

EVALUACIÓN MEDIANTE SNP'S DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON
LA SEVERIDAD DE LA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES

MARÍA ALEJANDRA LIZARRALDE IRAGORRI



UNIVERSIDAD DEL VALLE.

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

2014

UNIVERSIDAD DEL VALLE.



EVALUACIÓN MEDIANTE SNP'S DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON
LA SEVERIDAD DE LA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES

MARIA ALEJANDRA LIZARRALDE IRAGORRI

DIRECTOR

GUILLERMO BARRETO PhD.

CODIRECTOR

CRISTIAN FONG BSc.

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

MARZO 31 DE 2014.

Nota de aprobación

El trabajo de investigación titulado: EVALUACIÓN MEDIANTE SNP'S DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON LA SEVERIDAD DE LA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES, realizado por la estudiante MARÍA ALEJANDRA LIZARRALDE IRAGORRI, para optar por el título de Maestría, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

Guillermo Barreto Rodríguez, M.Sc., Ph.D.

Director

Cristian Javier Fong Reales, B.Sc, Cand. Ph.D.

Codirector

Jurado

A mi Hermosa Familia y mi Angelito en el cielo....

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi familia y mis amigos, Gracias por ser mi apoyo incondicional,

A mis profesores y mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular Humana, Gracias, tanto sus enseñanzas como su guía fue muy importante para lograr esta meta,

A los pacientes y las distintas instituciones que hicieron parte fundamental para el desarrollo de esta investigación: Hospital San Jerónimo y Laboratorios ABO de Montería, Hospital Casa del Niño y Laboratorio Louis Pasteur en Cartagena, al Hospital Universitario del Valle, Hospital infantil Club Noel y FUNCANCER en Cali, al Hospital Universitario de Buenaventura, la Universidad del Valle y COLCIENCIAS por su apoyo financiero, Mil Gracias, sin su colaboración nada de esto hubiese sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	7
ANTECEDENTES	11
PAPEL DE LA HEMOGLOBINA FETAL	13
REGULACIÓN GÉNICA DE LAS GLOBINAS	13
FACTORES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA HEMOGLOBINA FETAL.....	14
POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO: SNPs	15
PROMOTOR DE Γ -GLOBINA Y SUS REGULADORES.....	16
REGIÓN INTERGÉNICA HBS1L-MYB	21
BCL11A	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS.....	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
METODOLOGÍA	27
CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA.....	27
CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL	27
EXTRACCIÓN DE ADN	28
GENOTIPIFICACIÓN LOCUS B-GLOBINA	29
SECUENCIACIÓN REGIÓN PROMOTORA Γ^G	31
GENOTIPIFICACIÓN DE SNP'S POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE SNAPSHOT MULTIPLEX	34
GENOTIPIFICACIÓN POR MEDIO DE PCR EN TIEMPO REAL	38
ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
RESULTADOS.....	41
CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL	41
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN Γ^G -GLOBINA.....	42
GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs MEDIANTE LA TÉCNICA DE SNAPSHOT Y RT-PCR	52
DISCUSION	60
REGIÓN PROMOTORA DEL GEN Γ^G	61

GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs EN LA REGIÓN INTERGÉNICA HBS1L-MYB Y EL GEN BCL11A	67
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	89
ANEXO A	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 COMPOSICIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE HEMOGLOBINA Y LOS LOCI QUE EXPRESAN LAS SUBUNIDADES QUE LAS CONFORMAN (TOMADO DE WILBERG ET AL 2011).	14
FIGURA 2 ESQUEMA DEL PROMOTOR DEL GEN Γ -GLOBINA EN HUMANOS CON SUS POSIBLES FACTORES TRANSCRIPCIONALES (TOMADO DE POURFARZAD 2010).	17
FIGURA 3 DIAGNÓSTICO PARA LOS INDIVIDUOS SS, SA Y AA, UTILIZANDO LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN DDEI. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA 29:1 AL 8%. (IMAGEN TOMADA DE FONG 2007).....	31
FIGURA 4 SNP'S ENCONTRADOS EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN Γ^G -GLOBINA. LAS VARIANTES PREVIAMENTE REPORTADAS SE SEÑALAN EN COLOR AGUAMARINA MIENTRAS QUE LAS VARIANTES NUEVAS SE SEÑALAN CON MORADO AL IGUAL QUE LAS CAJAS ESTÁN SEÑALADAS POR RECTÁNGULOS....	43
FIGURA 5 COMPARACIÓN ENTRE EL %HbF Y EL SNP -309 EN INDIVIDUOS SANOS (AA) HOMOCIGOTOS PARA EL ALELO A Y PORTADORES DEL ALELO MUTADO G.	47
FIGURA 6 COMPARACIÓN ENTRE EL %HbF Y EL SNP -16 EN INDIVIDUOS SANOS (AA) HOMOCIGOTOS PARA EL ALELO C Y PORTADORES DEL ALELO MUTADO G.	47
FIGURA 7 EVALUACIÓN DEL LD DE LOS SNP'S DE LA REGIÓN PROMOTORA DE Γ^G -GLOBINA EN INDIVIDUOS CON ANEMIA FALCIFORME CON HbF ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA COLOMBIANA. EL GRADO DE DESEQUILIBRIO ES REPRESENTADO CON UN MATIZ DESDE BLANCO A ROJO INTENSO, SIENDO EL ROJO INDICATIVO DE LD Y EL BLANCO EVIDENCIA DE RECOMBINACIÓN.	48
FIGURA 8 EVALUACIÓN DEL LD DE LOS SNP'S DE LA REGIÓN PROMOTORA DE Γ -GLOBINA EN INDIVIDUOS SANOS CON HbF ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA COLOMBIANA. EL GRADO DE DESEQUILIBRIO ES REPRESENTADO CON UN MATIZ DESDE BLANCO A ROJO INTENSO, SIENDO EL ROJO INDICATIVO DE LD Y EL BLANCO EVIDENCIA DE RECOMBINACIÓN. EL COLOR AZUL INDICA AMBIGÜEDAD EN LA ESTIMACIÓN DEL LD.	49
FIGURA 9 MEDIAN JOINING NETWORK DE HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE Γ^G -GLOBINA DE INDIVIDUOS SANOS Y AFECTADOS CON HEMOGLOBINA FETAL ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA DE COLOMBIA. EL TAMAÑO DE LOS CÍRCULOS ES PROPORCIONAL A LA FRECUENCIA DEL HAPLOTIPO. EL NOMBRE DE LOS HAPLOTIPOS SE REPRESENTA EN LETRA ROJA MIENTRAS QUE LOS CAMBIOS NUCLEOTÍDICOS EN LETRA NEGRA.....	52
FIGURA 10 HISTOGRAMA DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS SNPs EVALUADOS POR MEDIO DE SNAPSHOT MULTIPLEX Y PCR EN TIEMPO REAL.	53
FIGURA 11 GENOTIPOS OBSERVADOS Y ESPERADOS PARA LOS CINCO SNPs QUE SE ENCUENTRAN EN EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG EN LOS INDIVIDUOS ENFERMOS Y SANOS. *Pop1: SS, Pop2: AA (1=A, 2=C, 3=G, 4=T).	55
FIGURA 12 PRUEBA DE ANDERSON-DARLING PARA EVALUAR LA NORMALIDAD DE LOS DATOS DE CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL A) SIN TRANSFORMAR, B) TRANSFORMADOS POR Box-Cox.	56

FIGURA 13 EVALUACIÓN DE IGUALDAD DE VARIANZAS POR MEDIO DE LAS PRUEBAS DE BARLETT Y LEVENE. .56	
FIGURA 14 EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE VARIANTES COMO EDAD Y SEXO CON LOS NIVELES DE HEMOGLOBINA FETAL EN INDIVIDUOS SANOS Y ENFERMOS POR MEDIO DE UN ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA A) INDIVIDUOS CONTROL Y B) INDIVIDUOS ENFERMOS.57	57
FIGURA 15 EVALUACIÓN DEL LD DE LOS SNP'S UBICADOS EN EL CROMOSOMA 2 Y 6 EN INDIVIDUOS SANOS Y ENFERMOS DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA DE COLOMBIA. EL GRADO DE DESEQUILIBRIO ES REPRESENTADO CON UN MATIZ DESDE BLANCO A ROJO INTENSO, SIENDO EL ROJO INDICATIVO DE LD Y EL BLANCO EVIDENCIA DE RECOMBINACIÓN.58	58
FIGURA 16 REGRESIÓN MÚLTIPLE A) INDIVIDUOS SANOS, B) INDIVIDUOS ENFERMOS, C) PRUEBA NORMALIDAD RESIDUALES INDIVIDUOS SANOS Y D) PRUEBA NORMALIDAD RESIDUALES INDIVIDUOS ENFERMOS.59	59

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 SECUENCIA DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR LOS SEGMENTOS FLANQUEANTES DE LOS SITIOS A EVALUAR.	29
TABLA 2 CEBADORES USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN Γ^G -GLOBINA	32
TABLA 3 CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN Γ^G -GLOBINA	32
TABLA 4 CONDICIONES PARA PCR-SECUENCIACIÓN PROMOTOR Γ^G -GLOBINA.	34
TABLA 5 CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR LOS SNPs rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs6929404 Y rs4671393 POR MEDIO DE LA TÉCNICA SNAPSHOT MULTIPLEX.	35
TABLA 6 CONDICIONES DE PCR MULTIPLEX PARA LOS rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054.....	36
TABLA 7 CONDICIONES DE PCR MULTIPLEX PARA LOS rs6929404 Y rs4671393.....	36
TABLA 8 CONDICIONES PCR- SNAPSHOT MULTIPLEX READY REACTION MIX.	38
TABLA 9 CONDICIONES PARA AMPLIFICACIÓN DEL rs11886868 UTILIZANDO EL MELT CALIBRATION KIT DE BIO-RAD.	39
TABLA 10. CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE HEMOGLOBINA FETAL EN INDIVIDUOS SANOS Y ENFERMOS.	42
TABLA 11 SNP'S ENCONTRADOS QUE HAN SIDO PREVIAMENTE REPORTADOS EN EL NCBI	43
TABLA 12 FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS SNP'S ENCONTRADOS EN INDIVIDUOS CON ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES CON HbF ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA COLOMBIANA.	44
TABLA 13 FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS SNP'S ENCONTRADOS EN INDIVIDUOS AA CON HbF ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA DE COLOMBIA	45
TABLA 14 FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS EN LOS INDIVIDUOS AFECTADOS Y SANOS CON HbF ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA COLOMBIANA	50
TABLA 15 COMPARACIÓN DE FRECUENCIA HAPLOTÍPICAS ENTRE INDIVIDUOS SS Y AA CON HbF ALTA Y BAJA DE LAS COSTAS PACÍFICA Y ATLÁNTICA DE COLOMBIA.	51
TABLA 16 FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS SIETE SNPs EVALUADOS POR MEDIO DE SNAPSHOT MULTIPLEX Y PCR EN TIEMPO REAL.....	53

RESUMEN

Los niveles altos de hemoglobina fetal (HbF) modulan de manera positiva los diferentes síntomas relacionados con la Anemia de Células Falciformes (enfermedad generada por una mutación en el sexto codón del gen de la β -globina), al inhibir la polimerización de la HbS, diluyendo su concentración intracelular, lo que disminuye la severidad de la enfermedad. El cómo es regulada este tipo de hemoglobina en edades adultas, ha sido el objetivo de muchas investigaciones en las cuáles se ha encontrado que la región promotora del gen γ^G , la región intergénica *HBS1L-MYB* y el gen *BCL11A* tienen marcadores genéticos asociados con la modulación de la HbF. Debido a la heterogeneidad de la población colombiana, se quiso establecer en el presente estudio cuáles de los marcadores genéticos reportados juegan un papel importante en la modulación de esta hemoglobina. Para ello se secuenció la región promotora del gen de γ^G , y se genotiparon siete SNPs (rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs6929404, rs4671393 y rs11886868) ubicados en la región intergénica *HBS1L-MYB* y el gen *BCL11A* en población sana y enferma de las costas colombianas, por medio de técnicas como el SNaPShot y la RT-PCR. Se encontró que en la región promotora de γ^G los SNP's evaluados en los individuos con drepanocitosis no se relacionaron con los niveles de HbF, mientras que para los individuos sanos los SNP's -309 y -16 si mostraron relación con los niveles de ésta hemoglobina. En cuanto a los SNPs evaluados en las otras dos regiones, sólo el rs28384512 se asoció con los niveles de HbF, siendo en los individuos sanos el alelo ancestral (A) y no el alterno (G) quien está modulando la asociación con los niveles de hemoglobina fetal alta, ocurriendo lo contrario con los individuos con anemia falciforme. Estos resultados indican que la población colombiana puede presentar una batería propia de SNPs implicados en la regulación de la hemoglobina fetal debido a la heterogeneidad de la población, sin embargo, se hace necesario ampliar el tamaño de la muestra para futuros estudios.

PALABRAS CLAVE: Asociación, Hemoglobina Fetal, Promotor, QTLs, Regulación.

ABSTRACT

High levels of fetal hemoglobin (HbF) positively modulate the various symptoms associated with Sickle Cell Disease (disease caused by a mutation in the sixth codon of the β -globin gene), because it inhibits the polymerization of HbS, diluting its intracellular concentration, decreasing the severity of disease. How this type of hemoglobin is regulated in adulthood, has been the target of many investigations in which was found that the promoter region of the γ^G gene, the intergenic region *HBS1L* -*MYB* and *BCL11A* gene have genetic markers associated with the modulation of HbF. Due to the heterogeneity of the Colombian population, the aim was to establish which of the reported genetic markers play an important role in the modulation of this hemoglobin. To do that, the promoter region of the gene γ^G was sequenced and seven SNPs (rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs6929404, rs4671393 and rs11886868) located in the intergenic region *HBS1L* -*MYB* and *BCL11A* gene in healthy and sick people of the Colombian coast was genotyped, through techniques such as SNaPshot and RT -PCR. It was found that the SNPs evaluated in the promoter region in individuals with sickle cell disease were not associated with HbF levels, whereas in healthy individuals the SNPs -309 and -16 were related with this characteristic. Regarding the SNPs evaluated in the other two regions, only rs28384512 was associated with HbF levels, which in healthy individuals the ancestral allele (A) not the alternate (G) may be modulating the association with high levels of fetal hemoglobin, occurring otherwise to individuals with sickle cell anemia. These results indicate that the Colombian population has its own battery of SNPs involved in the regulation of fetal hemoglobin due to the heterogeneity of the population; however, it is necessary to expand the sample size for future investigations.

KEY WORDS: Association, Fetal hemoglobin, Promoter, QTLs, Regulation.

INTRODUCCIÓN

La anemia falciforme es una enfermedad autosómica recesiva que afecta principalmente a los afrodescendientes, causada por una mutación puntual en el sexto codón del gen de la β -globina, en donde una Adenina cambia por una Timina (GAC $\rightarrow$ GTC), lo que implica un

cambio en la producción de aminoácidos (Ingram, 1957), y como consecuencia una serie de cambios en los eritrocitos tanto de forma como de propiedades.

El primer cambio evidente es su conformación, pues los glóbulos rojos que normalmente son bicóncavos, pasan a tener una forma de hoz. En cuanto a las características intrínsecas de los eritrocitos, se observa un incremento en su viscosidad y así mismo su flexibilidad se ve disminuida, características que hacen que los hematíes sufran hemólisis y por lo tanto, se produzca la anemia. Sin embargo, éstos no son los únicos efectos que el cambio de aminoácido causa en los eritrocitos, también se generan efectos pleiotrópicos como la adherencia de estas células a las paredes de las venas, la deshidratación de los hematíes, y un estado irreversible de las células en forma de hoz cuando la tensión del oxígeno es reducida, creando principalmente un taponamiento en las venas que al final desencadena una serie de síntomas que entre los pacientes puede variar desde una crisis dolorosa, dactilitis, daño de órganos hasta una isquemia o incluso, un derrame cerebral. Adicionalmente, esta patología presenta una alta tasa de morbilidad, especialmente en los tres primeros años de vida, cuando no se realiza un diagnóstico y tratamiento rápido y adecuado de las principales complicaciones, pues los menores son más vulnerables a adquirir infecciones pulmonares (Provan y Gribben 2010).

En la población colombiana, sobre todo en las regiones costeras, se ha podido observar la existencia de frecuencias altas de hemoglobina S (HbS). En la Costa Pacífica se han reportado frecuencias hasta del 18% (Jaramillo *et al* 1997), mientras que en la Costa Atlántica se ha podido observar una frecuencia del 10%, específicamente en Cartagena (Silva *et al* 1998). Debido a que la anemia falciforme tiene un amplio rango de síntomas su detección temprana no es fácil, además, en estas regiones no existen programas de diagnóstico neonatal instaurados, así que solo hasta la manifestación de los primeros síntomas se detecta la presencia de la mutación.

A pesar que esta enfermedad es considerada monogénica la expresión de su sintomatología depende de varios factores. Ésta interacción entre la mutación y el resto del genoma explicaría porque se pueden presentar individuos con la mutación y no presentar síntomas.

Entre los factores que se han determinado como moduladores de la enfermedad están: la edad, el género, la co-herencia de la α -talasemia, la presencia de alguno de los haplotipos típicos para esta patología, o la hemoglobina fetal (HbF), siendo este último un factor que disminuye la severidad de la enfermedad.

Los humanos presentan una compleja dinámica en la expresión de las globinas, presentándose tres tipos diferentes durante el desarrollo ontogénico del individuo (Solovieff et al 2009). La hemoglobina fetal se presenta durante todo este período y se deja de sintetizar antes del nacimiento. Al nacer, un alto porcentaje de la hemoglobina en los humanos es de este tipo, la cual poco a poco se va reemplazando con la hemoglobina adulta (HbA), siendo los niveles de la HbF menos del 1% a los seis meses de edad. Sin embargo, existen casos en donde el mecanismo de regulación falla y la HbF puede seguir produciéndose aún en estado adulto (Edoh et al 2006). El mecanismo responsable para este patrón de regulación de la expresión génica, conocido como “globin switching”, ha sido objeto de muchas investigaciones durante los últimos 30 años, sobre todo por su importancia en la modulación benéfica que tiene éste gen en los individuos con anemia falciforme, ya que la alta expresión del gen γ -globina se ve reflejado en niveles de HbF entre 12-20% (Wood et al 1975), reduciendo la polimerización de la hemoglobina en los eritrocitos y por tanto su deformación, lo que aminora la gravedad de los síntomas si se compara con aquellos pacientes que tienen niveles bajos de HbF (Pourfarzad 2010).

Esta asociación ha llevado a indagar en el mecanismo de regulación de la HbF, ya que se pueden identificar alelos que estén asociados a la producción de la misma y ser estos marcadores moleculares, quienes indiquen el posible desarrollo de la enfermedad. A través de estudios de asociación de genoma amplio (GWAS), se han identificado regiones que estarían asociadas con la regulación de la HbF en la región controladora del locus (LCR) de la β -globina, el cromosoma X, las regiones promotoras de los genes que expresan la γ globina, la región intergénica *HBS1L-MYB* en el cromosoma seis y el gen *BCL11A* en el cromosoma dos (Azevedo et al. 2006, Chang 1995). La ausencia o presencia de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) en estas regiones, pueden ser buenos

candidatos como marcadores de severidad para la anemia de células falciformes (Solovieff et al. 2010; Lettre et al. 2008; Galarneau et al. 2010).

Del mismo modo, cambios en la secuencia promotora de los genes que componen la HbF podrían indicar alteraciones en la expresión de la misma. Estos cambios pueden ocasionar alteraciones en secuencias que son punto de interacción con factores de regulación (elementos *trans*) tanto positivos como negativos (Barbosa et al. 2010). Estos factores interactúan el uno con el otro formando complejos multiméricos que resultan en cambios en la estructura de la cromatina para permitir la formación/activación del extremo 5' del gen y por lo tanto modular la expresión de la HbF en los adultos (Pourfarzad 2010).

