al analizar los patrones de herencia familiar (Chakravarti *et al.* 1984 y 1986). En los últimos años, el número de *hot spots* identificados en mamíferos aumenta gradualmente, a menudo por casualidad. Los datos recientes refieren que los STR han incrementado notablemente el número de *hot spots*, por lo tanto, el repertorio de material disponible para estudio.

Los estudios en población humana en parte se basan en la observación de los STR que tienden a formar grupos o haplotipos de 10 a 100 kb de longitud. Dentro de estos bloques, la mayoría o todos los marcadores están en desequilibrio de ligamiento (LD), y los límites de los bloques están correlacionados entre poblaciones. Los patrones de LD pueden ser moldeados por muchos factores, incluyendo la mutación, la recombinación, la selección, la demografía de la población y la deriva genética. Los análisis computacionales basados en coalescentes se han utilizado para inferir probabilidades de que los límites de los haplotipos representan *hot spots* históricos. Estos estudios han mejorado

enormemente nuestro conocimiento sobre la distribución de eventos de recombinación en todo el genoma y sobre los posibles factores que actúan en *cis* que regulan la actividad de los *hot spots* en humanos (Myers S, *et al.* 2005 y 2008). En los genomas humanos y de ratones, existen una proporción de *hot spots* donde los eventos de recombinación meiótica son más frecuentes, se rigen por proteínas de unión a secuencias específicas del DNA, y actúan en coordinación con procesos epigenéticos (Gendrel CG, *et al.* 2000; Paigen K y Petkov P, 2010).

#### 4. Relación genotipo-fenotipo en enfermedades complejas.

La relación genotipo-fenotipo en entidades multifactoriales, no se explica solamente por un factor, se ha considerado que esta relación es compleja, pero la identificación de estos factores genéticos ha resultado ser un desafío; Si bien los estudios de asociación han identificado muchas variantes genéticas asociadas a estas enfermedades, generalmente confieren menos riesgo de la enfermedad que lo esperado a partir de estimaciones empíricas de heredabilidad. Esta discrepancia, denominada "heredabilidad pérdida", se ha atribuido a muchos factores (Gibson G. 2012). Una explicación trivial es que los entornos compartidos entre parientes pueden incrementar artificialmente las estimaciones de heredabilidad. Sin embargo, la heredabilidad faltante también puede deberse a variantes en el genoma humano (Press MO, *et al.* 2014). Según Gymrek, los STR atribuibles a variantes comunes en *cis*, que afectan los niveles de expresión génica, contribuyen del 10-15% a la heredabilidad (Gymrek M. *et al.* 2017)

#### 5. Patrones de herencia.

La mayoría de los trastornos por STR identificados hasta ahora, siguen patrones de herencia autosómicos dominantes. Sin embargo, los STR pueden contribuir a una variedad de modos de herencia. Hasta ahora no se ha cuestionado el papel de los STR en condiciones espontáneas o *de novo*, en entidades como el autismo y los trastornos del desarrollo neurológico. Además, los STR son a menudo altamente multialélicos, por

lo tanto, pueden generar patrones de herencia complejos (Gymrek M, 2017).

### **Genes de las hemoglobinas.**

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 (Protoporfirina tipo IX y un átomo de hierro) que es constante en todas las hemoglobinas, y cuatro cadenas polipeptídicas: dos de tipo alfa ( $\alpha$ ) con 141 aminoácidos cada una y dos de tipo beta ( $\beta$ ) de 146 aminoácidos.

La familia  $\alpha$ -globina está constituida por los genes  $\zeta$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , localizados en el cromosoma 16p13.3, incluyendo varios pseudogenes. La familia de los genes  $\beta$  que comprenden a  $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  y el pseudogen  $\beta$  localizado entre  $A\gamma$  y  $\delta$ , se encuentran ubicados en el locus 11p15.5 con una longitud de 70 kb (Diepstraten ST, 2018) (Figura 2).

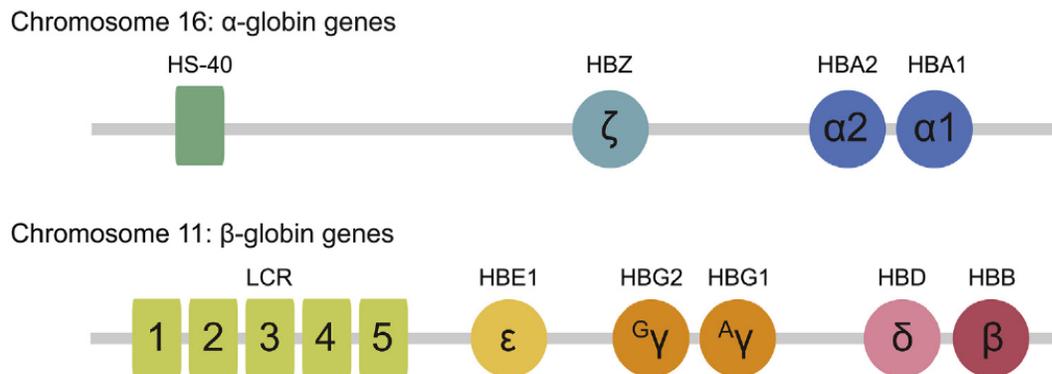


Figura 2. Los genes de globina humana: los tipo  $\alpha$  se encuentran en el cromosoma 16 y los genes de globina tipo  $\beta$ , incluida la región de control del locus (LCR), se encuentran en el cromosoma 11 (Diepstraten ST, Hart AH. 2018).

La diferencia entre las distintas hemoglobinas (normales y anormales) radica precisamente en los tipos de cadenas globínicas que las constituyen. Las hemoglobinas normales pueden ser clasificadas de acuerdo con el período en el que se presentan durante el desarrollo del individuo en: embrionarias [Gower

( $\zeta 2$ ,  $\epsilon 2$ ), 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 expresión de la familia de los genes  $\beta$ -globínicos es en el orden 5'  $\rightarrow$  3' y requieren elementos de control local (promotores y amplificadores) y distales (región controladora de locus, LCR) (Crossley M y Orkin SH, 1993).

Las alteraciones de la hemoglobina se clasifican en tres categorías; variantes estructurales, talasemias y persistencia hereditaria de hemoglobina fetal. Dentro de las primeras se han descrito más de 750 variantes, un tercio de ellas presentan un cuadro clínico patológico como el relacionado con anemia de células falciformes (Modell B y Darlison M, 2008).

### ***Haplotipos y recombinación en los genes de la familia de genes $\beta$ -globina.***

La recombinación entre secuencias homólogas de DNA dúplex, juega un importante papel en la generación de diversidad genética en todos los organismos. Aunque la recombinación homóloga ocurre a lo largo de todo el genoma humano, este no ocurre al azar y parece concentrarse a regiones específicas (Fisher-Lindahl 1991; Myers S, *et al.* 2005 y 2008). La región de la familia de genes  $\beta$ -globina en el cromosoma 11 es una de las más intensamente estudiadas en los humanos. Entre los estudios realizados se han identificado múltiples *RFLP* (*restriction fragment length polymorphisms*). Estos polimorfismos se agrupan en dos regiones: el primero hacia el extremo 5' de 34 kb, incluye a los polimorfismos *HindII*- $\epsilon$ , *HindIII*- $G\gamma$ , *HindIII*- $A\gamma$ , *HindII*- $\Psi\beta$ , *HindII*- $\Psi\beta$ , y *Taq I*-58 $\delta$  y el segundo de 19-kb en el extremo 3' incluye el *HgiAI*- $\beta$ , *AvaII*- $\beta$  y *BamHI*- $\beta$  (Antonarakis SE, *et al.* 1982) (Figura 3).

Por los estudios de ligamiento con estos polimorfismos, se conoce que existe una tasa de recombinación de 3 a 30 veces mayor a la esperada. A esta región se les conoce como punto caliente para recombinación genética e inicio de la replicación. La localización de estos eventos de entrecruzamiento y replicación en la familia de genes  $\beta$ -globina se han limitado gracias al número informativo de *RFLP*, el que tiene una longitud de 10 kb aproximadamente. Varias secuencias han sido propuestas como candidatos de señales para la

recombinación, algunos de los cuales se identificaron en el punto caliente, los cuales abarcan más de 2 kb corriente arriba del sitio “cap” del gen  $\beta$ -globina, incluyendo la región donde inicia la replicación del gen  $\beta$ -globina, encontrándose una secuencia consenso de 16 pb, para el elemento Pur (Rachelle A, *et al.* 1998) (Figura 3).

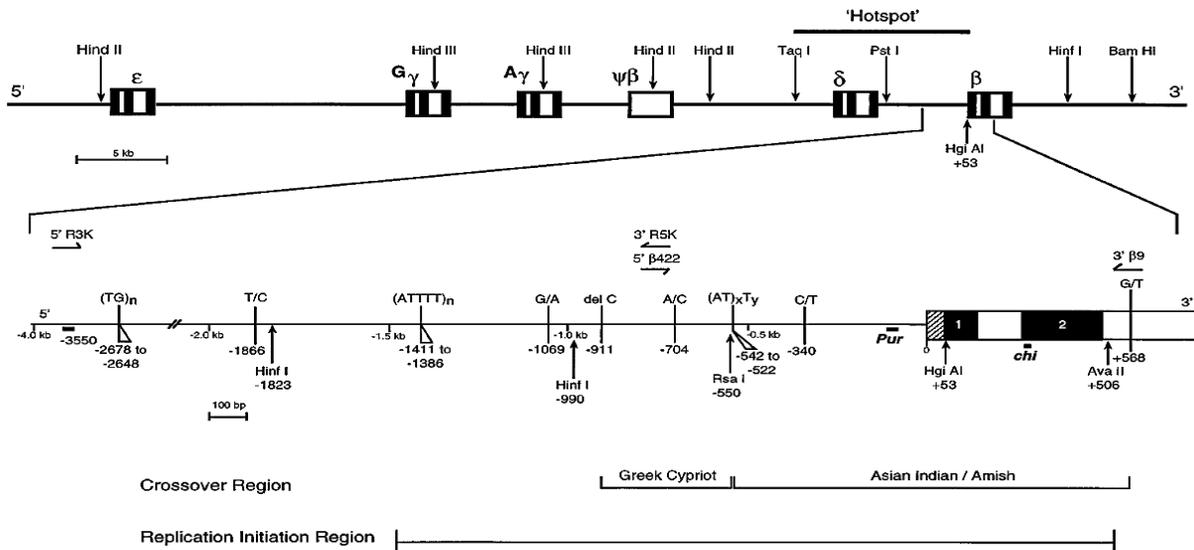


Figura 3. Mapa de la región de la familia de genes  $\beta$ -globina con el *hotspot* de 10 kb, la región de recombinación y la del inicio de replicación, (Rachell, 1988).