Es necesario tener en cuenta que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) en la región promotora de γ^G -globina pueden tener un papel muy importante en la modulación de los síntomas de la anemia falciforme, debido a que se ha demostrado que estos afectan la regulación de la expresión de este gen (Hoppe et al. 2004). Un ejemplo de ello es el polimorfismo *XmnI* en el gen γ^G -globina, el cual está asociado con el aumento de la producción de la HbF, lo que trae consigo una disminución de la severidad del desorden, tal como es reportado en pacientes de Arabia Saudita y la India, en los cuales la sintomatología es muy leve si presentan este polimorfismo (Ahmed & Anwar 2005). Igualmente, QTLs ubicados en otras partes del genoma (Xp 22,2-22,3; 6q23 y 8q), pueden desempeñar un papel en la regulación de los niveles de HbF. Estudios recientes de asociación han sugerido que una variante entre los genes *HBS1L* y *MYB* están implicados con los QTLs que regulan la HbF en la región 6q23. Del mismo modo variantes en el locus *BCL11A* del cromosoma dos pueden inducir a la persistencia de la hemoglobina fetal en estado adulto, moderando el fenotipo de estos pacientes (Uda 2007).

Por ello, es necesario realizar un barrido en la región promotora del gen γ^G y evaluar los SNPs reportados para los sitios *HBS1L-MYB* y *BCL11A* en los pacientes colombianos, ya que las poblaciones del país son el resultado de múltiples migraciones provenientes de distintas regiones de África (Delgado-Burbano 2006, Salas et al. 2008, Stefflova et al. 2010), como también el resultado de procesos de mestizaje con indígenas, europeos y

mestizos (Stefflova et al. 2010, Rondón et al. 2008), lo cual podría dar resultados diferentes a los obtenidos en otras poblaciones ya estudiadas.

Por lo tanto, debido al impacto que tiene la anemia falciforme en algunas poblaciones del país, en particular la población afrodescendiente, y teniendo en cuenta que en Colombia el 10.62% de las personas son afrodescendientes, y de las cuales el 90% se ubican en las costas (DANE, 2007), la determinación de marcadores que permitan la identificación temprana de la severidad de la enfermedad se vuelve esencial, ya que esta pronta identificación no solo de la enfermedad, sino también predecir la severidad de la misma durante el desarrollo, permitiría ajustar terapias clínicas en los pacientes y con ello, mejorar su calidad de vida.

Es por ello que en el presente trabajo, se propone evaluar el papel de varios marcadores moleculares (SNP's) asociados a la regulación de la HbF, al igual que evaluar SNP's dentro de la región promotora del gen γ^G como marcadores de severidad para la anemia falciforme tanto en individuos con anemia de células falciformes como sanos de la costa Pacífica y Atlántica de Colombia, con el fin de establecer si en nuestra población estos SNPs reportados para otras poblaciones están asociados con los niveles de hemoglobina fetal.

ANTECEDENTES

La anemia falciforme es una enfermedad de carácter hereditario cuyo efecto principal es la destrucción y disminución del tiempo de vida de los glóbulos rojos, causada por una mutación en el segundo nucleótido del sexto codón del gen de la β globina (Provan & Gribben, 2010). Pauling (Pauling *et al* 1949) denominó a este tipo de hemoglobina, Hemoglobina S (HbS), ya que presentaba un movimiento diferente al de la hemoglobina normal (HbA) en ensayos de electroforesis.

Las características clínicas de esta enfermedad son variadas y consistentes con la rápida destrucción de los glóbulos rojos y la oclusión de pequeños vasos sanguíneos (Platt *et al* 1994) desencadenando síntomas como el dolor en los huesos, la anemia hemolítica (Stuart & Nagel 2004), el secuestro esplénico o acumulación de células falciformes en el bazo, el

síndrome agudo de pecho (principal causa de muerte en adultos jóvenes), los accidentes cerebro-vasculares entre otros (Alexander *et al* 2004, Kato *et al* 2007, Kaul *et al* 1996, Stuart & Nagel *op cit*, Hoppe *et al* 2004), observándose una alta tasa de mortalidad en niños de 1 a 3 años debido en gran medida a la susceptibilidad a infecciones bacterianas (neumococo) (Leikin *et al* 1989). La variedad de manifestaciones de la enfermedad, muchas de las cuales son impredecibles, dificulta la identificación temprana de afectados, especialmente en niños. Esto impide implementar un tratamiento adecuado para evitar los resultados adversos del daño irreversible de sus órganos que son causados generalmente por afecciones producto de la continua deformación de los eritrocitos (Quinn *et al* 2008). Sin embargo, se ha observado que la mortalidad de individuos afectados es menor cuando estos tienen concentraciones de HbF altos (mayores a 8.5%) y se eleva cuando el conteo de glóbulos blancos es alto también (15100 por mm³) (Platt *et al*. 1994).

El impacto de esta enfermedad en la población colombiana se ve reflejado en la frecuencia que tiene la mutación en la misma. La HbS tiene una alta frecuencia en las regiones costeras del país. Para la costa Pacífica se han reportado frecuencias que oscilan entre los 3 y 18% (Cuervo, 1984; Pereira & Saenz 1996; Jaramillo 1997; Tascón 2007). Para la Costa Caribe los reportes son pocos y sólo Silva *et al* (1998) reporta una frecuencia de 10% en la ciudad de Cartagena. En las islas de San Andrés y Providencia, Bernal *et al* (1995) estimaron una frecuencia de hemoglobinopatías de 12.8% y 20.8% respectivamente, señalando al rasgo falciforme como la dolencia de este tipo más frecuente. La alta frecuencia de la mutación en estas dos regiones del país, pone de manifiesto que la anemia falciforme se vuelve un problema de salud pública en estos sitios y se hace pertinente un tratamiento adecuado de esta población.

En el resto de países latinoamericanos la HbS tiene una incidencia alta en población afrodescendiente en donde 1 de cada 500 nacimientos tiene drepanocitosis, proporción que disminuye a 1 de cada 1000 nacimientos entre hispanos (no afrodescendientes). Las frecuencias observadas en algunos países de la región como Brasil, Cuba, Jamaica, Puerto Rico, Venezuela y Panamá son muy similares a las encontradas en Colombia (Gonçalves *et al* 2003, Lyra *et al* 2005 y Silva *et al* 1998).

Papel de la hemoglobina fetal

Los niveles de hemoglobina fetal en pacientes con hemoglobinopatías como la anemia de células falciformes y las β -talasemias, es uno de los factores que más impacto tiene sobre el desarrollo de estas enfermedades, sobretodo en su variabilidad clínica. Este tipo de hemoglobina está presente durante el período fetal en los humanos y representa más del 90% de la hemoglobina total al momento de nacer. Singer *et al* (1951) reportan que en recién nacidos el índice de eritrocitos modificados es bajo (en personas con anemia falciforme) y esta proporción se le atribuye a la presencia de la hemoglobina fetal.

En los pacientes con anemia de células falciformes, la función de esta hemoglobina es disminuir la propensión de la polimerización de la HbS, los tetrámeros híbridos ($\alpha_2\beta_2\gamma$) inhiben la polimerización de la HbS y la presencia de la HbF diluye la concentración intracelular de la HbS. Siendo tal el impacto en el nivel primario de esta patología, se podría esperar que los niveles de HbF tengan un efecto global beneficioso (Thein 2013). En los pacientes con talasemias, la HbF reduce el desbalance que existe entre las cadenas de globinas, aminorando las complicaciones por tales falencias (Fucharoen et al. 1996).

Es por ello, que por diferentes vías se busque aumentar los niveles de HbF, con el propósito de disminuir la severidad de los síntomas en este tipo de hemoglobinopatías, función que cumple la hidroxiurea, un citotóxico que regenera los eritrocitos, nitrosila la guanilato ciclasa soluble, haciendo que se incremente el cGMP el cual aumenta la expresión del gen de la γ globina, y con ello se eleven los niveles de Hemoglobina Fetal (*op. cit*)

Regulación génica de las globinas

Los genes que codifican para las globinas están ubicados en dos complejos génicos. Las cadenas Beta (β) se encuentran en un cluster ubicado en el cromosoma 11. Mientras que las globinas Alfas (α) se encuentran igualmente en un complejo génico (cluster) en el cromosoma 16 (Steinberg 2009). Durante el desarrollo ontogénico de *Homo sapiens* se presentan diferentes tipos de hemoglobinas a nivel embrionario, fetal y adulto. Estas hemoglobinas son producto de la combinación de diferentes cadenas α y β (Figura 1).

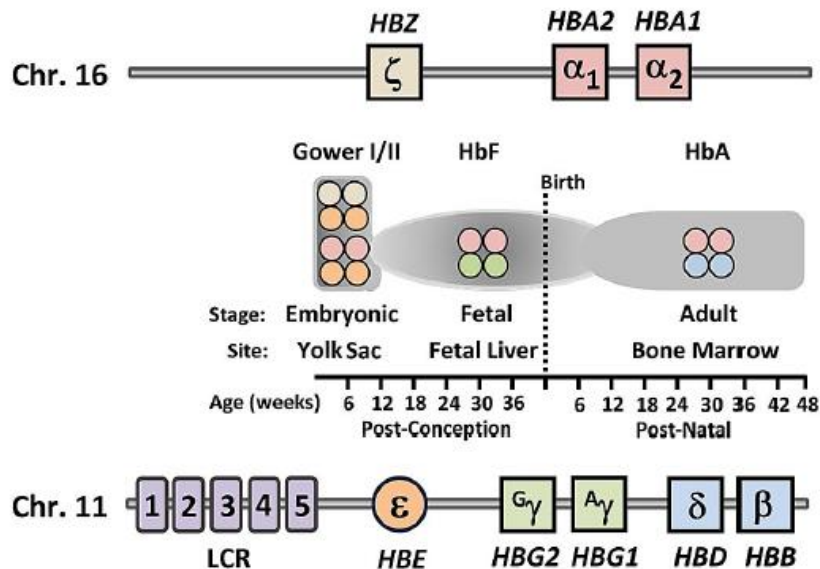


Figura 1 Composición de los diferentes tipos de hemoglobina y los loci que expresan las subunidades que las conforman (Tomado de Wilberg et al 2011).

Factores involucrados en la regulación de la hemoglobina fetal

La hemoglobina fetal es producida por la combinación de dos cadenas α y dos cadenas γ ($\alpha_2\gamma_2$). Ésta se comienza a producir al mes y medio de gestación y detiene su síntesis durante el período perinatal. El cambio de hemoglobina fetal a adulta se debe a un silenciamiento de la expresión de las cadenas γ y un inicio en la expresión de β . Este “switch” es producido por la competencia de los genes de γ globina y β globina por el beta-LCR. Sin embargo, existen diferentes elementos *cis* que actúan en la regulación dependiente del desarrollo de β y γ globina. Estos elementos pueden ser: enhancers, silenciadores (como el ubicado en la región distal del promotor del gen de la globina ϵ quien en compañía de las proteínas GATA-1, YY1, y DRED hacen parte del complejo represor), insulators (como el 5’HS5), elementos de limite (como la secuencia ubicada en 5’HS4) y el LCR como tal (Harju *et al* 2002). El silenciamiento competitivo de las globinas plantea que durante el período fetal, factores de transcripción específicos ubicados en el extremo 5’ del gen γ -globina, favorecen la interacción del gen γ con una región activadora del locus del gen de la β -globina (LAR); mientras en el estado adulto, son los factores de transcripción específicos de éste estado

ubicados en el extremo 3' del gen de la β globina los que interactúan con LAR. Esto produciría que en el estado fetal γ globina este activo y durante el estado adulto sea la β globina quien lo esté (Enver *et al* 1990).

Sin embargo, la regulación de la hemoglobina fetal es tan compleja que no solo fallas en ese switch generan altos niveles de hemoglobina fetal, pues éste también está gobernado por factores que se encuentran dentro y fuera del cluster, por lo que modificaciones en estos sitios también afectan la regulación.

Polimorfismos de nucleótido único: SNPs

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) son los marcadores de preferencia tanto para los estudios de ligamiento como para los estudios de demografía histórica debido a la abundancia relativa de SNP's en el genoma humano (Wakeley 2001). Se ha probado que el sitio ubicado a -157 en el promotor de γ^G está asociado con la modulación de la hemoglobina fetal. La presencia de un alelo T en este sitio se ha correlacionado con el aumento tanto de hemoglobina fetal como de células F (único tipo de célula sanguínea que tiene HbF en el estado adulto) y en un desarrollo medio de la anemia falciforme y de la β -talasemia; sin embargo, la relación de este sitio con los niveles de HbF se ve limitada a la presencia del haplotipo Senegal y Arabe-Indio en los pacientes ya que son los únicos haplotipos que presentan una T en este sitio (Nagel *et al* 1985).

Otros sitios importantes en la expresión de γ globina son la posición -175 y -173, un cambio de T→C en estos sitios interfiere con la unión de OCT-1 y GATA 1 respectivamente, que actúan aquí como represores de la expresión de γ^G (Li *et al* 2005). Gracias a una mutación en la posición -117 en la región cercana al promotor, Gumucio *et al* (1988), identificó un sitio de unión a otro factor de transcripción. La presencia de esta mutación aumenta la interacción con el factor *trans* γ CAAT que posibilita la expresión de γ^G . También se ha podido identificar en humanos un factor determinante en el mecanismo del switching entre β y γ -globina. Este sitio está ubicado en la posición -53 a -35, dentro del promotor del gen γ globina y tiene una función similar al del elemento selector de sección

que existe en las aves y que puede silenciar el gen de β globina, a través de un proceso de competencia por el β -LCR (Jane *et al* 1993).

Otra secuencia que presenta actividad de selector de estado son los elementos de repetición directa, esta secuencia presente en el promotor de γ^G es un potente represor de la expresión del gen de la γ globina. Barbosa *et al* (2010) encontró dentro del promotor de γ^G que una delección de 6bp (-396_-391) se relaciona con niveles de HbF mayores al 5%. Lo mismo se observó para el alelo mutante (G) del SNP ubicado en -369 del mismo promotor. Otra característica notada fue que la delección -396_-391, era seis veces más frecuente en individuos con anemia falciforme que en un grupo de referencia. Esto se le puede atribuir a la asociación que existe entre este polimorfismo y el haplotipo Bantú.

Promotor de γ -globina y sus reguladores

La regulación del gen γ -globina es de especial interés ya que su expresión en los pacientes con drepanocitosis aminora los efectos de esta enfermedad. Se han propuesto algunas hipótesis que según Da cunha *et al.* (2009) pueden explicar el incremento en la expresión del gen de γ -globina o la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH) en los adultos portadores de mutaciones no-delecionales. La primera propone que estas mutaciones puntuales disminuyen la unión de un represor transcripcional que está involucrado en el silenciamiento de la expresión de γ -globina en el adulto y la segunda es que estas mutaciones pueden crear sitios de unión que mejoran la unión de un activador transcripcional, lo que aumenta la expresión del gen γ en el adulto. Por otro lado una disminución en la expresión del gen γ -globina tiene que ver con la alteración en los sitios de unión para activadores transcripcionales o bien por la ganancia de un sitio de unión para los represores. Varias mutaciones naturales y experimentos con ratones transgénicos indican que las primeras 300pb de los promotores de genes de γ -globina juegan un rol primario en la supresión de los genes en el adulto (Sykes & Kaufman 1989).

Además de los motivos de unión específicos eritroides como GATA, EKLF y otros, la región promotora de γ -globina tiene una caja TATA a -30 pb, dos cajas CCAAT en -85 y -115 y una caja CACCC en -145 (Figura 2).

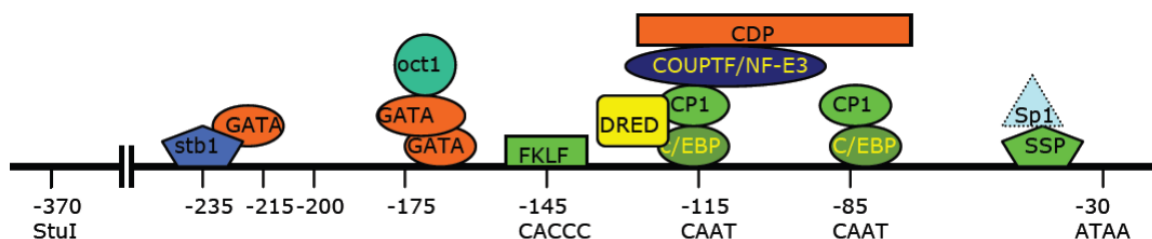


Figura 2 Esquema del promotor del gen γ -globina en humanos con sus posibles factores transcripcionales (tomado de Pourfarzad 2010).

La caja TATA es considerada como la secuencia principal del promotor, es el sitio de unión tanto de los factores de transcripción como de las histonas (la unión de factores de transcripción bloquea la unión de las histonas y viceversa) y está implicada en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa. (Klug et al. 2006).

La duplicación de la caja CCAAT es una característica única de los genes de γ -globina, región que también es un hotspot para mutaciones en la HPFH (Langdon & Kaufman 1998). Un número de proteínas pueden unirse a los motivos CCAAT, tal como C/EBP (CCAAT/ enhancer-binding protein), y puede actuar como reguladores positivos (Wall et al. 1996). NF-Y/CBF (CCAAT- factor de unión también llamado CP1) actúa como un activador, mientras que CDP (CCAAT desplazamiento proteína) puede unirse como un represor por reemplazo competitivo de los activadores (Fucharoen et al. 1990). NF-Y/CBF requiere de un alto grado de conservación de las secuencias CCAAT y es considerado ser uno de las principales proteínas de reconocimiento para estas cajas, además la unión de NF-Y a las cajas CCAAT duplicadas pueden facilitar el reclutamiento de maquinaria transcripcional basal (Duan et al. 2002). Por otra parte, la unión de NF-Y a la caja CAAT también aparece para participar en la comunicación entre el promotor del gen γ y el complejo LCR (Duan et al. 2002).

La región de la caja CCAAT de los promotores de globina también contienen una o dos repeticiones directas de un corto motivo análogo a los sitios de unión DR-1 (TGACCAATAGCCT) para receptores de hormonas nucleares no esteroides. El complejo NF-E3 puede unirse a estas repeticiones y actuar como represor (Filipe et al. 1999, Liberati et al. 2001). Este complejo puede desempeñar un rol en la expresión de los genes de

globinas sugiriendo que receptores hormonales nucleares están involucrados en el control del switch de los genes de globina (Filipe et al. 1999).

Por otra parte, DRED es un represor específico eritroide que se une con alta afinidad a sitios DR1 en los promotores de ϵ y γ -globina (Tanabe et al. 2002). Este es un complejo proteico que contiene los receptores nucleares huérfanos TR2 y TR4, los cuales forman un heterodímero que es el núcleo del complejo mayor DRED, una mutación en los sitios DR1 causan una elevada transcripción de γ -globina en pacientes con HPFH, además se ha observado que esta mutación reduce la unión entre TR2/TR4 in vitro (Tanabe et al. 2002). Otra posibilidad de la actuación de este factor transcripcional es un efecto indirecto sobre la expresión de γ -globina por un intermediario, GATA-1, para el cual TR2 y TR4 se unen a G1HE (GATA-1 hematopoietic enhancer) reduciendo la expresión de GATA-1 (Tanabe et al. 2007b), y este a su vez esta menos disponible para la activación de la expresión de γ -globina (Tanabe et al. 2007a).

Las cajas TATA y CCAAT del gen γ -globina parecen tener diferentes funciones en el desarrollo. Estos elementos promotores son esenciales para los altos niveles de expresión del gen γ en la eritropoyesis definitiva, ellos aparecen para desempeñar un menor rol en las células eritroides embrionarias. Las mutaciones en humanos en las cajas CCAAT y TATA en los genes promotores de γ -globina perjudican el reclutamiento de TBP, TFIIB y Pol II en eritroblastos esplénicos adultos, pero no en las células eritroides embrionarias (Pourfarzad 2010).