Además incluye la región de repetidos  $(TG/AC)_n$ , que interesantemente, en estudios de recombinación de secuencia-específica en meiosis realizada en *Saccharomyces cerevisiae*, donde compararon tres fragmentos adyacentes al extremo 5' del gen  $\beta$ -globina, demostraron que la eliminación de los repetidos  $(TG/AC)_n$  que se encuentran entre -2678 a -2648, no reducen significativamente la alta frecuencia de recombinación en esta región. Sin embargo, el papel exacto de estos elementos en la recombinación no permanece claro. Pero una observación común en repetidos microsatélites, es que existe mayor tendencia a la mutación en aquellas regiones de gran longitud que en las de longitud corta (Trecó *et al.* 1985; Xu X, *et al.* 2000).

### ***Repetidos AC en la región 5' del gen $\beta$ -globina.***

La familia de los genes  $\beta$ , es uno de los grupos génicos más investigados en las células eucarióticas, es un excelente candidato para investigar patrones de variantes polimórficas y divergencia asociada a la región de replicación y recombinación. Aun así, pocos estudios se han enfocado a descifrar qué papel juegan los repetidos (AC)<sub>n</sub> en la recombinación, en el fenotipo de las hemoglobinopatías y si existe variación en ellos. En población mexicana, sólo se reporta un estudio de frecuencias de alelos en 5 poblaciones; mixteca, náhuatl, otomí, purépecha y mestiza, encontrándose variación en el número de repetidos (16 repetidos AC). A estos nuevos alelos se nombraron; alelo A = 16 repetidos AC (68.2 a 86.9%), alelo B = 14 repetidos AC (13.1 a 18.2%) y alelo C = 18 repetidos AC (6.7 a 13.6%). Los alelos A y B se encontraron en todas las poblaciones estudiadas, mientras que el C se encontró sólo en los mestizos y purépechas. Este hallazgo puede explicarse por un diferente origen de la población purépecha y en el grupo mestizo puede sugerir que este marcador viene de la mezcla génica entre españoles e indígenas mexicanos (Peñaloza R, et al. 2001). Esto nos sugiere que existe variabilidad en estos repetidos, pero se desconoce en la actualidad si estos polimorfismos se asocian a la gravedad en enfermedades de la hemoglobina o tiene algún otro papel biológico, así como también medidas de variación genética como heterocigocidad y números de alelos en diversas poblaciones.

### ***Anemia de células falciformes (ACF)***

La ACF es una de las hemoglobinopatías más frecuente en el mundo, pero su prevalencia ha sido influenciada por la selección natural y en poblaciones descendientes de inmigrantes de origen africano, por lo tanto, no es sorprendente que la prevalencia más alta de ACF en el mundo se mantenga en África subsahariana, secundados por Oriente Medio e India. La Organización Mundial de la Salud, refiere que las tasas anuales de neonatos nacidos con ACF se estiman en 230,000 en África, 43,000 en Asia Sudoriental, 13,000 en América, 10,000 en Mediterráneo Oriental, 3500 en Europa, y 4 en la región del Pacífico Occidental por año (Modell B, Darlison M, 2008). Los análisis de los haplotipos  $\beta^s$ , sugieren que el alelo surgió independientemente al menos 5 veces en África, Medio Oriente e India, pero la ACF se

ha identificado en poblaciones hispanas, caucásicas, nativas americanas y asiáticas, presumiblemente debido a los patrones de inmigración, como sucedió en las costas de México desde la época de la colonia (Peñaloza R, *et al.* 1995). La prevalencia global de ACF está aumentando y se espera que continúe aumentando en el futuro (Modell B, Darlison M. 2008; Azar S, Wong TE. 2017).

La ACF es un padecimiento autosómico recesivo (MIM#603903), ocasionado por una mutación puntual (GTG→GAG) en el sexto codón del gen  $\beta$ -globina, sustituyendo al ácido glutámico por el aminoácido valina. El cambio en la polaridad del aminoácido da como resultado la unión normal del oxígeno en soluciones diluidas, pero en estado homocigoto la desoxigenación hace que las cadenas  $\beta$  se polimericen (Azar S, Wong TE. 2017).

Los pacientes con hemoglobina SS, presentan una variedad de problemas clínicos que se inician entre el primero y segundo año de vida, una vez que se ha substituido la mayor parte de la hemoglobina fetal por hemoglobina S. 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 intensa. En cambio, los homocigotos tienen cuadros clínicos graves como son: Alteraciones del crecimiento y desarrollo, mayor susceptibilidad a las infecciones, anemia hemolítica crónica grave, crisis dolorosas, síndrome torácico agudo, necrosis ósea por isquemia, secuestro esplénico y alteraciones neurológicas. Las características clínicas y de laboratorio son afectadas por los niveles en sangre de la hemoglobina fetal (HbF), a mayor cantidad (>12.2%) menor severidad del cuadro clínico y a menor cantidad (< 9.8%) mayor severidad del cuadro clínico, debido a que la Hb F es un potente inhibidor de la polimerización de la desoxihemoglobina S. Los niveles altos de HbF varían considerablemente, el 40% de la variación, está dada por las células F ligadas al cromosoma X, y el 14% a los haplotipos Senegal y Arabia-India que se asocian con la forma más benigna de la enfermedad. Estas observaciones sugieren estrategias terapéuticas enfocadas a preservar o reactivar la producción de hemoglobina fetal después del nacimiento pero se limita por su poco conocimiento en

la regulación génica (Craig, *et al.* 1997; Longdon, *et al.* 1998).

### **Los factores que impactan en la severidad de paciente con HbS.**

El mayor determinante de la severidad es la cantidad de hemoglobina fetal (HbF) en los eritrocitos, la HbF juega un papel determinante al disminuir la morbimortalidad de los paciente ACF, sin embargo, se ha observado que los niveles de HbF en estos pacientes es el resultado de interacciones complejas, entre ellas se encuentran varias determinantes genéticas, algunas asociadas al grupo de genes que forman las  $\beta$ -globinas, diversos estudios han demostrado el rol de los polimorfismos en la variabilidad, en particular las variantes de los repetidos (TG)<sub>n</sub> (CG)<sub>n</sub>, en la región IVSII del gen  $\gamma$ -globina. Otra región involucrada son los repetidos (AT)<sub>n</sub>12(AT), localizada en el sitio eritroide específico 5'HS2, que se encuentran dentro del locus de la región control (*LCR*) (Pace, Goodman. 2016; Moumni, *et al.* 2016).

Las células F actúan inhibiendo la polimerización de la HbS en condiciones de baja oxigenación, otras determinantes son: Las comorbilidades entre ellas la presencia de alfa talasemia y deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, polimorfismos en el promotor de *UGT1A1* y cuantificación de leucocitos (Habara A, Steninberg M. 2016). Por medio de estudios de GWAS se ha descrito nuevas variantes de nucleótido único en el segundo intrón del gen *BCL11A* y en cuatro genes previamente reportados como genes candidatos (*SPARC, GJC1, EFTUD2* y *JAZF1*), relacionados con la expresión de la hemoglobina fetal, así como también influyen los mecanismos que regulan de forma negativa la expresión, entre ellos, *STAT3* que se une a la región 5' no traducida del gen  $\gamma$ -globina (Azar and Wong. 2017).

La región de las  $\beta$ -globinas está ampliamente estudiada, sin embargo hasta el momento no se ha estudiado específicamente si los repetidos AC del extremo 5' del gen  $\beta$ -globina tiene algún efecto modificador en el nivel de HbF en pacientes con ACF, nuestro interés en la región está dada por tres condiciones principalmente: 1) Algunos polimorfismos genómicos están relacionados con efectos en el fenotipo y constituyen diferencias étnicas y de individualidad; 2) Esta región es considerada una zona de alta recombinación y por lo tanto con una probable función en la evolución de la familia de

genes de la  $\beta$ -globina y, 3) El incremento en el número y variedad de marcadores genéticos ofrecen la oportunidad de analizar la evolución humana y la diversidad genética entre e intra-poblaciones.

El propósito de este estudio, es principalmente ver si existe alguna relación entre el número de repetidos AC y la gravedad de la enfermedad en paciente con ACF.

## DISEÑO Y METODOLOGÍA

### **Pregunta de investigación**

¿Existe asociación entre número de repetidos AC y la gravedad de la enfermedad en paciente con anemia de células falciformes?

### **Justificación.**

Algunas variantes polimórficas en las familias de los genes  $\beta$ -globina han sido ampliamente estudiados, pero no así la región de repetidos AC en el extremo 5' del gen  $\beta$ -globina. El interés en la región está dado por tres condiciones principalmente:

- 1) Algunos polimorfismos genómicos están relacionados con efectos en el fenotipo, y constituyen diferencias étnicas y de individualidad humana con o sin implicaciones para la salud.
- 2) El incremento en el número y variedad de marcadores genéticos ofrece la oportunidad adicional de analizar la evolución humana y la diversidad genética entre e intra-poblaciones.
- 3) Esta región es considerada una zona de alta recombinación y por lo tanto con una probable función en la evolución de la familia de genes de la  $\beta$ -globina.

Por lo tanto, este estudio describe la variación genética por medio de la heterocigosidad en los dinucleótidos AC del extremo 5' del gen  $\beta$ -globina en familias portadoras de Anemia de células falciformes en la población mexicana y su relación con la gravedad en pacientes con ACF.

## **Objetivos**

### *General.*

- Describir la relación entre la gravedad de la enfermedad en pacientes con anemia de células falciformes y el número de repetidos de AC en el extremo 5' del gen  $\beta$ -globina.

### *Particulares.*

- Describir los factores que contribuyan a la gravedad del cuadro clínico en los paciente con anemia de células falciformes.
- Describir la variación alélica de los repetidos AC en el extremo 5' del gen  $\beta$ -globina en los pacientes con ACF.
- Contribuir a la caracterización genética de los repetidos AC en la población mexicana portadora de hemoglobina S.

## **Diseño.**

Estudio observacional, transversal y comparativo.

### **Diseño de la muestra.**

Definición del universo: Todas las familias con Anemia de células falciformes (ACF) diagnosticados en sus lugares de origen y corroborados por electroforesis.

Definición de la muestra: Familias con antecedentes de anemia de células falciformes obtenidos de los bancos de datos de los Hospital General de Zona de Acapulco Guerrero, y Poza Rica, Veracruz, IMSS.

### Criterios de selección.

Familias con antecedentes de ACF.

### Criterios de inclusión:

Individuos con diagnóstico de anemia de células falciformes confirmado por

electroforesis de hemoglobinas.

Individuos de cualquier edad.

Individuos de ambos géneros.

Criterios de eliminación:

Pacientes que hayan recibido transfusiones reciente (>10% de hemoglobina A).

**Tamaño de la muestra:**

Se realizó el estudio en 21 familias con antecedentes de ACF diagnosticada en sus clínicas de origen y confirmada por electroforesis. En éste estudio dado a la poca información en el comportamiento de heterocigocidad en los repetidos AC en el extremo 5' del gen beta-globina, no se calcula el tamaño de muestra estudiándose a todas las familias identificadas.

**Variable independiente.**

Variabilidad en el número de repetidos AC en el extremo 5' del gen  $\beta$ -globina

**Descripción operativa:**

Variación genética en los repetidos AC de los individuos estudiados.

Definición operacional: Comportamiento de los repetidos dinucleótidos AC en el extremo 5' del gen de la beta globina en familias portadoras de Anemia de células falciformes y en familias no portadoras de Anemia de Células falciformes.

Tipos de variables: cualitativas.

Escala de medición: nominal (ausencia o presencia).

**Variable dependiente.**

Gravedad de la Anemia de células falciformes.

Definición de eventos clínicos para clasificar gravedad en ACF.

Cuadro grave: Individuos con ACF, quienes presenten dos o más de los siguientes criterios en el periodo de un año.

- Dos o más crisis dolorosas, definida como dolor en extremidades, abdomen, tórax o articulaciones, con duración mínima de dos horas, requiriendo cuidados médicos
- Un episodio de síndrome torácico agudo, se define como presencia de infiltrados pulmonares observados en radiografías, dolor pleurítico, fiebre y síntomas de enfermedad pulmonar como disnea y taquipnea.
- Necrosis ósea por isquemia definida como dolor en hombro o cadera con daño funcional y radiografía anormal.
- Priapismo definido como erección dolorosa persistente.
- Alteraciones neurológicas como convulsiones o isquemia, confirmado por el servicio de neurología con criterios clínicos, de imagen y electroencefalograma.
- Secuestro esplénico, se define como disminución súbita del hematocrito o nivel de hemoglobina 20% por debajo de los niveles basales, simultáneamente incremento en el tamaño del bazo palpándose como mínimo dos centímetros debajo del borde costal.

Cuadro moderado: Individuos con ACF, quienes presenten uno de los criterios durante el periodo de un año.

- Dos o más crisis dolorosas, definida como dolor en extremidades, abdomen, tórax o articulaciones, con duración mínima de dos horas, requiriendo cuidados médicos
- Un episodio de síndrome torácico agudo, se define como presencia de infiltrados pulmonares observados en radiografías, dolor pleurítico, fiebre y síntomas de enfermedad pulmonar como disnea y taquipnea.
- Necrosis ósea por isquemia definida como dolor en hombro o cadera con daño funcional y radiografía anormal.
- Priapismo definido como erección dolorosa persistente.
- Alteraciones neurológicas como convulsiones o isquemia, confirmado por el servicio de neurología con criterios clínicos, de imagen y electroencefalograma.

- Secuestro esplénico, se define como disminución súbita del hematocrito o nivel de hemoglobina 20% por debajo de los niveles basales, simultáneamente incremento en el tamaño del bazo palpándose como mínimo dos centímetros debajo del borde costal.

Cuadro leve. Individuos con ACF y con una crisis de dolor en el periodo de un año o sin ninguna otra sintomatología.

Tipos de variables: cualitativas.

Escala de medición: nominal.

### **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 precipitación con álcalis y colorimetría.

Tipo de variable: cuantitativa.

Escala de medición: continua (Porcentaje).

### **Metodología.**

Los individuos con Anemia de células falciformes y sus familias fueron captados del registro de Anemia de células falciformes del Hospital General de Zona de las poblaciones de Acapulco Guerrero y Poza Rica, Veracruz del IMSS. Los individuos seleccionados con ACF y familiares, se realizaron estudios paraclínicos generales, se clasificó el grado de severidad de la enfermedad y se obtuvo DNA de leucocitos de

sangre periférica, el DNA fue estudiado por medio de técnicas moleculares para identificar los repetidos dinucleótidos del extremo 5' del gen de la beta globina. Al concluirse el estudio molecular, se analizaron por métodos estadísticos para estimar la diversidad genética de los repetidos AC y verificar la existencia de asociación entre la gravedad de la enfermedad y el número de repetidos.

### **Descripción general del estudio.**

Los individuos con ACF y sus familias fueron captados del registro de ACF de los Hospitales Generales de Zona de las poblaciones; de Acapulco, Guerrero y de Poza Rica, Veracruz, del IMSS. Se confirmó y clasificó la gravedad de la enfermedad en un grupo de individuos con cuadro clínico de ACF y sus familiares, captados por los servicios de Hematología de las poblaciones antes mencionadas, a todo se les realizó; examen físico, biometría hemática completa, química sanguínea, electrolitos, pruebas funcionales hepáticas y renales, por medio de electroforesis en acetato de celulosa se realizó cuantificación de hemoglobinas incluyendo fetal y S.

La información obtenida se capturó en la hoja de recolección de datos (Anexo 1), también se solicitó consentimiento informado explicando la finalidad del estudio (Anexo 2). De los individuos con ACF y sus familias se tomó 5 ml de sangre periférica con anticoagulante (EDTA).

Se obtuvo DNA de leucocitos de sangre periférica de acuerdo al método de alta concentración de sales; Se separaron los leucocitos en tubo de eppendorf y se agregó solución de lisis mezclándose vigorosamente y posteriormente se eliminó el sobrenadante, se repitió por lo menos en dos ocasiones este proceso, la pastilla obtenida se le suspendió en NaCl se agitó y se centrifugó, el sobre nadante se transfirió a eppendorf y se realizó por lo menos dos extracciones fenólicas, se precipitó el DNA con etanol se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, obteniéndose DNA el cual se resuspende en agua desionizada y se almacenó a -20°C. Se verificó la concentración y pureza del DNA (Anexo 3).

Con el DNA obtenido se amplificó la región de repetidos AC de la región 5' del gen beta globina, se empleó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en tubo de eppendorf se realizó la mezcla de todos los reactivos; Solución amortiguadora, dNTPs,

iniciadores diseñados en la UIMGH, Taq polimerasa, H<sub>2</sub>O bidestilada y DNA. Los tubos se colocaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 5 minutos, seguida por 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos (Anexo 4), se verificó la amplificación por medio de electroforesis en geles de agarosa (Anexo 5). Se analizaron los tamaños de los repetidos AC por electroforesis vertical de poliacrilamida de todas las muestras con controles de peso molecular conocidos (Anexo 6). Finalmente para verificar el número de repetidos dinucleótidos se obtuvo productos de amplificación de los geles de poliacrilamida, se purificó el DNA retirándole los residuos de acrilamida y se realizó secuenciación nucleotídica automática para conocer el número de repetidos específicos (Anexo 7).

### **Análisis estadístico.**

Se analizaron los resultados por estadística descriptiva, prueba de asociación con  $X^2$  y regresión lineal para verificar asociación entre el grado de severidad de la enfermedad y el número de repetidos dinucleótidos. La obtención de frecuencias génicas y medidas de diversidad, basada en el número observado de repetidos microsatélites nucleotídica como la heterocigocidad observada.

### **Aspectos éticos.**

El estudio fue éticamente factible, pues cumple con las normas establecidas en la declaración de Helsinki, la Ley General de Salud y la buenas Prácticas Clínicas. Todos los individuos participantes fueron informados de los motivos del estudio, por medio de una carta de consentimiento y/o asentimiento, donde se informaba los estudios paraclínicos necesarios para la valoración clínica y la obtención de sangre periférica para extracción de DNA. Se solicitó aprobación y registro del protocolo de investigación por los comités de Investigación y Bioética del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, este proyecto cuenta con el número de registro 2002/718/008.