La caja GC presenta un patrón distintivo de nucleótidos que se encuentran entre la caja TATA y la caja CCAAT, aproximadamente a 43 bases corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción. Los elementos GC están sujetos a factores de transcripción y tienen funciones similares a los potenciadores. Esta caja junto a CCAAT se caracterizan por unir factores de transcripción generales (Klug et al. 2006).

Se ha sugerido que la unión de factores como Sp1 y SSP (Stage Selector Protein) en esta región, son modulados por la metilación de los dinucleótidos CpG. Este proceso en adultos resulta en el reemplazo de SSP como un activador por Sp1 como un represor; en un estado

temprano SSP daría una ventaja competitiva a γ -globina sobre β -globina. SSP contiene la proteína específica eritroide NF-E4, la cual tiene un isoforma corta (14 kDa) y una larga (22 kDa), y el factor de transcripción no-específico CP2. Mientras que la forma corta es un activador, la forma larga funciona como un represor siendo capaz de influenciar la expresión del gen, pero no de detener los mecanismos intrínsecos del silenciamiento de γ -globina (Pourfarzad 2010).

Finalmente se ha evidenciado que a la caja CACCC se le unen factores transcripcionales como Sp1 y Sp3. FKLf y FKLf-2 son también capaces de unirse a la caja CACCC pero el rol de cualquiera de estos factores en la expresión de γ -globina aún está por ser determinada. Según Ryan et al. (2000) la caja CACCC de γ -globina puede enlazarse a factores transcripcionales mediado por la interacción con LCR, lo cual normalmente potencia la expresión de γ -globina y reprime la expresión de β -globina en las células eritroides fetales. Por otra parte, una proteína conocida como EKLF que se enlaza a esta caja ha sido identificada en el hígado fetal humano, y se ha demostrado que es un factor esencial para el switch de globinas, sugiriendo que esta proteína puede estar involucrada en un ventaja competitiva del gen de γ -globina durante el estado fetal (Ryan et al. 2000).

Hay un sin número de otros sitios en la región 5' (corriente arriba) del promotor del gen γ -globina que tienen roles regulatorios en la expresión de éste gen, de los cuales muchos de estos son conocidos a partir del análisis de sus efectos en individuos portadores de mutaciones no-deleccionales (HPFH) (Langdon & Kaufman 1998), por ello la necesidad de barrer esta región.

Un ejemplo de ello es el SNP en la posición -158 de γ -globina (C/T), el cual interfiere con estos procesos principales para un fenotipo en la HPFH (Sampietro et al. 1992). Otro SNP's en la región promotora de γ -globina que produce HPFH incluye la sustitución -175 (T/C) asociado con la unión alterada de GATA-1 y Octamer-1 (Liu et al. 2005), sugiriendo un rol represor para GATA-1; sin embargo, una correlación directa entre la unión de GATA-1 y la actividad del promotor ha sido difícil de establecer (Ahituv 2012).

Varias mutaciones en la región -200 han mostrado que producen HPFH. Esta región es capaz de formar una estructura triple, dejando la secuencia del promotor de -206 a -217 como una cadena simple. Cinco diferentes puntos mutacionales en la región de -200 están asociados con HPFH; cuatro de estas mutaciones reducen dramáticamente la estabilidad de la estructura secundaria del ADN (Ulrich et al. 1992). Esta región también sirve como un sitio de unión para complejos represores, por lo cual mutaciones en este sitio pueden resultar en el desplazamiento de proteínas represoras permitiendo la unión de activadores *trans* (Ronchi et al. 1989).

Así como trabajos pioneros han demostrado que los polimorfismos de nucleótido único como el rs7482144 ubicado en el sitio *XmnI* en el promotor de *HBG2*, es el QTL que explica en su mayoría la regulación de los niveles de HbF. Estudios de asociación recientes han demostrado que regiones fuera del cluster de la β globina están implicados también en la regulación (2p16, 6q23, 8q and Xp 22.2–22.3) (Galarneau et al 2010, Lettre et al 2008). En el sitio 6q23 existen SNPs que influyen los niveles de HbF los cuales residen en un segmento continuo de 79 kb en la región intergénica *HBS1L-MYB*. En la población caucásica estos SNPs están distribuidos en tres bloques que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LD) donde las variantes genéticas con los efectos más fuertes están concentradas en una región de 24 kb denominada bloque *HMIP-2* (Menzel et al 2007). Para la región 2p16, se ha demostrado que los SNPs que modulan la HbF residen en un único bloque en LD de 14kb en el intrón dos del gen *BCL11A* (Nguyen et al 2010), convirtiéndose entonces, después del sitio *XmnI*, en los mayores reguladores de la variación de la HbF.

Su efecto varía según la frecuencia de los alelos menores en las diferentes poblaciones, por ejemplo, en pacientes con descendencia africana, estos dos loci más el QTL ubicado en el gen *HBB*, explican entre el 16%-20% (Thein 2013) a un 50% (Jawaid et al 2010) de la variación de los niveles de hemoglobina fetal lo que va de la mano de una disminución en la propensión a sufrir de síndrome agudo de pecho.

La contribución del QTL en el cromosoma 6q23 para la variación genética de la HbF/células F se estima de ser un 19%, y para BCL11A en el cromosoma 2p16.1 del 15%. (Sedgewick 2008)

Región intergénica HBS1L-MYB

La elaboración de mapas genéticos de alta resolución y la re-secuenciación, son herramientas que han ayudado a refinar el QTL 6q al establecer variantes importantes en una región de 24pb que se encuentra en desequilibrio de ligamiento y que se localiza 33kbp en sentido 5' de *HBS1L* y a 65kbp 5' de *MYB*, dicho bloque ha mostrado una gran asociación con los niveles elevados de HbF y se le ha dado el nombre de bloque polimórfico intergénico *HBS1L-MYB* (*HMIP2*) (Suzuki et al 2013, Da Souza et al 2011).). Los estudios de GWAS han indicado una asociación no sólo en la población europea con este bloque, sino también en la japonesa, indicando un fenotipo común para este sitio con orígenes independientes en las diferentes poblaciones humanas (Kamatani et al 2010).

Datos recientes sugieren que el área intergénica está fuertemente asociada con la expresión de la HbF debido a que tiene propiedades reguladoras. Tres sitios hipersensibles han sido identificados dentro de esta región, los cuales exhiben características marcadas de la cromatina activa, incluyendo la acetilación de las histonas y un sitio de anclaje para la ARN polimerasa II sólo en células eritroides. Se piensa que el gen *HBS1L* es un gen de mantenimiento (housekeeping) ya que se expresa en todo momento, además se ha visto involucrado en la regulación de ciertos procesos celulares expresándose en células hematopoyéticas (Da Souza et al 2011); mientras que *MYB* está involucrado en la oncogénesis, el cual tiene un patrón más restrictivo de expresión siendo crucial para el desarrollo eritroide. Una sobre expresión de *MYB* inhibe la expresión del gen γ globina, mientras que la sobre expresión de *HBS1L* no tiene ningún efecto (Wilber et al 2011).

Trabajos en ratones transgénicos mostraron que este sitio contiene *enhancers* distales que se requieren para la activación de *MYB*. *MYB* codifica para el factor de transcripción *c-MYB*, el cual es un regulador clave de la hematopoyesis y la eritropoyesis. Para explicar

cómo este gen modula los niveles de HbF se han propuesto tres teorías, la primera de ellas consiste en que la existencia de un “ambiente” con niveles bajos de *MYB* favorece la aceleración de la diferenciación eritropoyética, dando lugar a la liberación de los progenitores eritroides que todavía están sintetizando predominantemente HbF. Otra sugerencia es que *MYB* reprime la expresión de los genes para la hemoglobina fetal vía *KLF1* quien activa a *BCL11A*, y la última es que *MYB* regula corriente arriba los receptores nucleares TR2/TR4, los cuales son represores del gen de la γ globina. Por lo tanto, una regulación corriente abajo lidera la supresión de la vía TR2/TR4 y la regulación corriente arriba de la expresión de la globina fetal (Thein 2013).

Otras investigaciones, han encontrado y corroborado por medio de microarreglos (ChIP-Chip) y sus respectivos análisis, que existen sitios específicos para la acetilación eritrocítica, sitios de unión para GATA1 así como para la RNA polimerasa II, lo que rectifica que *HMIP2* contiene elementos reguladores para los genes *HBS1L* o *MYB* en las células eritroides, sin embargo, mecanismos moleculares que expliquen este fenómeno aún no han sido elucidados, sólo gracias a experimentos con ratones transgénicos, se ha podido determinar que *MYB* activa al complejo DRED (direct repeat erythroid definitive), un represor bien conocido de los genes embrionarios y fetales en los adultos, lo que sugiere que el complejo DRED estaría involucrado en el mecanismo regulatorio (Suzuki et al 2013).

La importancia de este QTL como modulador de la expresión de la HbF, fue establecida gracias al estudio de Garner et al (2002), quien mostró la influencia de éste QTL en la modulación de la HbF y la producción de células F en los pacientes Indios con β -talasemia.

En cuanto a la identificación de SNPs claves en esta región, se ha identificado que dichas variantes génicas residen en los tres bloques previamente nombrados: el gen *HBS1L*, en el extremo 5' a *HBS1L* y en la región intergénica de *MYB*. Dichos bloques están contiguos en un segmento de 79kb de largo, empezando 188pb arriba del exón uno de *HBS1L* y terminado 45 kb debajo de *MYB*. No obstante, el bloque 2 es quien tiene los marcadores que están más fuertemente asociados con la modulación de la HbF y la producción de

células F, ubicándose en el intrón 1a (rs9376090, rs9399137, rs9402685, rs11759553) o directamente corriente arriba de la posición 5'UTR del exón 1a (rs4896440, rs4895441, rs9376092, rs9389269, rs9402686, rs11154792 y rs9483788). Debido a su fuerte LD en la población europea, no se pudo determinar cuál de ellos tenía una mayor asociación con la regulación de la Hemoglobina fetal, por tanto fue necesario realizar el mismo mapeo en población africana, en la cual encontraron que el rs9399137 presenta asociación con los niveles de células F en personas sanas afroamericanas y con los niveles de HbF en el grupo de los pacientes con anemia falciforme (Creary 2009).

Makani y colaboradores (2011) también mostraron que este marcador está fuertemente asociado en pacientes de Tanzania donde el genotipo CC fue nulo para esta población, encontrando un segundo marcador que también se vio asociado con los niveles de HbF, el rs4895441.

En una muestra de Asiáticos-indios con β -talasemia y persistencia de la expresión de HbF, la señal de este QTL también fue detectada. Utilizando la regresión por pasos, Thein y colegas (2007) concluyeron que al menos tres variantes genéticas independientes (rs28384513, rs9399137 y rs6929404) explican el pico de ligamiento observado en 6q23, el cual también había sido observado en la población Cerdeña. Estos tres SNPs por medio de un modelo de regresión lineal explicaron en conjunto el 5% de la variación de los niveles de HbF. El LD entre esas tres variantes en la cohorte CSSCD fue bajo, mientras que el rs9399137 y rs6929404 mostraron un fuerte LD en la población CEU del HapMap pero no en la YRI. Menzel et al (2007) determinó que debido al fuerte LD en cada uno de los bloques pero no entre los bloques se podía determinar ciertos SNPs tags para cada uno de ellos siendo el rs5290901 para el bloque 1, el rs9399137 para el 2 y el rs6929404 para el 3. Aunque con anterioridad se había reportado que los rs28384513 y rs9399137 se asociaban independiente a la HbF, se encontró también que el rs4895441 es una nueva variante genética asociada a la variación en los niveles de HbF en el locus *HBS1L-MYB* (Lettre et al 2008).

BCL11A

El gen *BCL11A*, ubicado en el cromosoma dos, es un oncogén que hasta hace poco no tenía relación como modulador de la eritropoyesis. Este gen se ha visto implicado con fenotipos relacionados con hemoglobinopatías como las Talasemias y la Anemia Falciforme (Thein 2013), siendo en estos últimos pacientes de origen afroamericano y brasilero en quienes se ha presentado una fuerte asociación con las variaciones de HbF (Lettre et al 2008). Este gen codifica para los factores de transcripción denominados dedos de zinc con múltiples isoformas que comparten un N-terminal pero difieren en el número de C-terminales. *BCL11A* se une directamente a los motivos ricos en GC y actúa como un represor transcripcional que interactúa con varias proteínas como BCL6, COUP-TH, y SIRT1, siendo expresado en precursores de los glóbulos rojos. Se especula que el mecanismo de acción de *BCL11A* en la regulación de los niveles de HbF es anclarse a regiones reguladoras del gen de la γ globina y por lo tanto está involucrado en el switch molecular que determina la producción relativa de la producción de las cadenas de globina fetal y adulta (Uda 2007)

Otros estudios han mostrado como *BCL11A* actúa como represor de la γ -globina, el efecto de silenciamiento involucra la reconfiguración del locus *HBB* a través de la interacción con GATA-1 y SOX6 que se unen al promotor de γ -globina. Igualmente se determinó que KLF1 es un activador directo de la expresión de *BCL11A* gracias a estudios que involucraron el “knockout” en ratones, en ellos se vio que KLF1 es esencial para la activación de la expresión de β -globina, sin embargo en ausencia de KLF1, los genes embrionarios y fetales permanecen totalmente activados, con lo que se determinó que KLF1 tiene una doble función, activa a *HBB* directamente y también silencia al gen de la γ globina indirectamente al activar a *BCL11A* (Thein et al 2013).

En estudios con personas británicas no relacionadas seis SNPs han sido caracterizados en este gen. La evaluación de estos SNPs sugiere que motivos funcionales responsables de modular los niveles de HbF o el número de células F pueden estar dentro o inmediatamente adyacentes a una región de 3kb limitada por el rs1427407 y el rs4671393 en el intrón 2 de *BCL11A*. Las variantes funcionales que pueden estar influenciando los niveles de HbF o las

células F están mucho más cerca al rs766432 quien en esta muestra es quien más se asoció con estos niveles altos, ligados a este marcador se encontraron los rs4671393 y el rs11886868 para la población Yoruba, mientras que para la CEU y la CHB no (Sedgewick et al 2008). Sin embargo, el marcador evaluado por excelencia en este sitio es el polimorfismo rs11886868, pues en diferentes poblaciones es el SNP que más se ha relacionado con los niveles de HbF tanto en pacientes que padecen de Talasemia como de Anemia Falciforme, siendo el alelo C quien presenta una asociación con los niveles altos con este tipo de hemoglobina (Uda et al 2007).

Además de estos sitios, otros sitios también fuera del cluster de la β globina se han establecido como moduladores de la hemoglobina fetal, estos sitios se ubican en el cromosoma X (Xp22.2-22.3) y en el cromosoma 8 (8q) (Dover et al 1992, Steinberg & Nagel 2009, Fertrin & Costa 2010), sin embargo en el presente trabajo no fueron evaluados debido a la falta de claridad que aún existe en cuanto a la ubicación de los QTLs en estos sitios.

HIPÓTESIS

H1: Dado que cambios de nucleótidos en la región promotora del gen de la gamma (γ) globina implican una alteración en la expresión del gen, se esperaría que diferencias en las frecuencias alélicas entre los SNP's presentes en esta región, generen diferencias o cambios en la expresión de la Hemoglobina Fetal en los pacientes con Anemia Falciforme e individuos sanos.

H2: Debido a que la región intergénica entre los genes *MYB* y *HBS1L* en el cromosoma seis, y el intrón 2 del gen *BCL11A* en el cromosoma dos están asociados con la expresión de la hemoglobina fetal (HbF), se esperaría que diferencias en las frecuencias alélicas entre los SNP's presentes en estas regiones, indiquen diferencias en la expresión de la Hemoglobina Fetal en los pacientes con Anemia Falciforme e individuos sanos.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Comparar la composición alélica de SNP's asociados a la modulación de la hemoglobina fetal en pacientes con anemia falciforme e individuos sanos, y verificar la asociación de estos marcadores moleculares en la expresión de la hemoglobina fetal en afectados de la Costa Atlántica y Pacífica colombiana.

Objetivos específicos

- Cuantificar los niveles de hemoglobina fetal en individuos sanos y afectados con anemia falciforme, y establecer si esos niveles son altos o bajos teniendo en cuenta el promedio normal de hemoglobina fetal en sangre.
- Determinar la frecuencia alélica de los SNP's rs7941835, rs7482144, rs113622787 ó rs12290216, rs112219751, rs112479156, rs74929542 y rs78485026 y los resultantes de secuenciar la región promotora del gen γ^G , tanto en personas sanas como afectadas con anemia falciforme de las ciudades de B/tura, Cali, Cartagena y Montería.
- Evaluar las frecuencias alélicas de los SNP's, rs9399137, rs7776054 rs28384512, rs4895441 y rs6929404 ubicados en la región intergénica de los genes *HBS1L-MYB*, y los SNPs rs11886868 y rs4671393 localizado en el intrón 2 del gen *BCL11A* tanto en personas sanas como afectadas con anemia falciforme de las ciudades de B/tura, Cali, Cartagena y Montería.
- Comparar si existen diferencias en las frecuencias alélicas de los SNP's tanto en la región promotora, como en la región intergénica *HBS1L-MYB*, y en el gen *BCL11A* entre individuos sanos y afectados con niveles altos y bajos de hemoglobina fetal.

METODOLOGÍA

Caracterización de la Muestra

Se analizaron 63 muestras de sangre de individuos con anemia de células falciformes y 98 muestras de sangre de individuos sanos provenientes tanto de la Costa Atlántica como de la Costa Pacífica (Montería-Hospital San Jerónimo y Laboratorios ABO, Cartagena-Laboratorio Louis Pasteur y el Hospital Casa del Niño (Napoleón Franco), Cali- Hospital Universitario del Valle y FUNCANCER y Buenaventura- Hospital Universitario de Buenaventura). Los individuos muestreados no eran emparentados y tenían más de 2 años de edad. Los individuos afectados dieron positivo para la prueba de Metabisulfito de Sodio al 2%, o ya estaban diagnosticados con drepanocitosis. Para tomar y trabajar con la muestra de sangre se contó con el aval del Comité de Ética de la Universidad del Valle (Acta de aprobación 0909) y además el paciente firmó el consentimiento informado (Anexo A). Hecho esto, se tomaron los datos clínicos de cada uno de los pacientes (Lugar de nacimiento, Edad, Sexo, Tratamiento, Síntomas) y los controles (Lugar de nacimiento, Edad, Sexo) así como 8ml de sangre periférica repartidos en dos tubos vacutainer con EDTA (un tubo para extraer ADN y el otro para cuantificar los niveles de Hemoglobina Fetal). Estos se almacenaron a -4°C y se enviaron al Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle y el Laboratorio de Hematología de la misma universidad respectivamente. .

Los pacientes que hubiesen recibido transfusión de sangre en menos de dos meses en relación con la fecha de la toma de sangre, no fueron tenidos en cuenta.

Cuantificación de hemoglobina fetal

A cada muestra de sangre se le cuantificó el nivel de hemoglobina fetal. Este proceso se realizó a través de desnaturalización alcalina en el Laboratorio de Hematología de la Universidad del Valle ubicado en el Hospital Universitario del Valle (HUV). Teniendo las cuantificaciones tanto para los individuos con anemia falciforme como los individuos sanos, cada grupo se dividió en dos subgrupos, el primero de ellos comprendió los

individuos con hemoglobina fetal baja y el segundo los individuos con hemoglobina fetal alta. Para hacer esta división en los individuos afectados, se tomó el valor de 10% de hemoglobina fetal como el valor umbral entre los dos subgrupos, mientras que para los individuos sanos este valor fue del 2%. Se escogieron estos valores, puesto que la concentración normal en adultos de hemoglobina fetal es alrededor del 1%, pero si se tiene en cuenta que los afectados con anemia falciforme viven en un estado de constante estrés hematopoyético, esta condición produciría una elevación de la hemoglobina fetal como respuesta a la constante pérdida de eritrocitos. Por lo tanto, un valor superior a 1% en los pacientes, no significaría una manifestación fenotípica de los marcadores a evaluar sino que sería producto de las condiciones del ambiente celular que sufren los afectados. De otro lado, los niveles promedios de hemoglobina fetal en individuos con anemia falciforme varían entre un 6 y un 10% (Bailey *et al* 1992).