## RESULTADOS

Se identificaron 21 familias y un total de 24 individuos con anemia de células falciformes, 21 pacientes no relacionados y 3 relacionados por hermandad, procedentes de los Hospitales Generales de Zona de Acapulco Guerrero, Naranjos y Poza Rica, Veracruz, los tres hospitales del IMSS, registrados de enero del 2000 a Julio del 2001.

Se confirmó el diagnóstico del ACF y se clasificó la gravedad del cuadro clínico de acuerdo a la evaluación clínica y hematológica. Dicha evaluación comprende revisión de expediente clínico, historia clínica, biometría hemática y electroforesis con acetato de celulosa a pH ácido y alcalino (figura 4), para cuantificación y tipificación de las hemoglobinas.

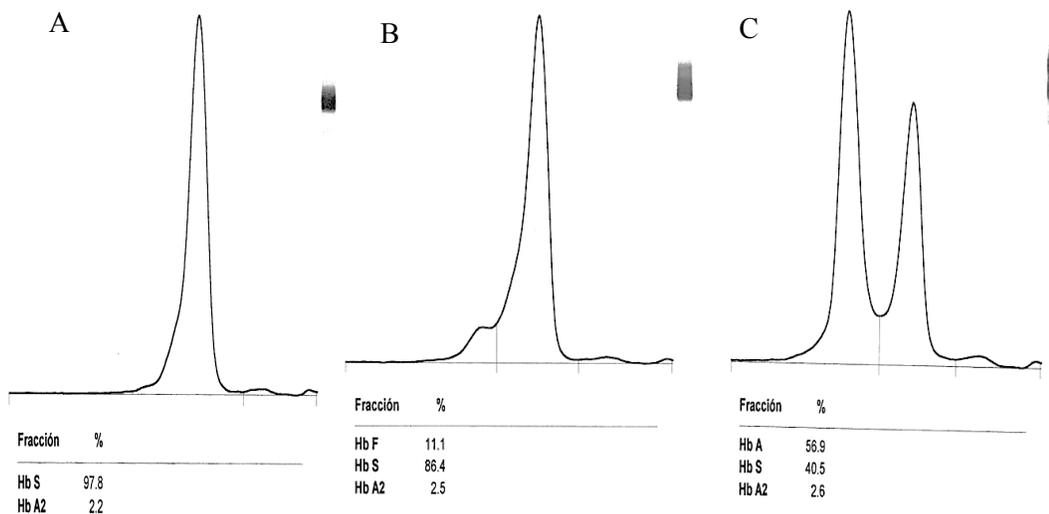


Figura 4. Electroforesis en acetato de celulosa que cuantifica cada tipo de hemoglobina; (A) homocigotos para HbS, (B) homocigoto para HbS y persistencia de HbF, y (C) heterocigoto para HbS.

El rango de edad en los pacientes con ACF fue de 2 a 20 años, de los que 13 fueron mujeres (54.2%). En cinco pacientes encontramos HbF alta (entre 9.8 y 22.8%) y el resto tuvo HbF baja (< 1%). Los límites de HbS fueron entre 73.5 a 97.8% y el de HbA de 2.0 a 6.9%. La mayor parte (79.2%) de los pacientes manifestó la enfermedad entre el sexto y doceavo mes de vida, siendo la crisis hemolítica el cuadro clínico más frecuente. El 41% de los pacientes presentaron un peso por debajo de dos desviaciones estándar y el 45% una talla por debajo de -2 desviaciones estándar para edad. A dos

pacientes se les realizó esplenectomía antes de cumplir un año de vida (por secuestro esplénico), uno presentó necrosis ósea por isquemia en cabeza de fémur, dos presentaron un evento de síndrome torácico agudo durante el último año y dos presentaron crisis convulsivas. Todas estas características sólo se observaron en pacientes con ACF y HbF baja.

Si bien no hubo diferencias significativas en el número de transfusiones por año entre los dos grupos, los pacientes con HbF elevada requirieron menor número de éstas. En la Tabla 1, se muestran las características clínicas y hematológicas comparando a los dos grupos (Hb total, hematocrito, volumen corpuscular medio, leucocitos y crisis dolorosa e infecciones por año).

Por las características clínicas de los paciente se clasificaron en 2 grupos; 19 con cuadro severo y 5 con cuadro leve, la variable asociada a un cuadro leve fue los niveles altos de HbF.

Tabla I. Características generales de los individuos afectados de ACF.

<b>Variable</b>	<b>Porcentaje</b>
Sexo	
Femenino	54.2%
Masculino	45.8%
Hemoglobina fetal	
Mayor de 7 %	20.83%
Menor de 7%	79.17%
Edad del primer síntoma	
6 a 12 meses	79.17%
Mayor de 12 meses	20.83%
Talla	
< 2 desviaciones estándar	41%
Peso	
< 2 desviaciones estándar	45%
Transfusiones	
≥ 2 por año	25%
Infecciones con Tx. Antimicrobiano.	
≥ 3 por año	12%
≤ 2 por año	12%

En la Tabla 2 y 3, muestra las características que presentaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes.

Tabla 2. Características hematológicas de los 24 pacientes comparando a los portadores de HbF elevada vs. HbF baja.

<b>Variable</b>	<b>Media ± DS* con HbF baja</b>	<b>Media± DS con HbF elevada</b>
<i>Hemoglobina fetal (%)</i>	0.1	13.5 ± 5
<i>Nivel de hemoglobina (g/ dl).</i>	8.2 ± 1	9 ± 2
<i>Hematocrito (%)</i>	25.6 ± 4	27 ± 2.7
<i>Volumen corpuscular medio (fl)</i>	93 ± 8	91 ± 15
<i>Hemoglobina corpuscular media de (pg)</i>	31 ± 2	30 ± 5
<i>Leucocitos x 10<sup>9</sup>L</i>	12 ± 3	9 ± 3.8
<i>Neutrófilos x 10<sup>9</sup>L</i>	5.6 ± 2.5	4.8 ± 2

\*Desviación estándar.

Tabla 3. Características clínicas y hematológicas que presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los dos grupos de pacientes.

<b>Característica clínica o hematológica.</b>	<b>No de Pacientes con ACF HbF alta</b>	<b>No de Pacientes con ACF y HbF baja</b>	<b>Prueba exacta Fisher P&lt;</b>
<i>Hb Total g/dl</i> >7 ≤7	5 0	6 13	0.01
<i>Hematocrito (%)</i> ≥35 <35	4 1	5 14	0.047
<i>Vol. Corpuscular medio (fl)</i> ≥80 <80	4 1	5 14	0.047
<i>Leucocitosx10<sup>9</sup>L</i> ≤10 >10	5 0	4 15	0.005
<i>Crisis dolorosas por año</i> <2 ≥2	5 0	5 14	0.002
<i>Infecciones por año.</i> <3 ≥3	5 0	6 13	0.01

### **Extracción de DNA.**

Se obtuvo DNA a una concentración entre 100-200 ng/ $\mu$ l y una pureza cercana a 1.8 de 24 pacientes con ACF. La concentración y la pureza obtenida son óptimas para llevar a cabo la amplificación de repetidos AC (Figura 5).

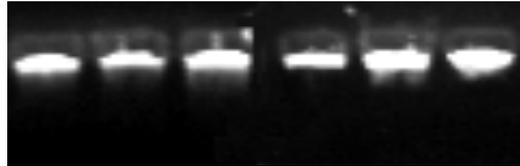


Figura 5. Electroferograma que muestra DNA genómico íntegro

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo un amplificado de 261 pb, correspondientes a los repetidos AC en el extremo 5' del gen  $\beta$ -globina (Figura 6).

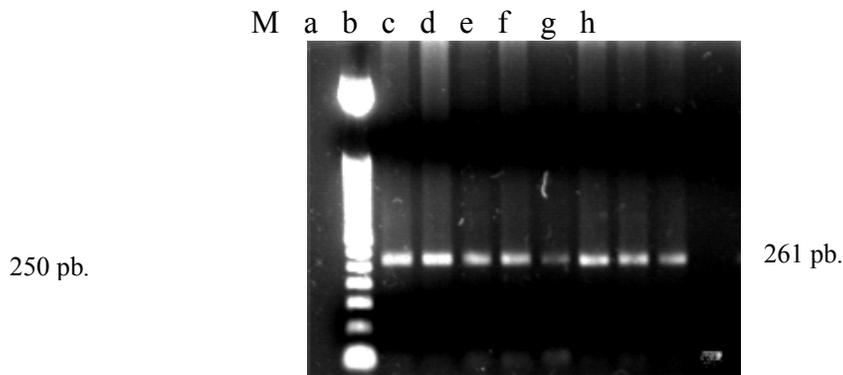


Figura 6. Electroferograma en gel de agarosa al 2%, de los productos amplificados de diferentes pacientes. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular, escala de 50 pb y productos de amplificación de 261 pb.

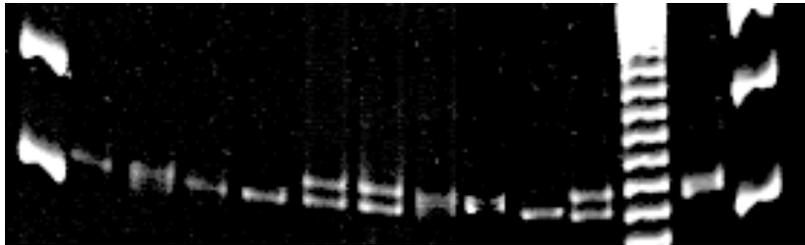
### Geles de poliacrilamida.

Se utilizan geles de poliacrilamida para separar los fragmentos de repetidos AC en los 24 paciente estudiados. El tamaño de los amplificadas encontrados fueron entre 259 a 263 pb, además se distinguir a los homocigotos de los heterocigotos (Figura 7).

#### A. Naranjos

*M50 CI T T M AM AP CI M H P M10 Cp M50*

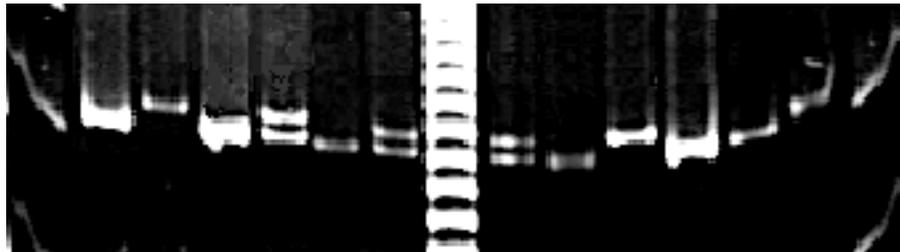
250pb.



*Ho Ho Ho Ho He He Ho Ho He Ho M10 Ho*

#### B. Poza Rica

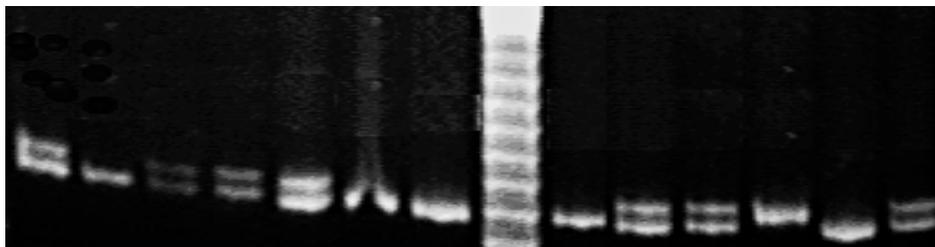
*M50 M P CI CI P M M10 H CI H P M H M50*



*Ho Ho Ho He Ho He M10 He Ho Ho Ho Ho Ho*

#### C. Acapulco

*P CI M P H H CI M10 M P H M CI H*



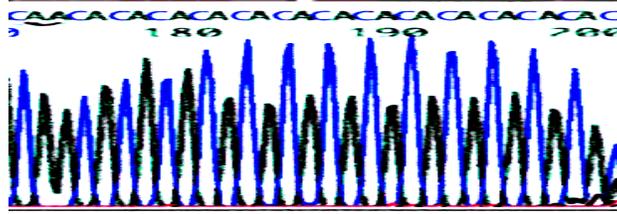
*He Ho He He He Ho Ho M10 Ho He He Ho Ho He*

Figura 7. Electroferograma en gel de poliacrilamida de los productos amplificadas. Se muestran resultados de las familias de tres poblaciones estudiadas: A. Naranjos, B. Poza Rica y C. Acapulco. Se identifican a homocigotos (*Ho*) y heterocigotos (*He*).

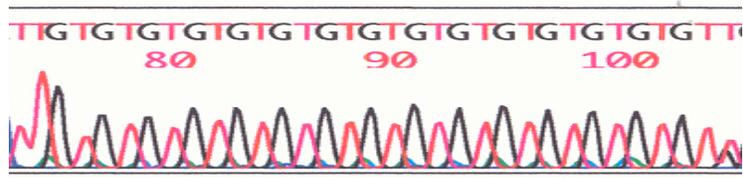
### Secuenciación de tipo Sanger

Para corroborar el número de repetidos dinucleótidos AC, se realizó secuenciación de tipo Sanger, se identificaron cinco tipos de longitudes 14, 15, 16, 17 y 18 repeticiones de (AC/TG) (Figura 8).

#### 14 repetidos, paciente 3 Acapulco.



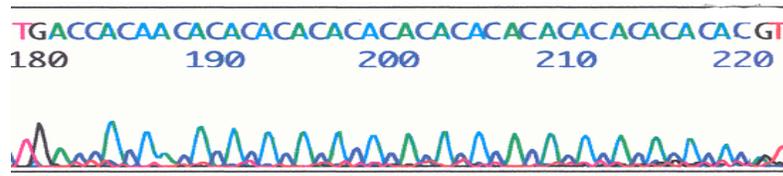
#### \*15 repetidos, paciente 9 Acapulco.



#### \*16 repetidos, paciente 2 Poza Rica.



#### 17 repetidos, paciente 2 Naranjos.



#### 18 repetidos, paciente 6 de Acapulco.

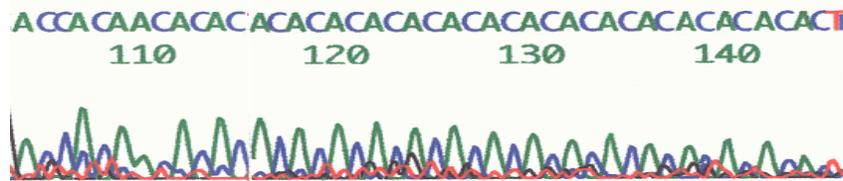


Figura 8. Se muestran los cromatogramas con los diferentes números de repetidos dinucleótidos observados.

\*Secuencias antisentido.

### Diversidad alélica.

Se analizaron el número de repetidos dinucleótidos AC en los 24 pacientes con ACF, encontrándose las siguientes frecuencias alélicas: 14 repetidos (14.6%), 15 repetidos (10.4%), 16 repetidos (52.1%), 17 repetidos (10.4%) y 18 repetidos (12.5%). Todos los alelos se encontraron con una frecuencia mayor a 0.05 y la heterocigocidad observada fue del 62.5%. En la

Tabla 4. Muestra los resultados del número de repetidos encontrados en los 24 pacientes ACF y gravedad del cuadro clínico.

<b>Origen</b>	<b>No de Familia y lugar de origen</b>	<b>Número de repetidos (AC)<sub>n</sub></b>	<b>Gravedad</b>	<b>Niveles de HbF</b>
Naranjos, Ver	1 Naranjos	16,16	grave	< 1
	2 Naranjos	17,17	leve	11.1
Poza Rica, Ver	1 Poza Rica	16,18	grave	< 1
	2 Poza Rica	16,16	grave	< 1
	3 Poza Rica	16,16	grave	< 1
Acapulco	1 Acapulco	16,16	leve	9.8
	2 Acapulco	16,16	grave	< 1
	3 Acapulco	14,14	grave	< 1
	4 Acapulco	16,18	grave	< 1
	5 Acapulco	16,16	leve	10.3
	6 Acapulco	16,18	grave	< 1
	7 Acapulco	17,18	grave	< 1
	8 Acapulco	15,17	leve	22.8
	8 Acapulco*	15,18	grave	< 1
	9 Acapulco	15,17	grave	< 1
	10 Acapulco	15,16	grave	< 1
	11 Acapulco	15,16	grave	< 1
	12 Acapulco	14,16	grave	< 1
	13 Acapulco	14,16	grave	< 1
	14 Acapulco	14,16	grave	< 1
	14 Acapulco*	16,18	grave	< 1
15 Acapulco	16,16	leve	13.7	
15 Acapulco*	14,16	grave	< 1	
16 Acapulco	14,16	grave	< 1	

\*Corresponde a pacientes relacionados por hermandad.

### Asociación entre la gravedad de cuadro clínico y los repetidos AC.

No se encontró asociación entre el número de repetidos AC y la severidad del cuadro clínico o la elevación de hemoglobina fetal (variable de mayor valor estadístico, asociada a la severidad de ACF). Se utilizó como indicador estadístico la correlación lineal para determinar el grado de asociación, obteniendo un coeficiente de correlación  $(r) = -0.1498$  para el número de repetidos AC y la gravedad de cuadro clínico y  $(r) = 0.1181$  para el número de repetidos AC y niveles de HbF. Los resultados se muestran en la representación gráfica (Figura 9).

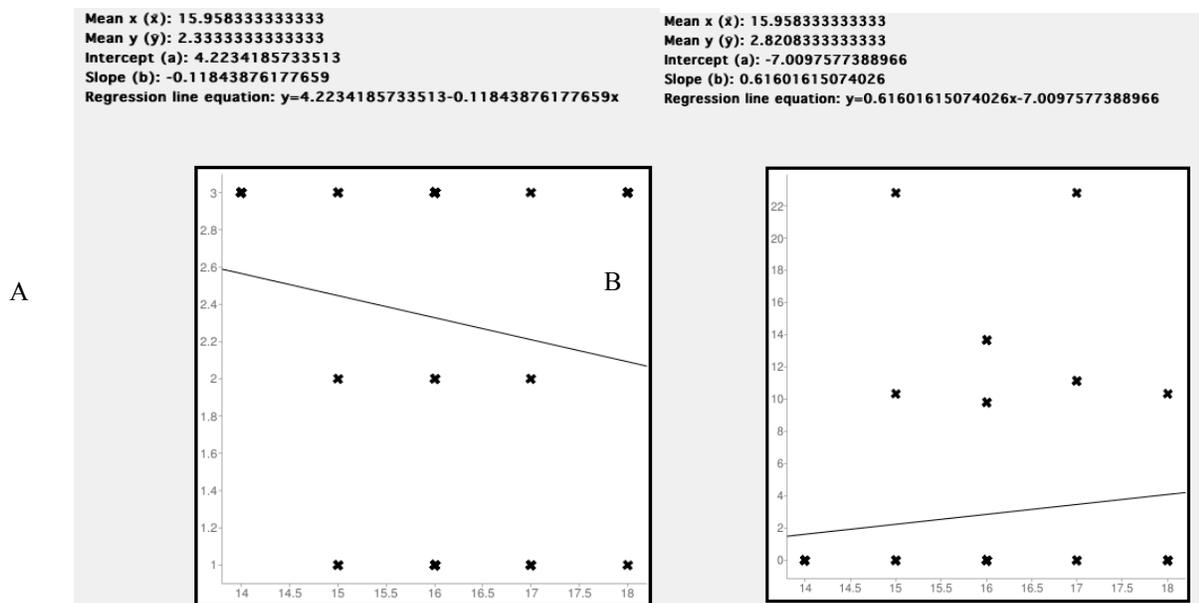


Figura 9. Se muestran las gráficas de la regresión lineal: **A.** Número de repetidos AC y la gravedad de cuadro clínico. **B.** Número de repetidos AC y niveles de HbF.