Extracción de ADN

A cada una de las muestras se les extrajo ADN utilizando la técnica de “Salting Out” descrita por Miller *et al* (1988). Éste procedimiento se realizó de la siguiente manera:

En un tubo vacutainer tapa roja, se mezcló un mililitro (ml) de sangre con 2 ml de solución de lisis de eritrocitos (155 mM NH_4Cl , 10 Mm NaHCO_3 , 0.1 mM EDTA p.H 7.4), se dejó reposar por 20 minutos en hielo, agitando al minuto 10 la mezcla; pasado este tiempo, se centrifugó la muestra por 10 minutos a 7000 rpm, luego se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos, se incubó por 15 minutos en frío y se centrifugó nuevamente durante diez minutos a 7000rpm, se descartó el sobrenadante y se repitieron los últimos tres pasos (máximo tres veces). Luego, se extrajo el sobrenadante, y al pellet se le adicionó 300 μl de solución de lisis de leucocitos (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA p.H 8.2), se le agregaron 20 μl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y 20 μl de proteinasa K (20 ng/ml), se resuspendió el botón y se incubó la muestra a 37°C durante 20 horas.

Pasado este tiempo, se le agregó al tubo 300 μl de NaCl 6M y se dejó actuar por 15 segundos, se centrifugó durante 20 minutos a 7000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un

tubo nuevo agregándole 1 ml de Etanol absoluto frío al 100%. Se realizaron movimientos suaves para formar un botón viscoso, y al hacerlo, éste se pescó con una punta estéril y se almacenó en un tubo eppendorf con 150 ul de Low TE 1X (10 mM Tris HCl DDH₂O), se diluyó y se incubó por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo, el ADN ya estaba listo para utilizarlo y por lo tanto, se guardó a 4°C.

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio de espectrofotometría (NanoDrop 2000) y se realizaron las diluciones a una concentración final de 50 ng/μl.

Genotipificación locus β-globina

Teniendo el ADN, se amplificó por medio de la PCR un primer fragmento de 596 pb; peso correspondiente a la región 5' del gen de la β globina, que se utiliza para realizar el diagnóstico de todas las muestras de sangre recolectadas, para ello el cebador usado fue el reportado por Attila *et al* (2004), cuya secuencia se muestran en la tabla 1.

El programa de amplificación para realizar la prueba de diagnóstico se inicia con un calentamiento por 5 minutos a 92°C después de la denaturación, 30 ciclos se llevan a cabo así: denaturación por 30 segundos a 94°C, seguido por anillamiento por 30 segundos a 65°C y extensión a 72°C por 1.5 minutos. Luego una extensión final a 72°C por 10 minutos (Attila *et al.* 2004).

Tabla 1 Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los segmentos flanqueantes de los sitios a evaluar.

Primers	Secuencias
Diagnóstico HbS	Forward: 5'GGC CAA TCT ACT CCC AGG AG 3'
Attila <i>et al</i> (2004)	Reverse: 5'ACA TCA AGG GTC CCA TAG AC 3'

Para verificar si hubo amplificación, se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida 29:1 al 8%, en el cual se corre cada una de las muestras amplificadas (5ul de la muestra) primero durante 15 minutos a 50 voltios y luego a 150 voltios por 45 minutos. Como se

mencionó anteriormente se espera observar como resultado de la amplificación de la PCR diagnóstico una banda de 596pb.

Obtenida la amplificación, se digieren los amplicones pertinentes con las respectivas enzimas de restricción de la siguiente manera: A 10 ul de amplicón se le agregan 7.5 ul de agua desionizada, 2 ul del buffer de la enzima y 0.5 ul de enzima, se mezcla por vortex muy bien y se deja incubando durante toda la noche (mínimo 16 horas).

A objeto de conocer el genotipo de cada individuo, se digiere el amplicón de 596 pb con la enzima de restricción *DdeI*, los individuos sanos (AA) mostrarán dos bandas, una de 150pb y otra de 200pb, los individuos afectados (SS) mostrarán sólo una banda de 350pb y los heterocigotos (SA) tendrán 3 bandas de 350, 200 y 150 pb (ver figura 3). Para la digestión con la enzima de restricción, se utilizaron controles que digieren y controles que no.

Hechas las digestiones se procede a separar y a visualizar los fragmentos generados en un gel de poliacrilamida 29:1 al 8% en el cual corre cada una de las muestras digeridas (10 ul) con un buffer de corrida 5X (4 ul) (precorrido 50 voltios por 10 minutos, 150 voltios por una hora y luego se sube el voltaje a 250 por 3 horas) y finalmente se revela con nitrato de plata.

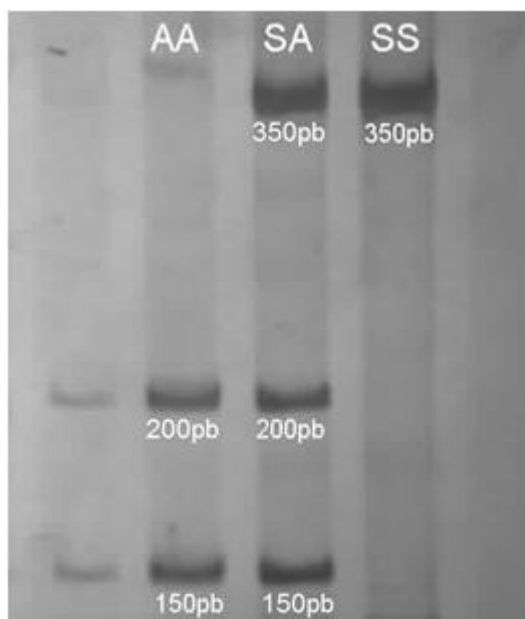


Figura 3 Diagnóstico para los individuos SS, SA y AA, utilizando la enzima de restricción DdeI. Electroforesis en gel de poliacrilamida 29:1 al 8%. (Imagen tomada de Fong 2007)

Secuenciación región promotora γ^G

Amplificación región promotora

Para la amplificación de la región promotora del gen γ -globina se utilizaron los cebadores UV5'gG (Tabla 2) (Diseñados por nosotros, utilizando Primer3 v.0.4.0 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y las condiciones reportadas en la tabla 3; el programa de amplificación dio inicio con un calentamiento de 92°C durante 5 minutos, posterior a esto se llevan a cabo 30 ciclos los cuales constan de: denaturación a 93°C por 36 segundos, anillamiento a 70°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1.5 minutos. Posteriormente se hizo una extensión final a 72°C por 3 minutos. La confirmación de la amplificación se llevó a cabo por medio de una electroforesis en un gel de poliacrilamida 29:1 al 8%, mostrando una banda de 413 pb correspondientes a la región promotora.

Tabla 2 Cebadores usados para la amplificación del promotor del gen γ^G -globina

Cebador	Secuencia (5' – 3')	Orientación
UV5'GG	CAGGCCTCACTGGAGCTACAGAC	Forward
UV5'GG	ACCTCAGACGTTCCAGAAGCGAGT	Reverse

Tabla 3 Condiciones para la amplificación del promotor del gen γ^G -globina

Reactivo	Stock	[] individuo	Vol/individuo (ul)
DNA		50.00 ng/ μ l	1.00
Taq Polimerasa	5.00 u/ μ l	1.00 u/ μ l	0.20
Primers	20.00 μ M	0.12 μ M	0.15
dNTP's	2.50 μ M	0.01 μ M	0.10
MgCl ₂	50.00 mM	0.98 mM	0.49
Buffer	5.00 X	1.00 X	5.00
H ₂ O		-	18.06
TOTAL		-	25.00

Protocolo de purificación con EDTA-Etanol

Por cada 20 μ l de amplificado se agregó 5 μ l de EDTA 125 mM pH 8.0 y 60 μ l de etanol al 100%, asegurándose que cada componente llegase hasta el fondo del vial, mezclando por inversión y dejando a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó la muestra a 3000 gravedades a 4°C durante 30 minutos y luego se descartó suavemente el sobrenadante sobre una servilleta limpia, centrifugando nuevamente a 190 gravedades por un minuto a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados del precipitado adicionando 60 μ l de etanol al 70% y centrifugando a 1650 gravedades a 4°C durante 15 minutos, descartando al final de cada centrifugación el sobrenadante sobre una servilleta limpia. Después del tercer lavado, el tubo de PCR donde se llevó a cabo el proceso, se dejó destapado en una plancha de calentamiento a 70°C por una hora con el fin que el etanol restante en el tubo se

evaporara. Pasado este tiempo, y asegurándose que no quedaran restos de etanol, se agregaron 12 µl de ddH₂O para resuspender el ADN purificado. Los fragmentos purificados fueron cuantificados mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000).

Secuenciación de la región promotora γ -globina

La determinación de la secuencia de nucleótidos de la región promotora 5' γ G (413 pb) se realizó mediante secuenciación tipo Sanger con el kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Tabla 4) siguiendo el programa de amplificación sugerido para este kit, purificando los amplicones resultantes con el kit “BigDye XTerminator Purification” al cual se le hicieron algunas modificaciones del protocolo inicial, básicamente en lo relacionado con la cantidad de los reactivos utilizados.

Protocolo de purificación con BigDye XTerminator.

A cada tubo de la reacción de PCR de secuencia se le agregaron 90 µl de solución SAM y 20 µl de solución BigDye XTerminator, posteriormente los tubos se colocaron en el vortex durante 30 minutos tapados de la luz y al finalizar este tiempo se trasladaron a la centrífuga refrigerada por dos minutos a 1000 gravedades o 2991 rpm a 22°C.

Finalmente las muestras se corrieron en el analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems) del laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle, con un arreglo capilar de 36 cm y POP7.

Tabla 4 Condiciones para PCR-Secuenciación promotor γ^G -globina.

Reactivos	[] Inicial	[] Final	Volumen por individuo
Ready Reaction Premix	2.50 X	0.09 X	0.70 μ l
BigDye Sequencing Buffer	5.00 X	0.50 X	2.00 μ l
Primer	1 μ M	0.16 μ M	3.20 μ l
ddH ₂ O	-	-	-
Amplificado	X ng/ μ l	40.00 ng/rxn	-
TOTAL	-	-	20.00 μ l

Genotipificación de SNP's por medio de la técnica de SNaPShot Multiplex

Por medio de esta metodología se analizaron seis SNP's que han sido asociados con la modulación de los niveles de hemoglobina fetal en individuos afectados con diferentes hemoglobinopatías (β - talasemia, anemia falciforme), los cuales se encuentran en la región intergénica de *HBS1L-MYB* (rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs6929404), y en el intrón 2 de *BCL11A* (rs4671393). El sistema SNaPShot Multiplex, usa la técnica de mini-secuenciación para la identificación del genotipo. Para esta metodología se amplifica por PCR la región del genoma que contiene el SNP a estudiar, en este caso la región intergénica de *HBS1L-MYB*, y el intrón 2 del gen *BCL11A*. Para ello, se diseñaron los respectivos cebadores que flanquean la región donde se encuentran los SNPs mencionados anteriormente (ver tabla 5), así como el primer de extensión (quien se hibridiza en sentido 5' al SNP a evaluar), con el cual se va a detectar el polimorfismo.

Tabla 5 Cebadores utilizados para amplificar los SNPs rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs6929404 y rs4671393 por medio de la técnica SNaPshot Multiplex.

Batería	Región	SNP	Primer ext. (5'-3')	Cebadores flanqueantes al SNP
I	HBS1L-MYB	rs7776054	TTTGTGTTCTGCTTCTAC	Fw GTTATCAGGGCGGTTCCCTC
			TAACTGAACATATGGTTAT	Rv
		rs9399137	T	GCACAGAAATACAGCAGGGTT
		rs4895441	AAAGACTCTTTGTAAAGTG	Fw GGCTGGGGGAGACAAATGAT
				Rv ACAGGATCTCACTGCTACCC
	Crs. 6	rs28384512	GCTTTCTCAGATTATCAG	Fw TTACTGAGCGCATAGCTTTCT CA
				Rv TCGCCGAGCGCCTGCGC
		rs6929404	AAGACCTCAAAGCTCA	Fw CTCTCTTCTCGGTTTGGGGG
				Rv GTGTGCACTGGCTGTTAAGG
II	BCL11A	rs4671393	GGACAGCAAAGCTTC	Fw GCCTTGGGAAGAAAGACAGC
				Rv TTCTGCTTCCTGTTACCTCT

Esta técnica permite amplificar varios fragmentos a la vez (PCR Multiplex), por lo tanto se crearon dos baterías para amplificar los respectivos SNPs. La primera batería consistió en amplificar los rs28384512, rs4895441, rs7776054 y rs9399137, estos dos últimos SNPs se

encuentran en un mismo fragmento, por lo tanto al observar la amplificación en el gel de poliacrilamida al 10% teñido con Nitrato de Plata solo se observaban tres bandas. La segunda batería consistió en amplificar los rs4671393 y rs6929404. El uso de las dos baterías se debe al mejor rendimiento de estas PCR por separado en la visualización de la amplificación. Las condiciones de amplificación se muestran a continuación.

Tabla 6 Condiciones de PCR Multiplex para los rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054.

Reactivo	[Stock]	[Ind]	Vol x Ind (µl)
ADN		50ng/µl	1,5
Taq Polimerasa	5u/µl	0,08u/µl	0,4
Primer rs7776054	20 µM	0,136 µM	0,17
Primer rs4895441	20 µM	0,24 µM	0,3
Primer rs28384512	20 µM	0,28 µM	0,35
DNTPs	2,5 µM	0,04 µM	0,4
MgCl₂	50 mM	0,98 mM	0,49
Buffer	5X	1X	5
H₂O	---	---	16,39
TOTAL	---	--	25

Tabla 7 Condiciones de PCR Multiplex para los rs6929404 y rs4671393

Reactivo	[Stock]	[Ind]	Vol x Ind (µl)
ADN		50n/µl	2
Taq Polimerasa	5u/µl	0,08u/µl	0,4
Primer rs7776054	20 µM	0,28 µM	0,35
Primer rs4895441	20 µM	0,2 µM	0,25
DNTPs	2,5 µM	0,04 µM	0,4
MgCl₂	50 mM	0,98 mM	0,49
Buffer	5X	1X	5
H₂O	---	---	16,11
TOTAL	---	--	25

El programa para la amplificación de ambas baterías consistió en un calentamiento a 92°C por 5 minutos, después de la denaturación, 30 ciclos se llevan a cabo así: denaturación por 1 minuto a 93°C, seguido el anillamiento por 1 minuto a 63°C y una extensión a 72°C por 1.30 minutos. Finalmente se termina con una extensión a 72°C por 3 minutos.

Para corroborar la amplificación de los diferentes fragmentos se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida 29:1 al 10%, teñido con nitrato de plata.

Teniendo los fragmentos amplificados para cada uno de los individuos, se purificaron utilizando el protocolo de precipitación EDTA-Etanol (mencionado anteriormente) y se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Para llevar a cabo el siguiente paso, se diseñó un tercer primer para cada uno de los SNPs a evaluar con esta técnica (ver tabla 5) utilizando el software gratuito Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), dicho cebador se ubica justamente en posición 5' al SNP correspondiente. Con el amplificado previamente purificado y con este tercer cebador, se realiza una amplificación utilizando el SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) con algunas modificaciones al protocolo inicial. Las condiciones para las dos baterías fueron diferentes sin embargo, el programa para su amplificación fue el mismo: Se inició con un calentamiento a 96°C durante un minuto y se llevaron a cabo 25 ciclos que constaron de: denaturación a 96°C por 10 segundos, anillamiento a 50°C por 5 segundos y una extensión final a 60°C por 30 segundos.

Tabla 8 Condiciones PCR- SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix.

Reactivo	Vol x Individuo (µl)	Vol x Individuo (µl)
	Batería I	Batería II
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	0,5	0,5
Templado Multiplex	1,5	1
Pool de Cebadores*	0,8	1,6
ddH₂O	1,2	0,9
TOTAL	4	4

*El pool de cebadores para cada batería tiene una [inicial]=1µM y una [final]=0,2µM. diluidos en un volumen final de 20µl.

Terminada la PCR se debe realizar la purificación final, para ello se agregó a cada tubo de amplificado 0,7µl de la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP), se mezcló por pipeteo y se incubó a 37°C por 10 minutos, pasado este tiempo para desactivar la enzima, se incubó otros cinco minutos más pero esta vez a 75°C.

Teniendo los purificados, el paso final consistió en mezclar 0,5µl de ese purificado con 9µl de HiDi-Formamida y 0,5µl de GeneScan-120 LIZ, para finalmente correr las muestras en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems) con un arreglo capilar de 36 cm y POP7.

Genotipificación por medio de PCR en Tiempo Real

Para evaluar el SNP ubicado en el intrón 2 de BCL11A (rs11886868), se utilizó la técnica de PCR en Tiempo Real utilizando el protocolo y los reactivos del “Melt Calibration Kit” de BIO-RAD. Esta técnica pudo llevarse a cabo ya que los genotipos control respectivos para este SNP se habían establecido por medio de sondas Taq Man en el Instituto de Investigación King’s College de Inglaterra durante la pasantía del estudiante de Doctorado para ese entonces Cristian Fong.

Para llevar a cabo este procedimiento es necesario contar con un termociclador en tiempo real, para ello se utilizó un CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System de BIO-

RAD y se sintetizaron los cebadores FwTGACCCCTTCCTTCTAACCA/RvACCATGGATGAATCCCAGAA para la amplificación del fragmento de 148pb en el cual se encuentra inmerso el rs11886868. Estos cebadores fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Las condiciones de amplificación para este SNP fueron:

Tabla 9 Condiciones para amplificación del rs11886868 utilizando el Melt Calibration Kit de BIO-RAD.

Reactivo	[Final]	Volumen por Reacción (10µl)
Precision Melt Super Mix	2X	5
Primer	2 µM	1
H₂O	---	3
ADN	50ng/µl	1
TOTAL		10

El protocolo de PCR para la calibración de “melting” consta de dos pasos principales, el primero de ellos consiste en la amplificación del fragmento como tal y el segundo en el análisis de la curva de melting. Para la amplificación del fragmento se realizó un primer ciclo de denaturación a 95°C durante dos minutos para activar completamente la polimerasa Hot-Start; el segundo paso consiste de 40 ciclos los cuales comienzan con una denaturación a 95°C por 10 segundos, un anillamiento a 61°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 30 segundos. El análisis de alta resolución del melting consta de un ciclo donde la formación del heteroduplex se da a una temperatura de 95°C por 30 segundos disminuyendo luego a 60°C por un minuto, finalmente la curva de melting consta de un solo ciclo, la cual se forma empezando con una temperatura de 65°C, la cual va aumentando de a 0,2°C hasta llegar a 95°C, cada aumento de temperatura tiene una duración de 10 segundos.

Al terminar la amplificación, es posible observar la amplificación de las muestras y la curva de melting, con ello se asignó según las muestras control el genotipo de cada una de las muestras evaluadas.

Análisis de resultados

Secuenciación de la región promotora γ -globina

Las secuencias fueron procesadas y analizadas con el programa “Sequencing analysis V. 5.3.1” y alineadas con el programa “SeqScape V. 2.7” donde se buscaron los diferentes polimorfismos. Mediante conteo directo se determinaron las frecuencias alélicas de cada uno de los SNP’s tanto en individuos sanos (AA) y afectados (SS). La estimación de las fases gaméticas se realizó con el programa “Arlequin V. 3.5” al igual que el equilibrio Hardy-Weinberg el cual se calculó para cada loci por separado.