## DISCUSIÓN

### **Cuadro Clínico**

Se ha informado que la ACF tienen una elevada morbimortalidad en los pacientes a edad temprana, debido a las complicaciones vasculares que inducen daño orgánico múltiple y crónico (Azar and Wong. 2017). Cuando los niveles de HbF son mayores a 9% en estos pacientes, muestran un curso clínico menos grave (Lette and Bauer. 2016).

El cuadro clínico de los pacientes estudiados que tuvieron ACF y HbF elevada, estuvo de acuerdo con lo señalado, caracterizándose principalmente por menor número de crisis dolorosas e infecciones por año, menor grado de anemia y cuantificación normal de leucocitos, todos ellos presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), con respecto a los que tuvieron HbF baja. Estos últimos presentaron mayor número de transfusiones por año y complicaciones como: crisis convulsivas, necrosis ósea, síndrome torácico agudo y secuestro esplénico antes de cumplir un año de edad, estas características clínicas definen la gravedad del padecimiento. Como se observó las características clínicas y de laboratorio son influenciadas por los niveles sanguíneos de la HbF, debido a que la HbF es un potente inhibidor de la polimerización de la desoxihemoglobina S, lo anterior ha permitido desarrollar estrategias terapéuticas para preservar o reactivar la producción de HbF después del nacimiento, utilizando fármacos como; la hidroxiurea, la 5-azacitidina y ácidos grasos de cadena corta. El primero de ellos ha sido aprobado por la FDA en Estados Unidos de Norte América y tiene una amplia aceptación internacional (Azar, 2017; Lette, 2016; Ruiz, 2003).

Algunos pacientes con ACF tienen una predisposición genética para presentar persistencia hereditaria de HbF, sin embargo, esta condición es poco frecuente encontrándose en 1:188,000 individuos con ACF. En el presente estudio se encontró que el 20.83% de los pacientes presentaron niveles elevados de HbF. Este hallazgo es importante y puede estar relacionado a polimorfismos que afectan la expresión de los genes  $\beta$ -globínicos o del locus controlador de la producción de células F (Pace and Goodman. 2016).

## Diversidad alélica

Diversos estudios han mostrado que los STR desempeñan un papel relevante en la regulación de la expresión génica y en los diferentes fenotipos moleculares, por lo que nuestro objetivo fue estudiar los repetidos dinucleótidos (AC/TG)<sub>n</sub> localizados en el extremo 5' del gen β-globina y su asociación con la gravedad de ACF, encontramos 5 alelos de 14, 15, 16, 17 y 18 repetidos dinucleótidos (AC)<sub>n</sub>, con las siguientes frecuencias alélicas: 14 repetidos (14.6%), 15 repetidos (10.4%), 16 repetidos (52.1%), 17 repetidos (10.4%) y 18 repetidos (12.5%).

El alelo (AC)<sub>16</sub> se presentó la mayor frecuencia alélica, observándose en las tres poblaciones que se estudiaron, este alelo ha sido descrito por otros estudios (Poncz, 1983; Peñaloza, 2001), es el más comúnmente reportado. El alelo (AC)<sub>14</sub> fue descrito previamente en 5 poblaciones de México; 4 indígenas y una mestiza, en el mismo estudio los repetidos (AC)<sub>18</sub>, se encontraron solamente en población Purépecha (Peñaloza R, *et al.* 2001). Pero los alelos (AC)<sub>15</sub> y (AC)<sub>17</sub> no habían sido reportados previamente.

Con respecto a la variabilidad de esta región de repetidos (AC/TG)<sub>n</sub>, en la literatura no se ha descrito si existe variabilidad en el tamaño, pero se sugiere como una posible secuencia que contribuye a las señales que podrían mejorar la recombinación dentro del “*hot spot*”, junto con las repeticiones (ATTT)<sub>n</sub>, y (AT)<sub>x</sub>T<sub>y</sub> en la familia de genes β-globínicos (Treco, 1985; Diepstraten, 2018). Los diferentes estudios de los STR en regiones no codificantes consideran que estos proporcionan una alta inestabilidad caracterizada por pequeños cambios durante el crecimiento celular, son altamente multialélicos y pueden contribuir con más mutaciones *de novo* que cualquier otra clase de variantes estructurales en el genoma, lo que pudierá explicar la variabilidad en el tamaño de los repetidos (AC)<sub>n</sub> y la heterocigosidad observada de la población que estudiamos (62.5%), mostrando una variabilidad mayor a la informada, aunque los estudios realizados previamente no mencionan la heterocigosidad para los repetidos (AC)<sub>n</sub> (Poncz, 1983; Treco, 1985; Peñaloza R, 2001). Los hallazgos del estudio, muestra que los repetidos dinucleótidos (AC)<sub>n</sub> son multialélicos y son un depósito valioso de

variación génica, nos dan la oportunidad de conocer la semejanza y variabilidad entre individuos y poblaciones.

### **Repetidos (AC)<sub>n</sub> y Niveles de HbF**

La inestabilidad generada por STR también se ha encontrado asociada a mutaciones que causan entidades como  $\beta$ -talasemias, persistencia hereditaria de HbF y ACF (Chakraborty, 1997; Treco, 1985; Blattner, 2013; Ellegren 2014). Estudios realizados en individuos con  $\beta$ -talasemias, reportan la existencia de rearrreglos en la región  $\delta\beta$ -globina (región del *hot spot* para el *crossing over*), uno de estos rearrreglos son las deleciones causantes de  $\beta$ -talasemias con incremento de HbF, en dicha región se encuentran secuencias determinantes que actúan en *cis* para la expresión de los genes  $\gamma$ -globinas (Blattner A, 2013; Lettre G, 2016), las deleciones no tienen un tamaño específico y se ha reportado tamaños variables, nuestro interés fue conocer si el tamaño de los repetidos (AC)<sub>n</sub> que se encuentra en esta región se asociaban a los niveles de HbF en pacientes con ACF.

En el presente estudio encontramos 5 pacientes con ACF y elevación de HbF, para el análisis sólo tomamos a 21 paciente no relacionados, el promedio de HbF fue  $13.5\pm 5$  y el número de repetidos (AC)<sub>n</sub> en estos pacientes fueron; 15,16,17 y 18, el más frecuentemente observado en paciente con ACF y elevación de HbF, fue (AC)<sub>16</sub>, pero no hubo significancia estadística el coeficiente de correlación (r)= 0.1181, pero también debe tomarse en cuenta que (AC)<sub>16</sub> es el alelo más común reportado en todas las poblaciones estudiadas (Poncz, 1983; Treco, 1985; Peñaloza R, 2001), otro dato que llama la atención fue que el alelo (AC)<sub>14</sub> fue el más frecuente en los pacientes con un fenotipo grave de ACF, pero tampoco resulto significativo estadísticamente, se obtuvo un coeficiente de correlación (r)= -0.1498, para el número de repetidos AC y la gravedad de cuadro clínico. En el presente estudio no encontramos una asociación entre el número de repetidos (AC)<sub>n</sub> y la gravedad de cuadro clínico en pacientes con ACF.

### **Limitaciones del estudio.**

Contamos con 24 pacientes que presentaban ACF, es una muestra pequeña y limita la significancia estadística de los resultados, pero no fue una limitante para encontrar diferencias estadísticas significativas con respecto a los hallazgos clínicos, entre ellos la frecuencia de HbF elevada en nuestra población, ya que juega un papel determinante al disminuir la morbimortalidad de los pacientes (Lette G, *et al.* 2016).

Con respecto a la asociación de la HbF y los repetidos (AC)<sub>n</sub>, debemos considerar que la variabilidad de los niveles es heterogénea y que es el resultado de interacciones complejas, se han descrito varias determinantes genéticas, entre ellos los polimorfismos, en particular las variantes de los repetidos (TG)<sub>n</sub>(CG)<sub>n</sub>, en la región IVSII del gen  $\gamma$ -globina, así como los repetidos (AT)<sub>x</sub>N12(AT), localizados en el sitio eritroide específico 5'HS2, que se encuentran dentro del locus de la región control (LCR) (Pace, Goodman. 2016; Moumni, *et al.* 2016). También se han identificado variantes polimórficas en el promotor de *UGT1A1* (Habara A, Steninberg M. 2016) y se ha descrito nuevas variantes de nucleótido único en el segundo intrón del gen *BCL11A* y en cuatro genes reportados como genes candidatos (*SPARC*, *GJC1*, *EFTUD2* y *JAZF1*), relacionados con la expresión de la HbF, así como otros mecanismos que regulan de forma negativa la expresión, entre ellos, las *STAT3* que se une a la región 5' no traducida del gen  $\gamma$ -globina (Azar and Wong. 2017). Esto significa que en nuestra población se requieren diversos estudios para identificar la causa o causas de la elevación en la HbF, ya que no se relacionan con el número de repetidos (AC)<sub>n</sub> del extremo 5' del gen  $\beta$ -globina.