Se compararon las frecuencias alélicas de los SNP’s en individuos con HbF alta y baja, tanto para SS como para AA mediante la prueba de Raymond & Rousset (1995) con el programa “Arlequin V. 3.5”. Los sitios que mostraron diferencias significativas fueron corroborados mediante un análisis de varianzas (ANOVA) con el programa “Statistica V. 7.0”. Así mismo se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD) con el programa “Haploview V. 4.2” y las matrices fueron construidas a través del archivo de extensión de Excel “SNP tool V. 1.8”

También se determinaron los distintos haplotipos de la región secuenciada para cada uno de los grupos y sus frecuencias fueron comparadas con una prueba de Raymond & Rousset (1995) con “Arlequin V. 3.5”. Las relaciones haplotípicas fueron determinadas y graficadas con el programa “Network V. 4.6”

Genotipificación de los SNPs por medio de la técnica de SNaPshot Multiplex y PCR en Tiempo Real

Se establecieron las frecuencias alélicas de cada uno de los SNPs tanto para los individuos sanos como afectados y se realizó la prueba de Hardy-Weinberg para cada uno de los SNPs evaluados con el fin de establecer cuales se encontraban en equilibrio y cuáles no utilizando

el programa GeneAlex6.501. Igualmente se compararon los resultados obtenidos con los reportados por el HapMap para cada uno de los SNPs evaluados por medio de una chi-cuadrada con el fin de establecer si las frecuencias eran semejantes o no a las de otras poblaciones ya estudiadas. Se evaluó tanto la normalidad como la igualdad de varianza de los niveles de Hemoglobina Fetal utilizando las pruebas Anderson Darling, y las Pruebas de Barlett y Levene respectivamente por medio del programa Minitab®16. Debido a que los datos no son normales y tampoco cumplen con la igualdad de varianza se realizó una correlación de Spearman para cada uno de los SNPs utilizando Minitab®16, esto con el fin de establecer que características como Edad, Sexo y nivel de hemoglobina fetal se asociaban para cada SNP. Hecho esto se realizó un Análisis de Correspondencia Múltiple (Minitab®16) y se evaluó el desequilibrio de ligamiento por medio del software Haploview4.2 y el algoritmo EM en Arlequin3.1. El rs11886868 no se encontraba en equilibrio H-W, sin embargo, por su importancia clínica se realizó una correlación de Spearman y se compararon las medias de los genotipos para este SNP por medio de la prueba Kruskal-Wallis en Minitab®16 para establecer cuál de ellos es quien tiene mayor relación con los niveles de Hemoglobina fetal.

RESULTADOS

Con el fin de establecer si existía asociación entre ciertos SNPs ubicados en la región promotora del gen γ^G se evaluaron 57 individuos con anemia falciforme (SS) y 133 individuos sanos (AA) por medio de secuenciación. De igual manera, se quiso establecer si los SNPs ubicados en la región intergénica *HBS1L-MYB* (rs9399137, rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs6929404), y en el intrón 2 de *BCL11A* (rs4671393, rs11886868) modulan o no los niveles de hemoglobina fetal, para ello 63 individuos con anemia falciforme y 98 individuos sanos fueron analizados por medio de PCR en tiempo real y mini secuenciación (SNaPshot multiplex).

Cuantificación de Hemoglobina Fetal

Tanto los individuos sanos como enfermos fueron divididos en dos subgrupos (HbF alta y HbF baja) según los niveles de cuantificación de hemoglobina fetal de cada uno de ellos.

Por medio de una prueba de Mann Withney, se estableció que los individuos sanos y enfermos con HbF alta y baja presentan diferencias significativas en cuanto a la cuantificación de los niveles de HbF, pues el *p* valor para la prueba es <0,05 (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización de los niveles de Hemoglobina Fetal en individuos sanos y enfermos.

INDIVIDUOS	SUBGRUPO	PROMEDIO HbF (%)	VALOR MAX. (%)	VALOR MIN. (%)	DESV. ST.
Individuos	HbF Alta >10%	13,01	19,5	10,1	2,76
Enfermos	HbF Baja < 10%	6,14	9,9	1,21	2,50
SS					
Individuos	HbF Alta >2%	4,2	18,47	2,03	3,01
Sanos	HbF Baja < 2%	1,18	1,94	0,02	0,48
AA					