## CONCLUSIONES.

- Se corroboró que la presencia de niveles elevados de HbF en pacientes con ACF, es un factor benéfico que mejora el cuadro clínico, principalmente disminuye la frecuencia y duración de crisis dolorosas lo que reduce el número de hospitalizaciones, baja la frecuencia de infecciones e incrementa la hemoglobina reduciendo la severidad de la anemia.
- Encontramos una mayor frecuencia de persistencia de HbF en el grupo de pacientes de Guerrero comparada con lo reportado en la literatura.
- Se observó una mayor variabilidad de la región de repetidos (AC/GT) del extremo 5' del gen  $\beta$ -globina, con respecto a los reportado anteriormente.
- Se observó que los repetidos (AC)<sub>n</sub>, son multialélicos, encontrándose una heterocigosidad del 62.5%.
- No encontramos asociación entre el número de repetidos (AC/GT) y el nivel de hemoglobina fetal.

## Bibliografia.

- Antonarakis SE, Boehm CD, Giardinia PJV, Kazazian HH. (1982). Non-random association of polymorphic restriction sites in the  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79(1):137–141.
- Azar S and Wong TE (2017). Sickle Cell Disease. A Brief Update. *Med Clin N Am*. 101(2);375–393
- Bagshaw Andrew T.M. (2017). Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome Biol Evol*. 9(9):2428–2443. doi:10.1093/gbe/evx164.
- Blattner A, Brunner A, Ludin K, Hergersberg M, Herklotz R. (2013). Detection of germline rearrangements in patients with  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia using high resolution array CGH. *Blood Cells Mol Dis*. 51(1):39–47
- Charkraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R. (1997). Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(3):11916–11921
- Chakravarti A, Buetow KH, Antonarakis SE, aber PG, Boehm CD, Kazazian HH. (1984). Nonuniform recombination within the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Am J Hum Genet*. 36(6):1239-1258.
- Chakravarti, A, Elbein, S C., Permutt, M A. (1986). Evidence for increased recombination near the human insulin gene: implication for disease association studies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83(11):1045–104.
- Craig BJE, Rochette J, Sampietro M, Wilkie AOM, Barnetson R, Hatton CRS, Demenais F, Thein SL. (1997). Genetic Heterogeneity in Heterocellular Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Blood* 90(1):428-434
- Crossley M, Orkin SH. (1993). Regulation of  $\beta$ -globin locus. *Ocurrent Opin Genes Dev*. 3(2):232-237.
- Diepstraten ST, Hart AH, (2018). Modelling human haemoglobin switching. *Blood Review*. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.06.001>
- Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 5(6):435–445.
- Fisher-Lindahl K (1991). His and hers recombinational hot-spots. *Trends Genet*. 7(9):273–276.

- Galka-Marciniak P, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. (2012). Triplet repeats in transcripts: structural insights into RNA toxicity. *Biol Chem.* 393(11):1299–1315.
- Gendrel CG, Boulet A, Dutreix M. (2000). (CA/GT)(n) microsatellites affect homologous recombination during yeast meiosis. *Genes Dev.* 14(10):1261–1268.
- Gibson G. (2012). Rare and common variants: Twenty arguments. *Nat Rev Genet.* 3(2):135-45. doi: 10.1038/nrg3118.
- Gymrek M, Willems T, Guilmatre A, Zeng H, Markus B, Stoyan Georgiev S, Daly MJ, Alkes L, (2016). Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. *Nat. Genet.* 48(1):22-29. doi: 10.1038/ng.3461.
- Gymrek M. (2017). Genomic view of short tandem repeats. *Curr Opin Genet Dev.* 44:9-16. doi: 10.1016/j.gde.2017.01.012.
- Gymrek M, Willems T, Erlich Y, Reich D. (2017). A framework to interpret short tandem repeat variation in humans. *bioRxiv.* doi:10.1101/092734.
- Habara A, Steninberg M. (2016). Genetic basic of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 241(7):689-696
- Hefferon TW, Groman JD, Yurk CE, Cutting GR. (2004). A variable dinucleotide repeat in the CFTR gene contributes to phenotype diversity by forming RNA secondary structures that alter splicing. *Proc Natl Acad Sci USA,* 101(10):3504-3509.
- Holoch D, Moazed D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet.* 16(2):71–84.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409 (6822):860-921.
- Lette G, Bauer DE. (2016). Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. *Lancet.* 387(10037):2554-2564
- Longdon SD, Kaufman RE (1998). Gamma-globin promoter elements required for interaction with globin enhancers. *Blood.* 91(1): 309-318.
- Makani J, Williams TN, Marsh K.(2007). Sickle cell disease in Africa: burden and research priorities. *Ann Trop Med Parasitol.* 101(1):3–14.
- Mirkin SM. (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *Nature.* 447(7147):932-940.
- Mirkin SM. (2008). Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979–1989). *Front Biosci.* 13(1):1064–1071.

- Modell B and Darlison M (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin WHO*. 86(6):417-496.
- Moumni I, Mustapha MB, Mansour IB, Zaroï A, Douzi K, Sassi S, Chaouachi D and *et al.* (2016). Fetal hemoglobin in Tunisian Sickle Cell Disease Patient: relationship with Polymorphic Sequences Cis to the  $\beta$ -globin gene. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 32(1):114-119.
- Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, Donnelly PA. (2005). Fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science*. 310(5746):321-324.
- Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean GA. (2008). A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nature Genet*. 40(9):1124-1129.
- Modell B and Darlison M (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin WHO*. 86(6):417-496.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. Sickle Cell Anemia, MIM Number: #60390. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. World Wide Web URL: <https://www.omim.org/entry/603903#>
- Paigen K, Petkov P. (2010). Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet*. 11(3):221-233.
- Pace BS, Goodman S. (2016), Sickle cell disease severity: an introduction. *Exp Biol Med*. 241(7):677-678.
- Pearson CE. (2011). Repeat Associated Non-ATG Translation Initiation: One DNA, Two Transcripts, Seven Reading Frames. Potentially Nine Toxic Entities. *PLoS Genet*. 7(3): e1002018. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002018>.
- Peñaloza R, García-Carrancá A, Ceras T, Alvarez C, Berumen J Zavala C and Salamanca F. (1995). Frequency of haplotypes in beta globin gene cluster in a selected sample of the Mexican population. *Am J Hum Biol*. 7(1):45-49
- Peñaloza R, Salamanca F: Las Hemoglobinopatías y su repercusión. *Gac Med Mex* 1996; 132(4):337-338.
- Peñaloza R, Delgado P, Arenas D, Barrientos C, Buentello L, Salamanca F. (2001). (AC)<sub>n</sub> dinucleotide repeat polymorphism in 5' beta-globin gene in native and Mestizo Mexican population. *Hum Biol*. 73 (6): 86 -90.

- Peñaloza R, Buentello-Malo L, Hernandez-Maya MA, Nieva-García B, Lisker-Yurkowitzki R, Salamanca-Gómez F. (2008). Frecuencia de Hemoglobina “S” en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en Salud Pública. *Rev Salud Pública*. 50(4):325-329.
- Poncz ME, Schwartz E, Ballentine M, Surrey S. (1983). Nucleotide sequence analysis of the delta beta-globin region humans. *J Biol Chem*. 258(19):11599-609.
- Powars DR, Meiselman HJ, Fisher TC, Hiti A, Johnson C. (1994). Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 16(1):55-61.
- Press MO, Carlson KD, and Queitsch C. (2014). The overdue promise of short tandem repeat variation for heritability. *Trends Genet*. 30(11):504-512
- Quilez J, Guilmatre A, Garg P, Highnam G, Gymrek M, Erlich Y, Joshi RS, Mittelman D, Sharp AJ (2016). Polymorphic tandem repeats within gene promoters act as modifiers of gene expression and DNA methylation in humans. *Nucleic Acids Res*. 44(8):3750-3762. doi: 10.1093/nar/gkw219.
- Rachelle A, Smith P, Joy Ho JB, Clegg JR, Swee LT. (1998). Recombination breakpoints in the human  $\beta$ -globin gene clusters. *Blood*. 92(11):4415-4421.
- Ruiz CED, Hernández MA, Nieva GB, García AJ, Hernández CC, Salamanca GF, Peñaloza ERI (2003). Anemia de células falciformes y niveles de hemoglobina fetal. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 41(4):299-303.
- Sun JX, Helgason A, Masson G, Ebenesersdóttir SS, Li H, Mallick S, Gnerre S, Patterson N, Kong A, Reich D, et al. (2012). A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet*, 44(10):1161-1165.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 1(6):397-400.
- Treco D, Thomas B, Arnheim N. (1985). Recombination hot spot in the human  $\beta$ -globin gene cluster: Meiotic recombination of human DNA fragments in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 5(8):2029-2038.
- Wang G, Vasquez KM. (2007). Z-DNA, An active element in the genome. *Front Biosci*. 12(1):4424-443

Wong B, Chen S, Kwon JA, Rich A. (2007). Characterization of Z-DNA as a nucleosome-boundary element in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(7):2229–2234.

Xu X, Peng M, Fan Z. (2000). The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet*. 24(4):396-399.

**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 por año \_\_\_\_\_

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 abdominal.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tomografías

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

---

**ANEXO 2**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

Para el Protocolo: **“Variación genética de dinucleótidos (AC)<sub>n</sub> del extremo 5’ del gen beta globina y su relación con anemia de células falciformes”**.

**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.

El propósito del estudio tiene solo fines científicos, los resultados servirán para aportar nuevos conocimientos sobre el comportamiento evolutivo y variabilidad de los repetidos AC en es extremo 5’ del gen beta globina en individuos portadores y enfermos de Anemia de células falciformes, así como el comportamiento en los procesos hereditarios.