Secuenciación de la región promotora del gen γ^G -globina

Como se mencionó anteriormente, la región promotora del gen γ^G -globina se evaluó por medio de secuenciación, para ello fue necesario secuenciar un fragmento de 413pb perteneciente a la región promotora del gen γ^G -globina donde se encontraron 13 SNP's en las posiciones -356, -324, -317, -309, -307, -271, -203, -180, -161, -158, -152, -53 y -16 de los cuales hay siete variantes previamente reportadas en el NCBI y seis en las cuales no se encontró ningún reporte (Figura 4, Tabla 11). Es importante tener en cuenta que los SNP's encontrados en los individuos enfermos también fueron encontrados en los individuos control (Tabla 12 y 13).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -378      -368      -358      -348      -338      -328
CAGGCCTCAC TGGAGCTACA GACAAGAAGG TAAAAACGG CTGACAAAAG AAGTCCTGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -318      -308      -298      -288      -278      -268
ATYYTYTATG RTGGGAGARG RAAACTAGCT AAAGGGAAGA ATAAATTAGA GAAAAATGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -258      -248      -238      -228      -218      -208
AATGACTGAA TCGGAACAAG GCAAAGGCTA TAAAAAAAT TAAGCAGCAG TATCCTCTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -198      -188      -178      -168      -158      -148
GGGGSCTT CCCCACACTA TCTCAATGCA AATATCTGT TGAAACRGT CCTGGYTAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -138      -128      -118      -108      -98      -88
CTCCACCCAT GGGTTGGCCA GCCTTGCCTT GACCAATAGC CTGACAAGG CAAACTTGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -78      -68      -58      -48      -38      -28
CAATAGTCTT AGAGTATCCA GTGAGGCCAG GGGCYGGCGG CTGGCTAGGG ATGAAGAATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      -18      -8      +3      +13      +23
AAAGGAAGCA CTTTCAGCA GTTCCACACA CTCGCTTCTG GAACGTCTGA GGT

```

Figura 4 SNP's encontrados en la región promotora del gen γ^G -globina. Las variantes previamente reportadas se señalan en color aguamarina mientras que las variantes nuevas se señalan con morado al igual que las cajas están señaladas por rectángulos.

Tabla 11 SNP's encontrados que han sido previamente reportados en el NCBI

Posición SNP's	Nombre	NCBI (NC_000011.9)	Alelos [Anc/Der]
-16	rs7941835	5276027	C/G
-158	rs7482144 ó rs41322148	5276169	C/G
-271	rs113622787 ó rs12290216	5276282	T/C
-307	rs112219751	5276318	A/G
-309	rs112479156	5276320	A/G
-317	rs74929542	5276328	G/A
-324	rs78485026	5276335	T/C

De los siete SNPs encontrados sólo uno de ellos, el -158 no se encuentra en equilibrio H-W. Para la comparación de las frecuencias alélicas por medio de la prueba de Raymond & Rousset (1995) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos (Tabla 12).

Tabla 12 Frecuencia alélica de los SNP's encontrados en individuos con anemia de células falciformes con HbF alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica colombiana.

Locus	Alelo	Raymond & Rousset (1995; p ± DS)				
		SS (N=40; HbF <10%)		SS (N=17 HbF >10%)		DS)
		Frecuencia	H-W (p ± DS)	Frecuencia	H-W (p ± DS)	
-356	A	0.11	1.00 ± 0.00	0.21	1.00 ± 0.00	0.20 ± 0.00
	G	0.89		0.79		
-324	C	0.11	1.00 ± 0.00	0.18	1.00 ± 0.00	0.34 ± 0.00
	T	0.89		0.82		
-317	A	0.13	1.00 ± 0.00	0.18	1.00 ± 0.00	0.52 ± 0.00
	G	0.88		0.82		
-309	A	0.86	0.55 ± 0.00	0.85	1.00 ± 0.00	0.82 ± 0.00
	G	0.14		0.15		
-307	A	0.86	1.00 ± 0.00	0.82	1.00 ± 0.00	0.55 ± 0.00
	G	0.14		0.18		
-271	C	0.10	1.00 ± 0.00	0.15	1.00 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	T	0.90		0.85		
-158	C	0.85	0.00 ± 0.00	0.94	0.03 ± 0.00	0.68 ± 0.00
	T	0.15		0.06		

* Frecuencia del alelo mínimo (MAF) SS HbF <10% = 0.04

* Frecuencia del alelo mínimo (MAF) SS HbF >10% = 0.08

Al igual que los individuos enfermos los individuos sanos también se separaron en dos grupos siguiendo la misma clasificación, pero a diferencia de los SS los AA presentaron los SNP's -203, -180 -161, -152 y -53, y -16. Los SNP's -356, -324, -317-309, -307, -271 y -158 presentes en los individuos enfermos, también se encuentran en los sanos, todos ellos con el mismo patrón de los SS en cuanto a la frecuencia alélica. Al evaluar el equilibrio H-W la mayoría de los sitios se encuentran en equilibrio a excepción de -309 (AA con HbF alta), -161 (AA con HbF baja) y -158 (AA con HbF alta). Además, se observaron

diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre individuos AA con HbF alta y baja en el sitio -309 (Tabla 13).

Tabla 13 Frecuencia alélica de los SNP's encontrados en individuos AA con HbF alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica de Colombia

Locus	Alelos	Raymond & Rousset (1995; p ± DS)				
		AA (N=61; HbF <2%)		AA (N=72; HbF >2%)		DS)
		Frecuencia	H-W (p ± DS)	Frecuencia	H-W (p ± DS)	
-356	G	1.00	NA	0.99	1.00 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	A	0.00		0.01		
-324	T	1.00	NA	0.99	1.00 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	C	0.00		0.01		
-317	G	1.00	NA	0.99	1.00 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	A	0.00		0.01		
-309	A	0.98	1.00 ± 0.00	0.83	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	G	0.02		0.17		
-307	A	0.97	0.05 ± 0.00	0.96	1.00 ± 0.00	0.22 ± 0.01
	G	0.03		0.04		
-271	T	1.00	NA	0.98	1.00 ± 0.00	0.25 ± 0.00
	C	0.00		0.02		
-203	C	1.00	NA	0.99	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	G	0.00		0.01		
-180	G	1.00	NA	0.99	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	A	0.00		0.01		
-161	G	0.98	0.01 ± 0.00	1.00	NA	0.46 ± 0.00
	A	0.02		0.00		
-158	C	0.86	0.08 ± 0.00	0.86	0.00 ± 0.00	0.49 ± 0.00
	T	0.14		0.14		
-152	C	0.99	1.00 ± 0.00	1.00	NA	0.46 ± 0.00
	T	0.01		0.00		
-53	C	1.00	NA	0.99	1.00 ± 0.00	0.37 ± 0.00
	T	0.00		0.01		
-16	C	0.93	0.27 ± 0.00	0.99	1.00 ± 0.00	0.05 ± 0.00
	G	0.07		0.01		

* Se descartaron cuatro individuos. NA = No aplica

* Frecuencia del alelo mínimo (MAF) AA HbF < 2% = 0.02

* Frecuencia del alelo mínimo (MAF) AA HbF > 2% = 0.02

Para corroborar las diferencias obtenidas en los controles respecto a los SNP's -309 y -16 por medio de la prueba de Raymond & Russet (1995) se realizó una ANOVA, para esto se

normalizaron los datos utilizando el Log (n+1), debido a que los datos no estaban distribuidos normalmente y se evaluaron utilizando la prueba de Anderson-Darling siendo el p valor $> 0,05$. Además, se llevó a cabo la prueba de homogeneidad de varianzas de Barlett y Levene para cumplir con los dos supuestos de la prueba de ANOVA y así poder realizarla, obteniendo un p valor para la homogeneidad mayor a 0,05.

Al hacer la prueba de ANOVA para el SNP -309, se evidencia que los individuos sanos -309 A/A presentan niveles de HbF más bajos cuando se compara con los portadores de al menos un alelo mutado (G/G o A/G), siendo estas diferencias estadísticamente significativas a un intervalo de confianza de 0.95 ($p= 0.014$) (Figura 5).

En el segundo caso el SNP -16 también mostró tener diferencias significativas al comparar los individuos que presentaban el alelo normal (C/C) con aquellos que llevaban la mutación (G/G o C/G) con un $p=0.018$ y un intervalo de confianza de 0.95 (Figura 6), pero en este caso el alelo mutado se relaciona con niveles de HbF más bajos.

Para el resto de sitios, tanto de individuos sanos como enfermos, no se presentaron diferencias significativas en esta prueba ($p>0.05$) lo cual coincide con lo obtenido en las tablas 7 y 8.

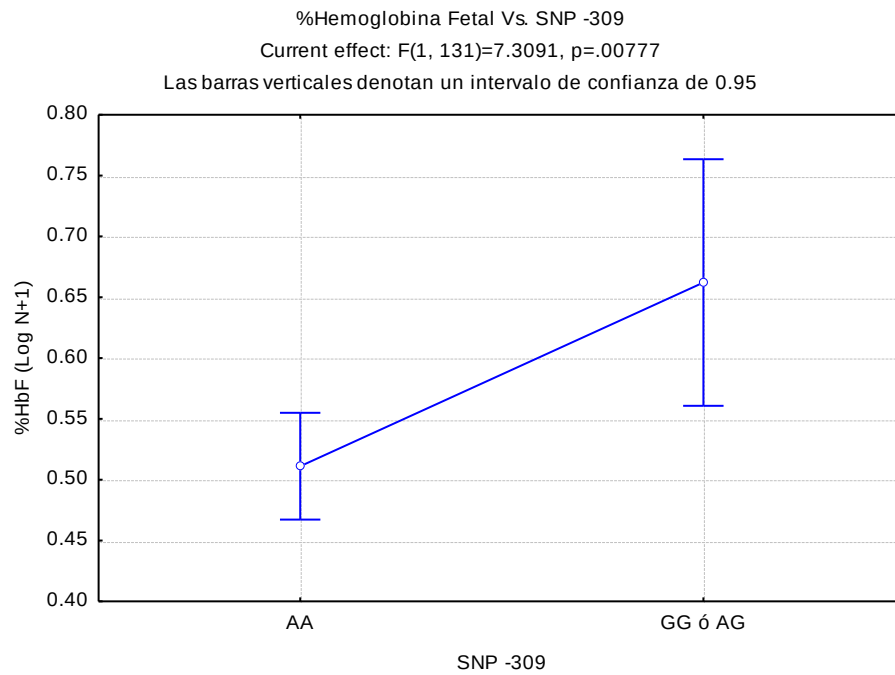


Figura 5 Comparación entre el %HbF y el SNP -309 en individuos sanos (AA) homocigotos para el alelo A y portadores del alelo mutado G.

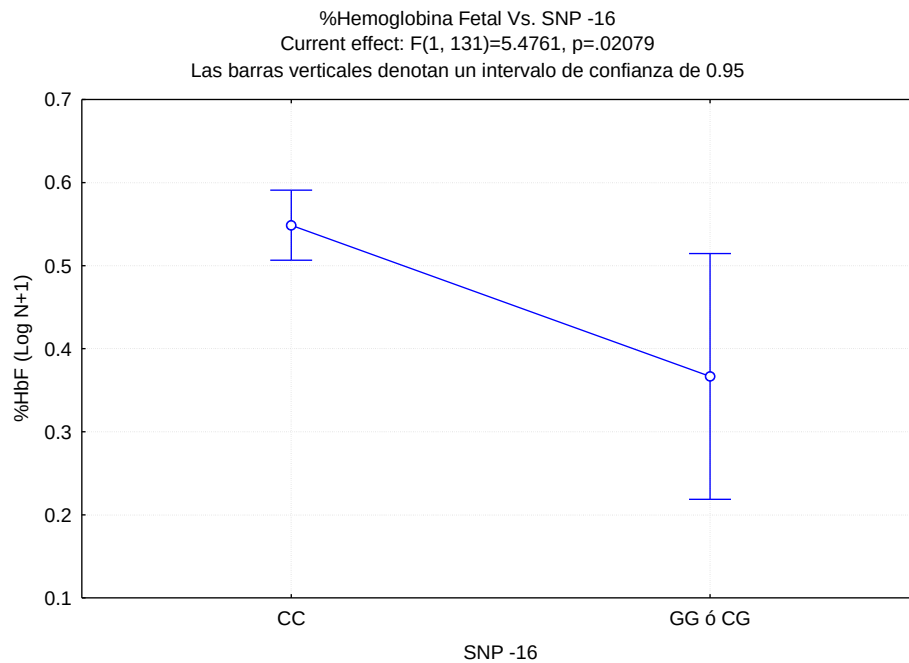


Figura 6 Comparación entre el %HbF y el SNP -16 en individuos sanos (AA) homocigotos para el alelo C y portadores del alelo mutado G.

Al estimar el desequilibrio de ligamiento (LD) en los diferentes SNP's encontrados en los individuos con anemia falciforme, se encontró que seis de los sitios evaluados para estos individuos pasaban ligados, -356, -324, -317, -309, -307 y -271, mostrando además que los SNP -309 y -307 en algún momento pudieron tener eventos de recombinación. Para el SNP -158 no fue posible estimar de manera confiable el desequilibrio de ligamiento (Figura 7).

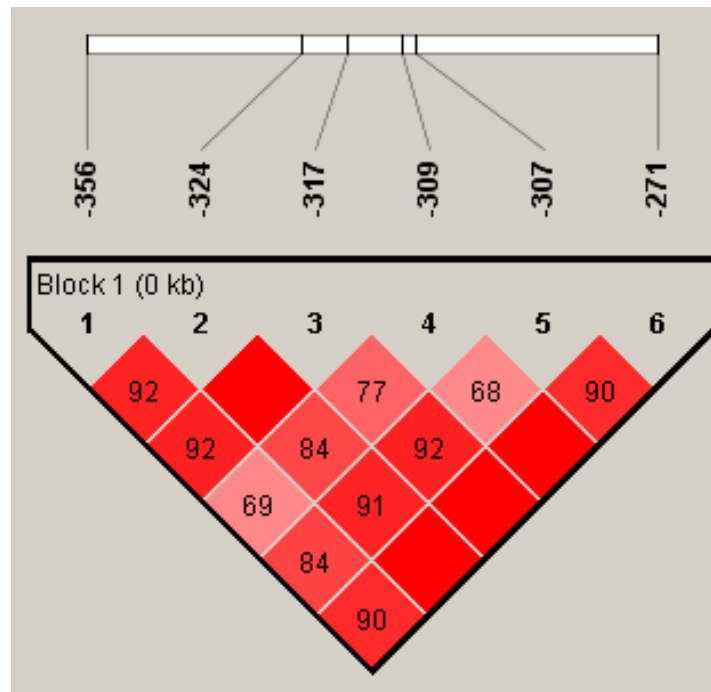


Figura 7 Evaluación del LD de los SNP's de la región promotora de γ^G -globina en individuos con anemia falciforme con HbF alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica colombiana. El grado de desequilibrio es representado con un matiz desde blanco a rojo intenso, siendo el rojo indicativo de LD y el blanco evidencia de recombinación. Los valores que se presentan son D' .

En los individuos control el análisis de LD mostró mucha ambigüedad en los resultados obtenidos para cada uno de los SNP's. Sin embargo, entre los sitios que son estadísticamente soportados se puede observar ciertas tendencias: a) a formarse un bloque de ligamiento desde -356 hasta -271; b) sitio de recombinación dentro de este bloque entre los SNP's -309, -307 y -271; y c) fuera del bloque se indican eventos de recombinación, en el SNP -161 y -16 (Figura 8).

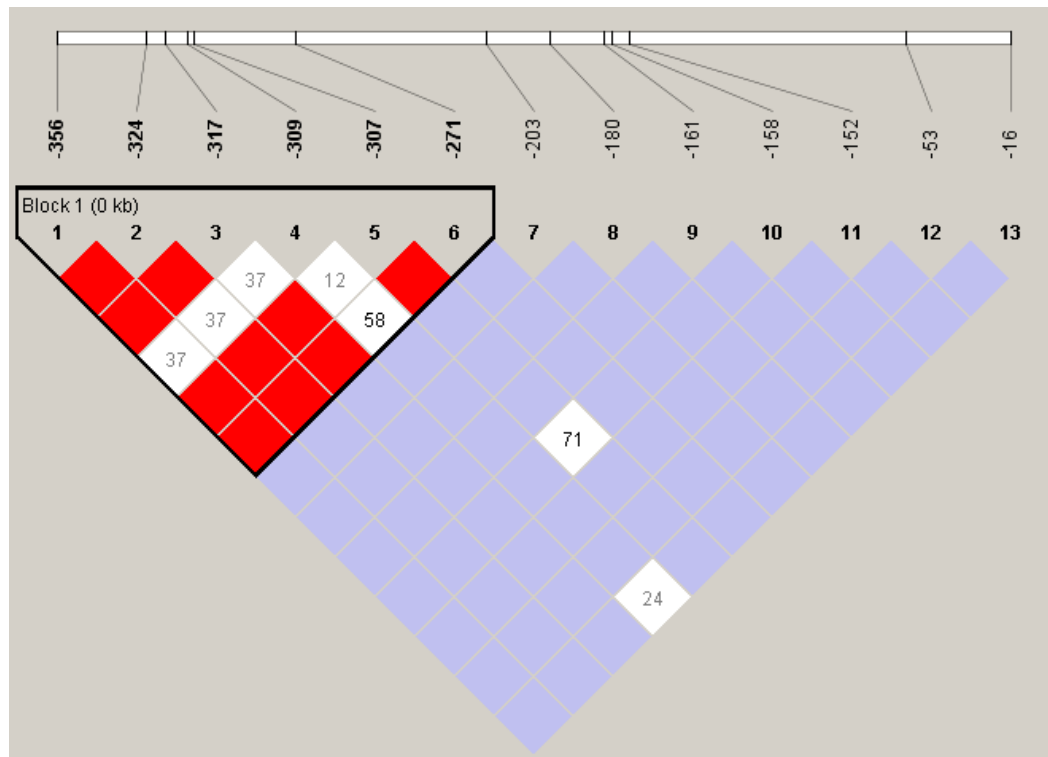


Figura 8 Evaluación del LD de los SNP's de la región promotora de γ -globina en individuos sanos con HbF alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica colombiana. El grado de desequilibrio es representado con un matiz desde blanco a rojo intenso, siendo el rojo indicativo de LD y el blanco evidencia de recombinación. El color azul indica ambigüedad en la estimación del LD.

Con estos datos, se encontraron un total de 15 haplotipos (Hp) para ambos grupos (SS y AA con HbF alta y baja), dentro de los cuales los Hp 01 y Hp 02 presentaron la mayor frecuencia. Para los SS el Hp 01 presentó una frecuencia mayor en individuos con HbF alta que con baja (0.750 Vs. 0.657) mientras que el Hp 02 fue más frecuente en SS con HbF baja que con alta (0.171 Vs. 0.071). En los AA estas diferencias no son tan notorias. Por otra parte el Hp 03 se observó casi en su totalidad en AA, siendo considerablemente mayor su frecuencia en aquellos que presentaban HbF alta y el Hp 04 solo se presentó en los AA con una mayor frecuencia en los que tenían HbF baja. El Hp 05 solo fue encontrado en los SS, mostrando una frecuencia mayor en el grupo de HbF alta. El Hp 06 se encontró en bajas frecuencias en la mayoría de los grupos y los haplotipos Hp 07- Hp 15 fueron observados en pocos individuos, siendo en la mayoría de los casos encontrados en los SS y no en los AA, representados en casi todos los casos por un solo individuo (Tabla 14).

Al comparar las frecuencias haplotípicas en los distintos grupos no se encontraron diferencias significativas entre los individuos enfermos con HbF alta y baja, aunque sí en los controles con HbF alta y baja al igual que en las posibles combinaciones entre los grupos SS y AA bien sea con características hematológicas similares (ej. HbF alta Vs. Alta) o diferentes (HbF alta vs. baja) (Tabla 14).

Tabla 14 Frecuencias haplotípicas en los individuos afectados y sanos con HbF alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica colombiana

Haplotipo	Fr. Relativa	Definición haplotipo	Frecuencia relativa			
			SS HbF ↓	SS HbF ↑	AA HbF ↓	AA HbF ↑
Hp 01	0.673	G C T C G A A T C C G C C C C	0.657	0.750	0.684	0.656
Hp 02	0.145	G C T C G A A T C C G T C C C	0.171	0.071	0.143	0.148
Hp 03	0.072	G C T C G G A T C C G C C C C	0.043	0.000	0.020	0.148
Hp 04	0.031	G C T C G A A T C C G C C C G	0.000	0.000	0.092	0.008
Hp 05	0.025	A C C C A G G C C C G C C C C	0.071	0.107	0.000	0.000
Hp 06	0.022	G C T C G A G T C C G C C C C	0.029	0.000	0.031	0.016
Hp 07	0.006	A C C C A A G T C C G C C C C	0.014	0.036	0.000	0.000
Hp 08	0.003	G T T T G A A T C T A C C C C	0.000	0.000	0.010	0.000
Hp 09	0.003	G C T C G A A T C C A C C C C	0.000	0.000	0.010	0.000

Hp 10	0.003	G C T C G A <u>G</u> T C C G C <u>T</u> C C	0.000	0.000	0.010	0.000
Hp 11	0.003	G C T C G A A T C C G C C <u>T</u> G	0.000	0.000	0.000	0.008
Hp 12	0.003	G C T C G A A T C C G <u>T</u> C C <u>G</u>	0.000	0.000	0.000	0.008
Hp 13	0.003	G C T C G A A T <u>G</u> C G C C C C	0.000	0.000	0.000	0.008
Hp 14	0.003	<u>A</u> C T C <u>A</u> A <u>G</u> T C C G C C C C	0.014	0.000	0.000	0.000
Hp 15	0.003	<u>A</u> C T C G A A T C C G C C C C	0.000	0.036	0.000	0.000
Total (2N)	318	R Y Y Y R R R Y S Y R Y Y Y S	70	28	98	122

*Cuatro individuos fueron descartados del análisis por la ausencia del último SNP's

Tabla 15 Comparación de frecuencia haplotípicas entre individuos SS y AA con HbF alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica de Colombia.

	SS HbF baja	SS HbF alta	AA HbF baja	AA HbF alta
SS HbF baja	-			
SS HbF alta	0.422 ± 0.008	-		
AA HbF baja	0.005 ± 0.001	0.018 ± 0.003	-	
AA HbF alta	0.006 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.00 ± 0.000	-

En la redes haplotípicas (Network) se puede observar que la mayoría de los Hp provienen del Hp 01, en la mayoría de los casos un solo evento mutacional distingue entre haplotipos relacionados. Por otro lado, se puede distinguir una rama lejana del resto de haplotipos formada por los haplotipos que en su mayoría son representados por los individuos con anemia de células falciformes (Figura 9).

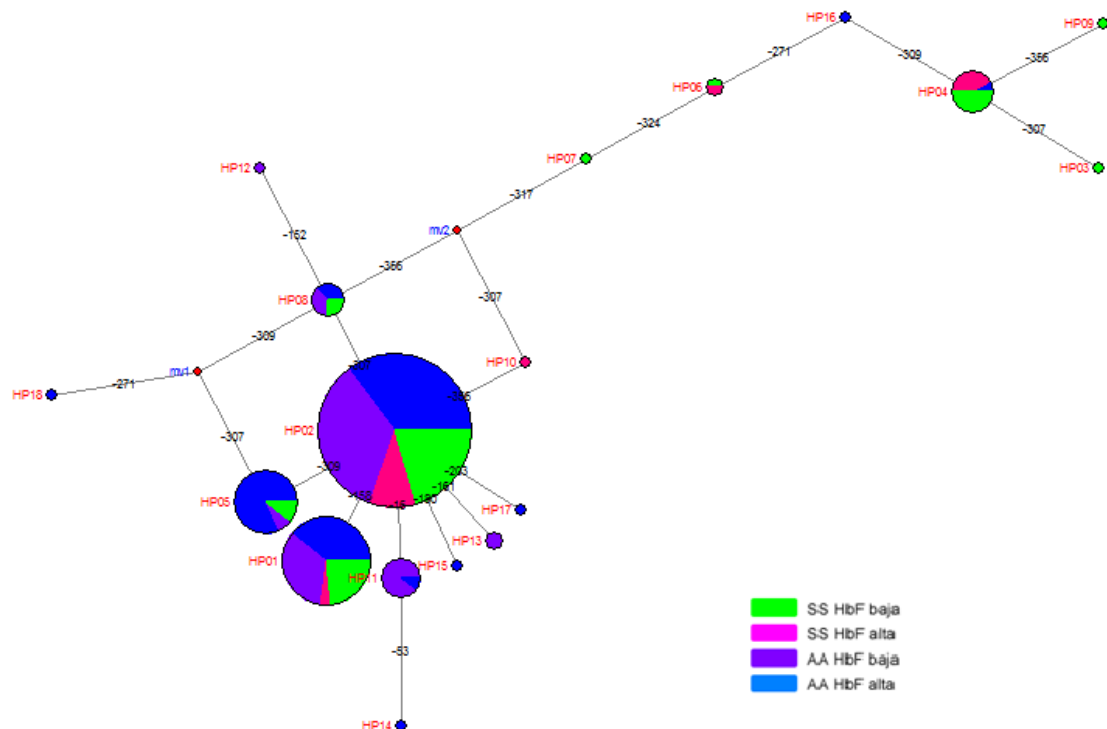


Figura 9 Median Joining Network de haplotipos de la región promotora de γ^G -globina de individuos sanos y afectados con hemoglobina fetal alta y baja de las costas Pacífica y Atlántica de Colombia. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. El nombre de los haplotipos se representa en letra roja mientras que los cambios nucleotídicos en letra negra.

Genotipificación de SNPs mediante la técnica de SNaPshot y RT-PCR

En cuanto a las frecuencias alélicas de los SNPs evaluados por medio de la técnica de mini-secuenciación y PCR en Tiempo Real se encontró lo siguiente: de los siete SNPs evaluados, dos de ellos son monomórficos para esta muestra poblacional (rs7776054 y rs9399137) presentando el mismo genotipo tanto en los individuos sanos como enfermos (AA y TT respectivamente) por lo cual no se tuvieron en cuenta para los posteriores análisis. En los cinco sitios restantes, se observó que las frecuencias alélicas para dos de ellos son diferentes tanto para los controles como los afectados, el rs11886868 es quien más diferencia muestra en cuanto a la frecuencia de los alelos pues el alelo C es mucho más frecuente en los enfermos (0,746) que en los sanos (0,418) mientras que el T es más

frecuente en los sanos (0,582) que en los enfermos (0,254); situación similar ocurre con el rs28384512 donde el alelo A es más frecuente en los controles (0,556) que en los afectados (0,405) y el G más frecuente en los afectados (0,595) que en los controles (0,444) . Los tres sitios restantes presentan una frecuencia similar entre sus alelos en ambos grupos estudiados como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 16 Frecuencias alélicas de los siete SNPs evaluados por medio de SNaPshot Multiplex y PCR en Tiempo Real.

Pop	Allele/n	rs28384512	rs4895441	rs7776054	rs9399137	rs4671393	rs6929404	rs11886868
SS	N	63	63	63	63	63	63	63
	A	0,405	0,762	1,000		0,262		
	C							0,746
	G	0,595	0,238			0,738	0,762	
	T				1,000		0,238	0,254
AA	N	98	98	98	98	98	98	98
	A	0,556	0,842	1,000		0,276		
	C							0,418
	G	0,444	0,158			0,724	0,719	
	T				1,000		0,281	0,582

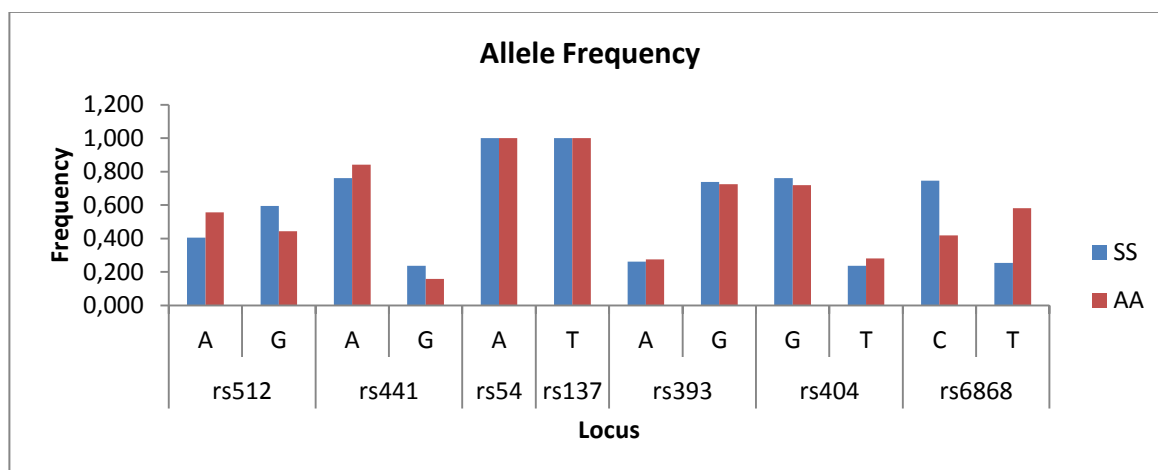


Figura 10 Histograma de las frecuencias alélicas de los SNPs evaluados por medio de SNaPshot Multiplex y PCR en Tiempo real.

Establecidas las frecuencias, se comparó el grupo de enfermos con las frecuencias reportadas en el HapMap que aparecen en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para los

alelos de cada uno de los SNPs evaluados, esto con el fin de establecer que poblaciones de las ahí analizadas tienen una frecuencia alélica similar a esta muestra poblacional colombiana. Las cuatro poblaciones con las cuales se hicieron las comparaciones fueron las siguientes: residentes de Utah con ancestría del Norte y Oeste de Europa (CEU), Chinos Han (CHB), Japoneses (JPT) y Yorubas (YRI), con las cuales se encontró que la muestra poblacional estudiada presenta frecuencias alélicas similares, pues el p valor de la χ^2 fue mayor a 0,05 en todos los SNPs evaluados.

Se estableció que de los cinco SNPs restantes (rs28384512, rs4895441, rs4671393, rs6929404 y rs11886868) sólo tres de ellos (rs28384512, rs4895441 y rs6929404) se encontraban en equilibrio H-W en el grupo de los individuos enfermos (SS), mientras que en los individuos sanos (AA) sólo dos lo estaban (rs28384512 y rs4671393) al presentar un p valor $> 0,05$.

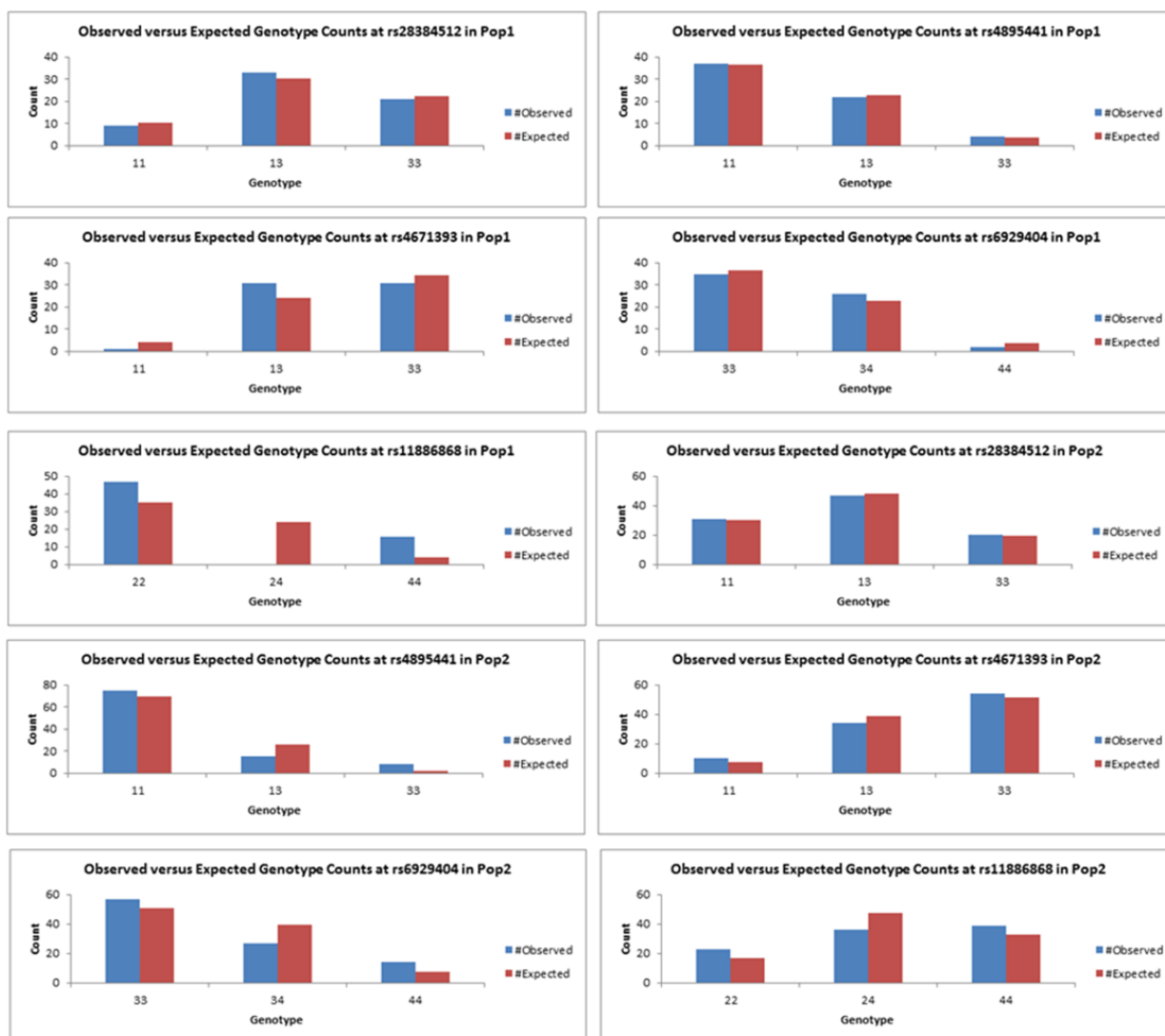


Figura 11 Genotipos observados y esperados para los cinco SNPs que se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en los individuos enfermos y sanos. *Pop1: SS, Pop2: AA (1=A, 2=C, 3=G, 4=T).

Establecidos los SNPs que se encontraban en equilibrio para cada uno de los grupos, se evaluó la normalidad de los datos de la cuantificación de hemoglobina fetal de cada uno de los individuos utilizando la prueba Anderson-Darling; al ser el p valor de los datos $<0,005$ se determinó que no tenían una distribución normal (Figura 12) por lo cual fue necesario transformarlos por medio de Box-Cox lográndose normalizar; sin embargo, aun con los datos transformados los datos no cumplen con la igualdad de varianza (Figura 13), la cual fue evaluada por las pruebas de Barlett y Levene (p valor $< 0,05$), por ello todas las pruebas