**2. Procedimientos.**

Su participación consiste 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 toma de muestra de sangre en este estudio implica 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.

**3. 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.

**4. Participación / suspensión.**

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

**5. Consentimiento.**

Una persona responsable de este estudio le ha explicado los pormenores del mismo y los riesgos y beneficios potenciales que esté implica. Usted ha 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 500µl de EDTA al 0.5% (pH 8).
- 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 ml de solución de lisis de eritrocitos (Tris Hcl 10 mM, ph 7.8, MgCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 10 mM), 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 pastilla se encuentre blanca.
- Resuspender la pastilla en 886 µl de NaCl a 5mM, agitar vigorosamente
- Agregar a cada tubo 46 µl de SDS al 10%, agitar vigorosamente.
- Adicionar 308 µl de NaCl saturado a cada tubo, agitar vigorosamente.
- Centrifugar 15 min. a 13 Krpm, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
- Realizar al menos dos extracciones fenólicas (fenol-cloroformo-isoamílico; 25:24:1), después se trabaja con la fase acuosa.
- Precipitar el DNA con etanol 100% agita suavemente.
- Centrifugar 5 min. a 13 Krpm, eliminar el sobrenadante y lavar dos veces la pastilla con etanol al 70%.
- Resuspender la pastilla de DNA en 200 a 500 l de agua desionizada.
- Se 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 µg de DNA/ml
- Pureza se obtiene:  $\text{absorbancia a } 260 \text{ nm} / \text{absorbancia } 280 \text{ nm} = \text{óptima} = 1.8.$

## Anexo 4

### Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

1. Se seleccionó la región para amplificar por medio de la elección de oligonucleótidos de inicio (“*primers*”), específicos de la región de repetidos AC en el extremo 5’ de gen  $\beta$ -globina:

RAC1 5’ACTGGAGTAAAGGAAATGGACC 3’  
RAC2 5’AATTTGGTTATGGTCAGAGC 3’.

2. Material necesarios:

- Agua desionizada.
- $MgCl_2$  50mM.
- Solución amortiguadora 10x para la amplificación (200 mM tris – HCl pH 8.4 y 500mM KCl).
- Mezcla de los cuatro dideoxinucleósidos (dATP, dCTP, DGTP y dTTP) a una concentración de 2mM
- Un par de primer a 20 pmol/ $\mu$ l.
- DNA genómico 50 ng/ $\mu$ l.
- *Taq* DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ l.
- Termociclador.
- Material plástico, tubos eppendorf de 500 $\mu$ l y puntas desechables.
- Micropipetas.
- Microcentrífugas.

3. Procedimientos:

- Se realizará una mezcla con todos los reactivos como se describe a continuación:

<b>I.</b> Sol. Amortiguadora 10x	2.5 $\mu$ l
<b>II.</b> dNTPs 200mM	2.5 $\mu$ l
<b>III.</b> RAC1 20 pMol	1.0 $\mu$ l
<b>IV.</b> RAC2 20 pMol	1.0 $\mu$ l
<b>V.</b> <i>Taq</i> polimerasa	1.5 U
<b>VI.</b> H <sub>2</sub> O (bidestilada esterilizada)	15.7 $\mu$ l
<b>VII.</b> DNA 200 ng	1.0 $\mu$ l

Se colocan los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C (5 min), seguida de 32 ciclos de 94°C (30 seg), 55°C (30 seg) y 72°C (45 seg), y una extensión final a 72°C por 10 min.

## ANEXO 5

### Electroforesis en geles de agarosa.

#### 1. Material

- Solución amortiguadora TBE 1x preparada a partir del *stock* 5x (Tris borato 0.089M, Ácido bórico 0.089M y EDTA 0.003M).
- Bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml.
- Agarosa grado molecular.
- Marcador de peso molecular de 123 pb.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Fuente de poder.

#### 2. Procedimiento

- Se prepara gel de agarosa al 1% (0.5 gr. Agarosa en 50 ml de solución amortiguadora).
- La mezcla se calienta aproximadamente a 90°C por 45 min.
- Una vez disuelta el agarosa completamente se agrega 2.5 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 2 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 1µl de la muestra mezclada con colorante (azul bromofenol).
- Se aplica una corriente de 100 volts por aproximadamente 20 min.
- Posteriormente se transilumina con una lámpara de luz UV y se toman fotografías mediante el programa digital.

## ANEXO 6

### Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

#### Material.

- Solución amortiguadora de electroforesis al 5x antes descrita.
- Solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%
- TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletildiamina).
- Solución amortiguadora de carga 1x.
- Persulfato de amonio al 10%.
- Marcadores de peso molecular.
- Solución de bromuro de etidio 1µg/ml.
- Cámara vertical de electroforesis para geles de acrilamida.
- Fuente de poder.

#### Procedimiento.

- Limpiar los vidrios cuidadosamente utilizando dextrán, enjuagar con agua y dar una segunda limpieza con etanol.
- Colocar los separadores entre los vidrios procurando que estén alineados con los extremos.
- Sellar con cinta adhesiva los extremos y la parte inferior de los vidrios.
- Formar la mezcla para un gel de acrilamida al 8% de la siguiente manera:

1. Poliacrilamida al 30%	13.6 ml.
2. TBE al 5x	10.0 ml.
3. Persulfato de amonio	0.4 ml.
4. TEMED	30.0 µl
5. Agua desionizada	25.9 ml.
6. Volumen total	50.0 ml.
- Con la ayuda de una jeringa verter la solución entre los vidrios e insertar el peine, dejar polimerizar el gel a temperatura ambiente por 30 min.
- Posteriormente quitar el peine y la cinta adhesiva.
- Colocar los vidrios en la con solución amortiguadora TBE 1x. Lavar los pozos con la misma solución y retirar las burbujas del interior de los pozos.
- Tomar 10 µl de los productos de PCR y agregar 5 µl de colorante con formamida (98% Formamida, 10 mM de EDTA, 0.1% de azul de bromofenol y 0.01 de cianol xileno). Colocar las muestras dentro de los pozos utilizando una micropipeta.
- Colocar los electrodos y correr el gel a 500 volts por 6 hrs.
- Apagar la fuente y desmontar los vidrios de la cámara de electroforesis. Separar uno de los vidrios cuidadosamente quedando el gel adherido a uno de los dos vidrios.
- Sumergir el gel por 10 min. en un recipiente con 200 ml de solución amortiguadora al 1x y 50 µl de bromuro de etidio.
- Con una mica manipular el gel y ponerlo en el transiluminador de UV, para observarlo y fotografiarlo.

## ANEXO 7

### Técnica de reacción de secuencia automática a partir de geles de poliacrilamida.

#### 1. Material:

- Sistema personal de secuenciación.
- Amortiguador amarillo QX1
- Etanol al 100%.
- Baño María.
- Amortiguador de difusión: Acetato de amonio 0.5 M, acetato de Mg 10 mM, EDTA 1mM pH8.0 y SDS 0.1.
- Columnas con filtro.

#### 2. Procedimientos:

- Iniciar el programa de amplificación por PCR, utilizando *primers* antes descritos.
  - Correr los productos amplificados en gel de acrilamida.
  - Corte el gel que contenga la banda con bisturí nuevo. Minimizar el tamaño del fragmento para quitar el exceso de poliacrilamida. Pasar por una jeringa.
  - Pesar el gel y agregue 1 a 2 volúmenes de amortiguador de difusión (100-200 ml para 100mg).
  - Incubar a 50°C por 30 min.
  - Centrifugar a 13 krpm por un minuto.
  - Pasar el sobrenadante por una columna para quitar cualquier residuo de poliacrilamida y coleccionar la solución en un tubo nuevo.
  - Medir el volumen recuperado y agregar amortiguador QX1. Si el tamaño del fragmento es <100 pb, agregar 6 volúmenes, si es mayor agregar 3 volúmenes.
  - Revisar que el color de la muestra sea amarillo: Si es naranja o púrpura, agregue 10ul de acetato de sodio 3M pH 5.0 y mezclar. El color debe tornarse amarillo. La absorción del DNA a las partículas QIAEXII sólo es eficiente a pH <7.5.
  - Resuspender en QIAEXII con vortex por 30 segundos.
  - Agregar 10 ul de QIAEXII y mezcle. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Vortex cada 2 min. para mantener el QIAEXII en suspensión.
  - Centrifugar por 30 seg. A 13 Krpm y eliminar el sobrenadante.
  - Lavar la pastilla dos veces con 500ul de amortiguador PE 10 min a 13krpm.
  - Secar la pastilla a 40°C. No hacerlo al vacío puede sobrecargarse y disminuye la eficiencia de elusión.
  - Agregar 20 ul de Tris HCL 10mM pH8.5 o H<sub>2</sub>O desionizada esterilizada. No hacerlo al vacío puede sobrecargarse y disminuye la eficiencia de elusión.
  - Suspender la pastilla y dejar a temperatura ambiente por 5 min.
- La eficiencia de elusión depende del pH. La eficiencia máxima se alcanza entre pH7 y 8.5. Cuando se usa agua para eluir, asegurarse que tenga el pH óptimo indicado. Almacenar a -20°C ya que pueden degradarse en ausencia de amortiguador. El DNA purificado también puede ser eluido en amortiguador TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8.0), excepto que el EDTA puede inhibir reacciones enzimáticas subsecuentes.
- Centrifugar a 13krpm por 30 seg y transferir el sobrenadante a un tubo limpio, ya que contienen el DNA puro.
  - Opcional, repetir el paso 13 y 14 y combinar los eluidos. Un segundo paso de elusión incrementa la producción aproximada 10 a 15%.

*Nota.* En todos los pasos centrifugue a velocidad máxima de 13 krpm.