para evaluar la existencia de asociación o no entre los SNPs y los niveles de hemoglobina fetal establecidos por medio de PCR tiempo real o SNaPshot fueron no paramétricas.

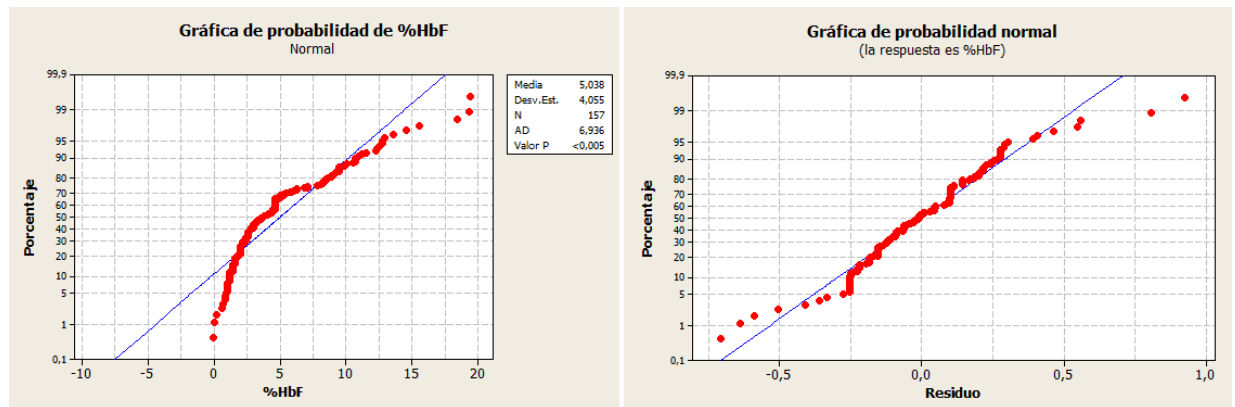


Figura 12 Prueba de Anderson-Darling para evaluar la normalidad de los datos de cuantificación de hemoglobina fetal a) sin transformar, b) transformados por Box-Cox.

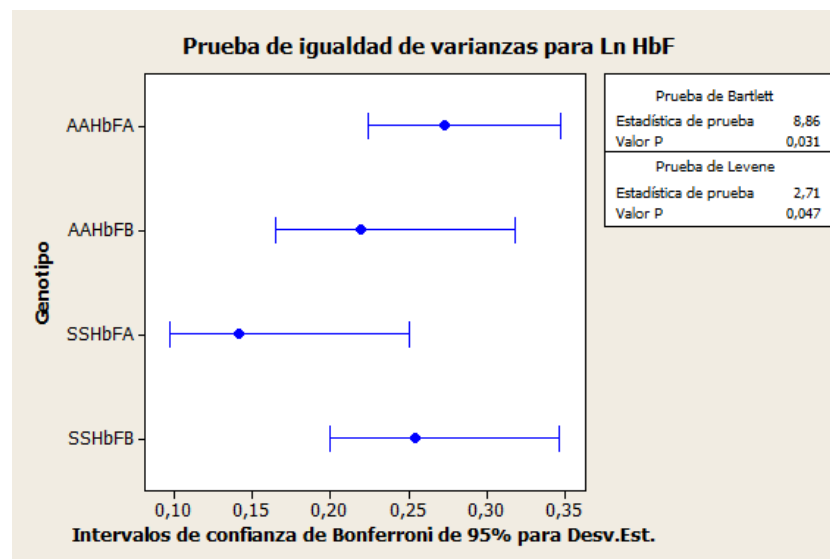


Figura 13 Evaluación de igualdad de varianzas por medio de las pruebas de Barlett y Levene.

Por medio del coeficiente de correlación de Spearman, se quiso establecer si algún SNP de los que están en equilibrio para cada uno de los grupos tenía relación ya fuera con niveles de hemoglobina fetal alta o baja. Como resultado se obtuvo que para el grupo de los sanos el rs28384512 tenía una correlación de -0,439 y un p valor $< 0,001$ con respecto a los niveles de hemoglobina fetal alta, mientras que el mismo SNP presentó una correlación de

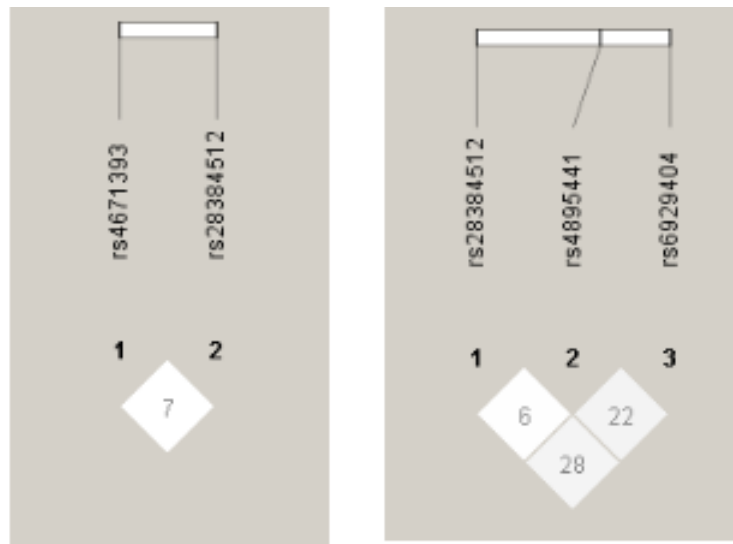


Figura 15 Evaluación del LD de los SNP's ubicados en el cromosoma 2 y 6 en individuos sanos y enfermos de las costas Pacífica y Atlántica de Colombia. El grado de desequilibrio es representado con un matiz desde blanco a rojo intenso, siendo el rojo indicativo de LD y el blanco evidencia de recombinación.

Una regresión múltiple mostró que el rs28384512 fue el único sitio que presentó relación con los niveles de hemoglobina fetal tanto en los individuos con anemia falciforme como los sanos al ser su p valor $<0,05$, ni la edad ni el sexo presentaron asociación para esta característica. Sin embargo, los residuales no tienen una distribución normal para los individuos control como se observa en la figura 16c, por lo tanto se determina que este sitio sólo tiene relación con los niveles de hemoglobina fetal en los individuos enfermos.

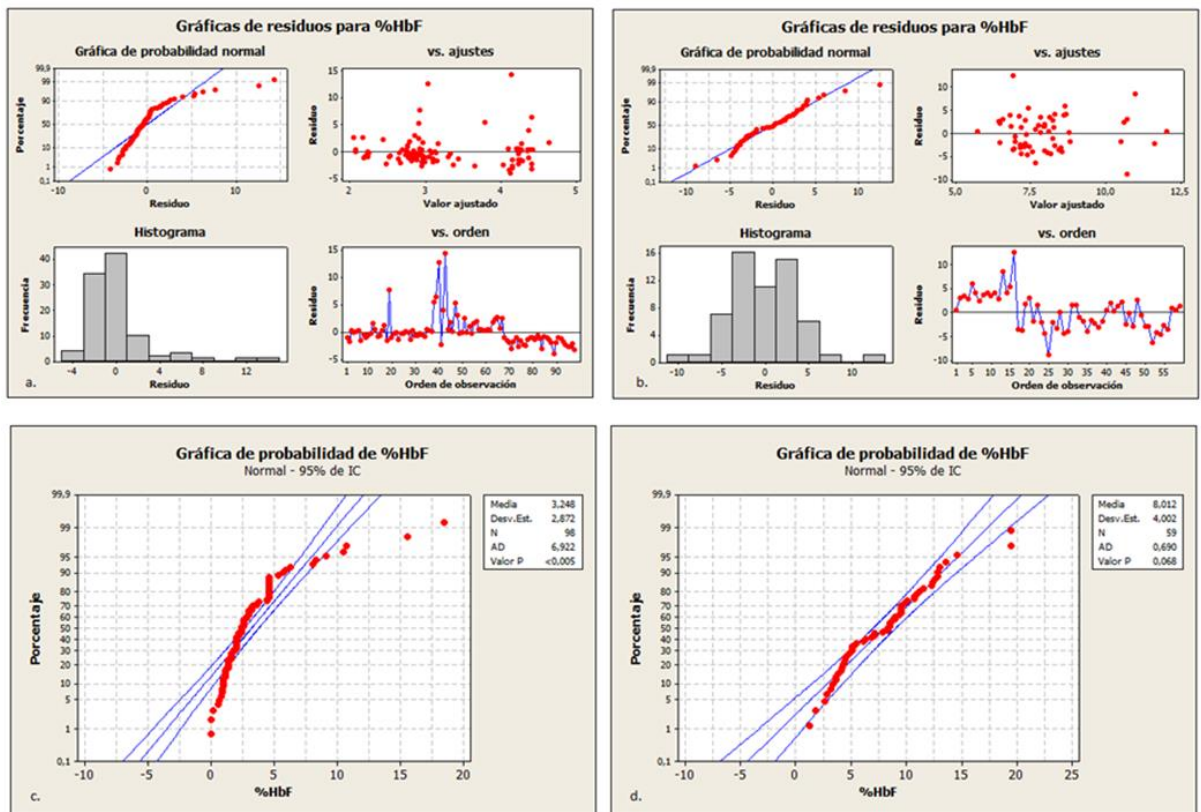


Figura 16 Regresión Múltiple a) individuos sanos, b) individuos enfermos, c) prueba normalidad residuales individuos sanos y d) prueba normalidad residuales individuos enfermos.

Por medio del programa PRECISE se quiso evaluar si cerca al rs28384512 existen elementos reguladores en *cis* que puedan estar involucrados con la modulación de la HbF, sin embargo el elemento más próximo a este sitio (TCCGCC) está a más de 50pb por lo cual se descarta esta posibilidad.

Finalmente se quiso evaluar el papel del rs11886868 aunque no estuviera en equilibrio H-W debido a su importancia y asociación establecida con los niveles de hemoglobina fetal en los pacientes con anemia falciforme, por lo tanto se realizó una correlación de Spearman como con los anteriores sitios y se encontró que efectivamente este sitio está relacionado con los niveles de hemoglobina fetal. Para establecer cuál de los genotipos de ese sitio está marcando la diferencia con respecto a los niveles de hemoglobina fetal se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis encontrando que el genotipo CC es quien más tiene

relación con los niveles de hemoglobina fetal al comparar su media con los otros dos genotipos TT y TC (p valor < 0,001).

DISCUSION

El nivel de hemoglobina fetal en los individuos con anemia falciforme, es el factor que mejor explica la variación en cuanto a la severidad sintomatológica de estos pacientes a lo largo de su vida. La persistencia de HbF y de células F en las poblaciones sanas como afectadas, sugiere que dicha variabilidad no se debe sólo a un gen, sino a una combinación de varios genes en diferentes cromosomas. Por lo tanto, en términos genéticos, los niveles altos de hemoglobina fetal en la adultez se debe a un rasgo cuantitativo, en donde la acción de múltiples genes combinados con el componente medio ambiental, puede explicar la ausencia de un claro patrón de herencia mendeliana (De Souza et al 2011).

Las mutaciones en la región promotora del gen γ^G , en pacientes con hemoglobinopatías como β -talasemias o anemia de células falciformes (SCA) no son suficientes para comprender toda la variación que se ve en la población de afectados (Pérez & Costantini, 1990), por ello se hace necesario evaluar otros sitios polimórficos asociados con esta característica que están ubicados en el locus *HMIP* en el cromosoma 6 (6q23) y el gen *BCL11A* en el cromosoma 2 (2q16), en los cuales la frecuencia de los diferentes marcadores en estos sitios pueden generar información propia para las poblaciones estudiadas.

Para la población en estudio, el componente cultural y étnico está fuertemente influenciado por la población española, africana e indígena, lo cual permite explicar la gran heterogeneidad clínica que existe en los pacientes con drepanocitosis gracias a ese *background* genético único y variado. Por tanto, es de esperarse que la población colombiana en estudio, posea su propia batería de sitios polimórficos asociados con los niveles de hemoglobina fetal, de la cual algunos SNPs pueden ser compartidos con otras poblaciones, como no.

Región promotora del gen γ^G

Para poder establecer esa batería, se empezó a evaluar la región con mayor importancia en la regulación de la expresión de la HbF, la secuencia promotora de γ^G -globina, quien en condiciones normales compone en un 40% la HbF, mientras el otro 60% lo sintetiza el gen γ^A -globina (Teixeira et al. 2003), sin embargo, en pacientes con SCA la presencia de algunos polimorfismos en la región promotora de γ^G -globina está asociados con altos niveles de HbF, incrementando la cantidad de cadenas γ^G en una proporción similar a la encontrada durante el nacimiento ($70 \gamma^G:30 \gamma^A$), lo que aminora los efectos clínicos de la anemia falciforme (De Souza et al. 2011).

Los promotores representan la región necesaria para iniciar la transcripción a nivel basal y la mayoría de estos contienen varios elementos comunes como las cajas TATA, CAAT y algunas islas GC (Klug 2006), las cuales fueron identificadas dentro de la región promotora de γ^G -globina (Figura 4). Sin embargo, no se observaron mutaciones en las cajas TATA ni CAAT posiblemente porque sean sitios muy importantes implicados en la transcripción y disminuyan bruscamente la expresión de la HbF en determinado estado del desarrollo. Lo anterior puede estar indicando que las mutaciones durante el estadio fetal puedan llegar a ser incompatibles con la vida o por lo menos reducir en gran parte las posibilidades del desarrollo del feto, como lo mostró Duan et al. (2002) & Cai et al (1989) en ratones transgénicos con mutaciones en la caja TATA del gen γ -globina y β -globina, donde los niveles de expresión del gen γ -globina fueron diferentes en células eritroides embrionarias y adultas, mientras que la mutación en el gen β -globina generó una disminución considerable en la expresión del gen (ocasionando β^+ -talasemia).

Esta misma tendencia también se ha encontrado en las cajas CACCC y CCAAT de γ -globina en estudios reportados por Li et al. (2006) y Fang et al. (2004), donde se encontró que la expresión de γ -globina es alterada significativamente en presencia de mutaciones en estos elementos regulatorios en células eritroides fetales y adultas. Estos resultados sugieren que las mutaciones en las cajas TATA, CACCC y CCAAT están influenciando la expresión de γ^G -globina de forma importante, disminuyendo el nivel de transcripción, por lo tanto las mutaciones que se puedan presentar en estas cajas pueden ser eliminadas en un

estado temprano del desarrollo y no llegan a ser detectadas en un muestreo como el realizado.

Aunque no se encontraron variaciones en las cajas TATA, CACCC ni CCAAT si se encontraron mutaciones en las islas GC comprendidas entre las posiciones -208 a -200 y entre -58 a -47 (Figura 4). Los SNP's -53 y -203 en ambos casos se caracterizan por presentar un cambio de C por G, lo que lleva a que el sitio de unión de SP1 en el estado adulto se vea alterado y se una con mayor preferencia SSP, siendo este último un activador que aumenta la expresión de γ -globina y por ende aumenta los niveles de HbF, presentando un efecto similar a mutaciones como -50 y -202 previamente reportadas por Jane et al. (1993). Lo anterior se logró observar en los dos individuos sanos heterocigotos para -53 y -203, quienes presentaron una hemoglobina fetal alta (>2%). Sin embargo, no pudieron ser evaluados estadísticamente estos SNP's debido a la baja frecuencia de los mismos en la población (1% para cada uno) (Tabla 13).

No solo los SNP's del promotor que se encuentren dentro de los elementos regulatorios comunes son importantes para alterar la transcripción de γ^G -globina, sino también aquellos encontrados en sitios contiguos, los cuales pueden ser elementos *cis* específicos eritroides como las cajas GATA, potenciadores y represores. En estudios con ratones transgénicos realizados por Liu et al. (2005) se encontró que cambios de una sola base en las posiciones -173 y -175 disminuyen la unión de los factores transcripcionales GATA y Oct-1. Cuando ocurre la mutación en -173 disminuye la unión de GATA pero no de Oct-1 y cuando ocurre en -175 se presenta el efecto contrario. Estos resultados sugieren que la pérdida de unión de cualquiera de los dos sitios pueden causar un aumento en la expresión de las cadenas γ -globina causando *HPFH* cuando el elemento *cis* es un sitio de anclaje para un represor de γ^G . Sin embargo, SNP's en estas regiones no fueron observados en el presente estudio, y en otras poblaciones se encuentran en bajas frecuencias (Stoming et al. 1989), lo cual puede indicar que el tamaño muestral pudo no haber sido lo suficientemente grande para detectar estos cambios, o son mutaciones ausentes en estas poblaciones.

Por otra parte los SNP's observados en las posiciones -324, -317, -307 y -271 en los individuos SS con frecuencias de 0.09, 0.10, 0.13 y 0.07, respectivamente (Tabla 12), fueron encontrados previamente por Barbosa et al. 2010, en donde los tres primeros fueron hallados en un grupo referencia de mestizos mientras que el último también fue hallado en un grupo de afrodescendientes, aunque no fueron encontrados en la región promotora de γ^G -globina sino en la región promotora de γ^A -globina, siendo estas muy similares en secuencia pudiendo tener efectos similares. Sin embargo, ninguno de estos sitios presentó diferencias significativas entre las frecuencias de individuos afectados con hemoglobina fetal alta y baja (Tabla 12), lo cual puede indicar la ausencia de relación entre los niveles de HbF y estos SNP's, o que se requiera de un mayor número de individuos para su evaluación, por lo cual posiblemente sean necesarios más estudios para confirmar si en realidad estos polimorfismos no se relacionan con la HbF.

Así mismo, la mayoría de los SNP's encontrados en esta región en individuos con anemia falciforme, tanto aquellos con HbF alta como baja, no presentaron desviación del equilibrio H-W (Tabla 12). El equilibrio encontrado en los marcadores moleculares ubicados en esta región promotora, indica la ausencia de factores que puedan alterar las frecuencias alélicas observadas respecto a las esperadas bajo apareamiento aleatorio, tamaños poblacionales grandes, selección o una estructuración de la población, lo que confirma una ausencia significativa del efecto de estos SNP's respecto al aumento de HbF en individuos con SCA por lo cual no se da un efecto de selección.

Respecto al SNP -158 no se observó equilibrio H-W (Tabla 12), ocasionado por un exceso de homocigotos y disminución de heterocigotos en la población estudiada, lo que puede deberse a la subestructura genética de la población o a un continuo flujo genético en la misma (Mesa et al 2000)

A pesar del exceso de homocigotos presentados en el SNP's -158 no se presentaron diferencias significativas respecto al grupo de afectados con HbF alta y baja (Tabla 12), lo que puede estar indicando que el posible efecto de selección sea ocasionado por ligamiento con un SNP (diferentes a los analizados en este estudio) que presente una relación con los

niveles de HbF o que simplemente no exista selección sobre este alelo. En los estudios realizados por Galarneau et al. (2010) y confirmado por Akinsheye et al. 2012 se relacionaron SNP's con los niveles de HbF en donde el primer grupo de investigación uso una re-secuenciación y genotipificación en afroamericanos con drepanocitosis para caracterizar las asociaciones con los niveles de HbF en *BCL11A*, *HBS1L-MYB* y en el cluster de β -globina donde confirmaron el efecto independiente de la mayoría de los SNP's. No obstante, sugieren que el SNP rs10128556 presenta efectos significativos sobre la HbF y puede presentarse ligado con rs7482144 (-158) y por ende este SNP se reporta en algunas ocasiones relacionado con el aumento de la HbF. Así mismo, ellos también indicaron que probablemente rs7482144 (-158) no es una variante causal de los niveles de HbF en los afro-americanos con SCA. De igual modo Akinsheye et al. 2012 observó estos mismos SNPs mostrando que se encontraban en completo desequilibrio de ligamiento.

Por otro lado, se encontró el SNP -356 tanto en pacientes con HbF baja y alta con una frecuencia para el alelo A de 0.11 y 0.21 respectivamente, el cual no mostró diferencias significativas y no ha sido reportado para otras poblaciones (Tabla 12).

Al igual que los individuos con anemia falciforme la mayoría de los SNP's en los individuos sanos no mostraron diferencias significativas entre los grupos con HbF alta y baja (Tabla 12), lo que indica que estos sitios no son importantes para la unión de factores de regulación transcripcionales de γ -globina. No obstante el SNP -16, mostró diferencias significativas donde se puede ver claramente que el cambio del alelo C→G influye disminuyendo la transcripción de γ -globina y por tanto la expresión de la HbF (Figura 6), así mismo en el SNP -309 se encontraron diferencias significativas, pero esta vez observando que el alelo raro o mutado (A→G) aumenta la HbF (Figura 5) (Tabla 13).

El SNP -16 altera una posible caja CACCC posicionada entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción, entre las posiciones -19 y -15, convirtiendo el elemento regulatorio CACCC → CACGC, por lo tanto este cambio puede provocar la disminución de la ventaja de expresión de γ -globina y ocasionar una disminución en la síntesis de HbF. Es importante tener en cuenta que este SNP no fue visto en ningún individuo con anemia

falciforme, posiblemente a causa de que el alelo mutado (G) pase ligado al alelo normal de HbS o que el efecto de este alelo sea muy adverso en individuos afectados y cause serias complicaciones clínicas.

Por otra parte, el SNP -309 fue detectado en individuos SS y AA (Tabla 12 y 13) pero el aumento de la HbF solo se observó en los individuos AA. Esta tendencia fue previamente reportada por Barbosa et al. (2010) en un grupo de pacientes con SCA de Brasil, quienes en presencia del alelo mutado presentaron niveles más altos de HbF, pero no encontraron diferencias significativas. Esto indica que el sitio -309 puede representar un elemento de importancia para la modulación de HbF, pero este efecto puede ser dependiente de poblaciones, requiriendo de más estudios para confirmar su efecto modulador.

Los SNP's -309 y -16 indican que los elementos regulatorios de la HbF son diferenciales en cromosomas S (HbS) y cromosomas A (HbA), y a pesar de no ser significativos en la modulación de la HbF en individuos SS pueden ser de suma importancia para ocultar los síntomas causados por el cromosoma afectado (S) en individuos heterocigotos (SA), pues se estaría sintetizando HbF gracias a la presencia de estos sitios en el cromosoma sano, lo cual disminuiría aún más la probabilidad de llegar a presentar síntomas.

También es necesario mencionar que se descubrieron los SNP's -325, -322, -168, -161 y -152, de quienes no se encontró ningún reporte en otras poblaciones, ni relación con la HbF, posiblemente debido a su baja frecuencia (Tabla 13). No obstante, si se vio una tendencia a que ciertos SNP's se hallaran en los individuos control con HbF baja (-325, -322, -168, -161 y -152) mientras que otros se encontraron en los de HbF alta (-203 y -53 “descritos anteriormente”).

El análisis de ligamiento (LD) mostró un débil y/o ambiguo ligamiento entre los SNP's de los individuos sanos en contraste con un fuerte ligamiento para los individuos enfermos (Figura 7 y 8), lo cual fue muy similar a lo encontrado por Liu et al. (2009) para un panel de SNP's que abarcaban el cluster de β -globina. Sin embargo en general se evidenció la formación de un bloque de ligamiento importante entre los SNP's comprendidos desde -356 hasta -161, y desde el SNP -158 se observa cierta ambigüedad en el ligamiento, lo cual

explica el haber encontrado desviación del equilibrio H-W para este último sin obtener el mismo resultado para los otros SNP's. De igual manera tanto en individuos sanos como enfermos el SNP -309 mostró evidencia de cierto grado de independencia, hecho por el cual se halló un efecto modulador sobre la HbF en este sitio pero no en los contiguos (Figura 7, 8 y Tabla 14).

En cuanto a los haplotipos, estos mostraron resultados muy similares a los encontrados para los loci por separado, encontrándose haplotipos típicos para los individuos con drepanocitosis como Hp 05, 07, 14 y 15; típicos para los individuos sanos como Hp 04, 08, 09, 10, 11, 12 y 13; y compartidos como Hp 01, 02, 03, 06 (Tabla 14 y Figura 9). Estos no arrojaron diferencias significativas entre individuos enfermos con HbF alta y baja, lo cual indica que, al igual que los SNP's por separado, los haplotipos no son significativos para la regulación de la HbF en afectados (Tabla 12). En individuos sanos el panorama es distinto, presentando diferencias significativas entre aquellos con HbF alta y baja, conferidos por las diferencias en las frecuencias de los Hp 03 y 04 (Tabla 14 y 15). Estos dos Hp son caracterizados por un único SNP, -309 para el Hp 03 y -16 para el Hp 04. En general se puede asumir que el efecto de los SNPs por separado son más informativos que los haplotipos como tal, debido a que en la mayoría de los casos se presenta una sola variación en la secuencia y cuando se presenta más de un cambio en el haplotipo solo uno de los cambios puede ser de relevancia en la modulación de la HbF (SNPs -309 y -16) (Tabla 14).

Finalmente al evaluar las redes haplotípicas se pueden evidenciar que la mayoría de haplotipos derivan de un evento mutacional desde el Hp 01, y de estos a su vez se ramifican otros a partir de otro evento mutacional. En general los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser ancestrales, presentando múltiples conexiones con otros haplotipos con menor frecuencia, y los nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos. Se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución (presenten individuos sanos y enfermos con HbF alta y baja), y los derivados posean una única conexión a haplotipos del mismo grupo (Vázquez-Domínguez et al. 2009). Esto puede indicar que el Hp 05 provenga de una región distinta y este sea otro punto ancestral de donde derivaron los Hp 07 y 14, por tal motivo se esperaría que la mayoría de los

individuos portadores de estos Hp sean además portadores de los Hp ligados a HbS Benin (Lanclos et al. 1991). Esto pone en evidencia el origen diferencial de los Hp de la región promotora de γ^G -globina, y podría ser una explicación de porqué se encuentran diferencias significativas entre los Hp de los individuos control y los afectados con características hematológicas similares, como también porque hay sitios de regulación que son importantes para los individuos sanos y no para los individuos con anemia falciforme.

Genotipificación de SNPs en la región intergénica *HBS1L-MYB* y el gen *BCL11A*

Como se mencionó anteriormente, existen otros determinantes genéticos responsables de aumentar la HbF que no están ligados al cluster de la β -globina, hecho que pudo establecerse gracias a estudios genéticos llevados a cabo en gemelos, donde se demostró que aunque cerca del 90% de la variación de la HbF en los adultos esta genéticamente controlada, del 50 al 60% de esa variación no está ligada al cluster del cromosoma 11. Uno de los otros sitios que se han relacionado con la variación de este tipo de hemoglobina es la región intergénica *HBS1L-MYB* (*HMIP*) en el cromosoma 6q23, sitio que se relacionó como modulador de la HbF en dos poblaciones diferentes, una china y otra norte-europea, en las cuales una región de 56kb con tres bloques en LD, mostró que SNPs como rs4895441 y rs4671393 (cada uno en un bloque diferente) se relacionan con la HbF, convirtiéndose en marcadores informativos (So et al 2008). Por otro lado, el loci *BCL11A* es otra región en el genoma que explica en cierto porcentaje los niveles de hemoglobina fetal en los individuos, tal como se demostró en la población de Tanzania, donde los alelos en este locus para los rs11886868 y rs4671393 resultaron en una marcada disminución de los valores de la media de HbF para los genotipos que tenían el alelo menor, donde el 12.8% de la varianza del rasgo pudo ser explicado solamente por el rs4671393. Un impacto similar se registró para los pacientes africano-británicos, los africano-americanos y los africano-brasileros (Makani 2011).

Es por eso que estas dos regiones fueron evaluadas también a través de cinco SNPs en la región *HMIP* (rs28384512, rs4895441, rs7776054, rs9399137 y rs6929404) y dos en el locus *BCL11A* (rs4671393 y rs11886868).

Al comparar las frecuencias de los SNPs evaluados con aquellas del HapMap, se encontró que los siete SNPs evaluados tuvieron frecuencias similares a las reportadas en las diferentes poblaciones del HapMap: CEU, HCB, JPT y YRI. La similitud con la población europea (CEU) se pudo explicar por su LD moderado comparado con otras poblaciones, por lo tanto, SNPs que se encuentren en la muestra de población europea es fácilmente extrapolable a toda la población ya que la poca estructura genética y la alta similitud genética entre los europeos permite estas aproximaciones. En las poblaciones mezcladas, los genomas individuales se pueden ver como mosaicos de segmentos ancestrales, donde los diferentes segmentos provienen de diferentes poblaciones parentales que participaron en ese proceso de mezcla (Rosenberg et al 2011). Estas poblaciones suelen tener una alta variabilidad entre los individuos y es por ello que es posible ver como esta muestra poblacional colombiana presenta frecuencias similares con las comparadas en el HapMap.

Así como el equilibrio Hardy-Weinberg para alguno de los SNPs ubicados en la región promotora fue variable, de los siete SNPs evaluados en la región intergénica y en el gen *BCL11A*, sólo tres en la población enferma se encontraban en equilibrio, lo que implicó buscar sólo asociación con los niveles de hemoglobina fetal en los SNPs ubicados en la región *HMIP* (rs28384512, rs4895441 y rs6929404), mientras que en los sanos se evaluaron sólo dos SNPs localizados en el gen *BCL11A* y la región intergénica (rs4671393 y rs28384512). Esto da pie a pensar que como en el caso de la región promotora, además de la presencia de estos SNPs pueden existir otros factores independientes a estos marcadores moleculares que estén modulando los niveles de la hemoglobina fetal, puede estar ocurriendo un proceso de selección o estar presentándose un continuo flujo genético, igualmente se ha visto que poblaciones ancestrales pudieron presentar endogamia como en San Basilio de Palenque (Bolívar) lo que también ha podido influenciar que esta población no se encuentre en equilibrio. Además, las frecuencias observadas de algunos genotipos en algunos sitios polimórficos son nulos como el caso del rs11886868 en los individuos enfermos, donde se esperaba tuvieran una alta frecuencia de heterocigotos (CT).

Uno de los SNPs que juegan un papel muy importante en la población africana en cuanto a la modulación de la hemoglobina fetal es el rs9399137 ubicado en el locus *HIMP*. Sin

embargo fue necesario que estudios en tanzanos y africanos europeos se llevaran a cabo para corroborar su importancia, ya que en la población europea este sitio no juega un papel importante. Su asociación se vio reflejada en los pacientes que presentan el haplotipo Benin y el haplotipo Bantu, los cuales no tienen el alelo A en el sitio *XmnI*, y sin embargo seguían presentando niveles de hemoglobina fetal alta (Makani et al 2011). En nuestra población colombiana, tanto sana como enferma, este SNP no fue informativo pues para ambos grupos este sitio fue monomórfico (TT) al igual que el sitio rs7776054 (AA) (siendo ambos alelos los ancestrales), por ello es preciso decir que estos SNPs no juegan un papel importante en la modulación de la hemoglobina fetal en la población colombiana.

Aunque con anterioridad se había reportado que los rs28384513 y rs9399137 se asocian independiente a la HbF, se encontró que el rs4895441 es una nueva variante genética asociada a la variación en los niveles de HbF en el locus *HBS1L-MYB* en la población Cerdeña y de descendencia europea, el cual funciona como un buen predictor de las crisis dolorosas y ACS (síndrome agudo de pecho) en pacientes con anemia falciforme; de manera interesante, los SNPs rs9399137 y rs4895441 están muy cercanos (8kb separados) y solo fueron identificados porque los patrones de LD en esa región genómica es diferente entre las poblaciones de ancestría europea y africana (Lettre et al 2008). Sin embargo, a pesar de su marcada importancia en poblaciones con descendencia africana o europea, en el presente trabajo, no se encontró asociación de este SNP en el grupo de afectados, así como tampoco para el rs6929404, otro SNP “tag” ubicado en el tercer bloque del locus *HMIP*.

De los SNPs importantes asociados a la modulación de la hemoglobina fetal, el rs11886868 en el locus *BCL11A* es clave, sin embargo, se ha visto que su implicación en la modulación se ve restringida a la población de estudio, pues en población brasilera, aunque cierto porcentaje es explicado por este SNP, es el rs4671393 quien mayormente se ve asociado con los niveles de la HbF en las poblaciones con anemia falciforme (Lettre et al 2008), este sitio sólo estaba en equilibrio en la población sana, y no presentó asociación con ninguno de los niveles de hemoglobina fetal, probablemente por el tipo de individuos en los cuales se estaba evaluando. Sin embargo es importante tener en cuenta que el tamaño de la

muestra pudo ser insuficiente, no siendo posible evidenciar posibles asociaciones en la población colombiana como si ha ocurrido en muchas otras.

La única asociación que se observó entre un SNP y los niveles de hemoglobina fetal fue en el rs28384512 tanto en los individuos afectados como sanos. Gracias al coeficiente de correlación de Spearman se observó que los niveles de hemoglobina fetal altos en los controles pueden estar relacionados con la presencia del alelo ancestral (A), mientras que el alelo alterno (G) puede estar relacionado con niveles bajos de niveles de esta hemoglobina tal como se observó en los pacientes. Estos resultados fueron corroborados en el análisis de componentes principales, donde en los individuos sanos se agrupan los niveles de HbF alta, el genotipo AA para el rs28384512 y las mujeres mientras que en los individuos enfermos se agrupa el genotipo GG del rs28384512 con los niveles de hemoglobina fetal baja, así como también posiblemente el genotipo GG del rs6929404, el genotipo AA del rs4895441 los adolescentes y el sexo masculino. Una regresión lineal múltiple también corroboró la asociación de éste SNP ubicado en la región intergénica con los niveles de hemoglobina fetal en los individuos con anemia falciforme.

En cuanto a información de este SNP, se encuentra en la región intergénica de los genes *HBS1L-MYB* a 8pb del rs28384513, SNP que se ha visto implicado en la regulación de la hemoglobina fetal en varias poblaciones como la Cerdeña (Thein et al 2009), así como en pacientes con anemia falciforme en Afro-americanos y Brasileños, siendo el genotipo AA quien tiene mayor relación con los niveles de HbF altos (Fanis et al 2014), sin embargo no se ha establecido su modo de acción en la red de modulación de este tipo de hemoglobina, no se conocen cajas o elementos de transcripción implicados en este sitio, sólo se logró predecir una caja a más de 50pb del SNP asociado por lo cual es poco probable que ejerza algún tipo de influencia.

Lo anterior demuestra el problema de utilizar las variantes europeas como variantes de riesgo para otras poblaciones debido a su poca variación genética. Las poblaciones varían en términos de frecuencias alélicas, adaptaciones biológicas y otras propiedades que afectan la detección e importancia de variables de riesgo. Muchas observaciones sugieren que una

sola población es insuficiente para cubrir totalmente las variantes que están detrás de una enfermedad en todas las poblaciones ya que las variables de riesgo pueden diferir en ocurrencia entre poblaciones pues una variable de este tipo puede ocurrir solo en ciertas poblaciones, además, aún si la misma variable está presente en diferentes poblaciones, las frecuencias alélicas pueden diferir. Las historias particulares de recombinación, mutación y divergencia de las líneas genealógicas en las diferentes poblaciones también pueden influenciar la facilidad con la cual una variante puede ser mapeada, por lo tanto una variante puede ser más fácilmente mapeada en una población que en otra (Rosemberg et al 2011).

Por otro lado, los niveles de hemoglobina fetal pueden tener diferencias en cuanto a la prevalencia entre las poblaciones, aquí también el tamaño de la muestra es clave para detectar variantes con un efecto pequeño, hecho que puede explicar la no asociación de los diferentes SNPs evaluados con los niveles de hemoglobina fetal. Igualmente, las variantes de riesgo pueden tener diferentes tamaños efectivos en las diferentes poblaciones, por lo tanto pueden existir variaciones entre las poblaciones bajo los mismos factores determinantes básicos de la misma enfermedad. Finalmente, dado que las variantes raras tienen usualmente un origen más reciente, y por lo tanto no han tenido suficiente tiempo para incrementar su frecuencia y volverse comunes, suelen ser más sectorizadas o estar localizadas geográficamente, por lo cual las poblaciones separadas van a tender a diferir en su colección de alelos raros que en los comunes (*Op cit*).

Los marcadores escogidos explican en diferentes porcentajes la asociación con este factor modulador de la enfermedad según la población evaluada, encontrándose en algunas de ellas resultados que varían notoriamente con lo ya establecido como ocurre en el intrón del cromosoma 2, en este locus el rs11886868 es quien en la mayoría de casos ha mostrado asociaciones con los niveles de hemoglobina fetal, especialmente el genotipo CC (Afro-americanos, Brasileños, Sardos y Franceses) (Fanis et al 2014), y por lo tanto se evalúa por defecto. En este caso, el no equilibrio de este sitio no permitió incluirlo en el resto de los análisis, sin embargo es tal su importancia como marcador, que fue analizado sólo para corroborar si lo reportado concuerda con lo encontrado en la muestra poblacional

colombiana, encontrando que efectivamente esta sitio tenía relación con los niveles de hemoglobina fetal al hacer la correlación de Spearman, siendo el genotipo CC el implicado en esa modulación, hecho que concuerda con lo reportado en otras poblaciones donde la asociación es significativamente más frecuente en pacientes con una enfermedad media comparada con pacientes que dependen de transfusiones cuando la variante genética en el gen *BCL11A* rs11886868 es el alelo C (Menzel & Thein 2009).

En cuanto al desequilibrio de ligamiento, los SNPs evaluados en los individuos enfermos ubicados en la región intergénica no lo estaban como era de esperarse, pues ya se ha establecido que estos tres SNPs se encuentran cada uno en un bloque diferente entre los cuales existe LD (Menzel et al 2007). En cuanto al desequilibrio de los SNPs evaluados en los individuos sanos ambos sitios están en cromosomas diferentes y para las diferentes poblaciones en las cuales se han evaluado tampoco se han encontrado en LD (Sedgewick et al 2008). Con lo anterior, se asume que en nuestra población existen eventos de recombinación entre estos marcadores, por lo cual se puede inferir que el SNP que está asociado con los niveles de hemoglobina fetal en esta muestra poblacional no está limitado a la presencia o no de cierto genotipo en los otros SNPs evaluados en este estudio.

CONCLUSIONES

Los individuos sanos y enfermos presentan diferencias significativas en cuanto a los niveles de hemoglobina fetal.

Los SNP's encontrados en la región promotora de γ^G -globina para los individuos con drepanocitosis no se relacionaron con los niveles de HbF ya que ninguno de estos se presentó en un elemento transcripcional importante para la regulación. Mientras que para los individuos sanos los SNP's -309 y -16 mostraron relación con la HbF lo que muestra que estos elementos regulatorios son importantes para la expresión de cadenas γ -globina en individuos sanos.

Los SNP's ubicados en la región promotora de γ^G que están modulando la HbF en los individuos con anemia de células falciformes son diferentes a los SNP's que modulan en los individuos sanos, posiblemente por la interacción con otros factores genéticos propios de cada grupo como también por factores asociados a su condición patógena.

Posiblemente el polimorfismo -158 (rs7482144) no se asocie directamente con los niveles de HbF en personas enfermas, ya que la mayoría de la muestra poblacional presenta el haplotipo Benin o Bantu, haplotipos en los cuales el alelo asociado (T) con los niveles en la HbF está ausente, igualmente tanto en afectados como en sanos es posible que este sitio actúe bajo ligamiento con otro SNP que si presente relación con los niveles de HbF y -158 solo represente un marcador étnico.

Evaluar SNPs en otras regiones genómicas que también se han visto implicadas en la regulación de la hemoglobina fetal como la región intergénica *HBS1L-MYB* y el locus *BCL11A* es importante, pues esto permitió establecer cuáles SNPs funcionan como reguladores en nuestra población y cuáles no.

Extrapolar los resultados de otras poblaciones a otra en estudio no es algo válido, el *background* genético implica que puedan existir variaciones genéticas funcionales que van a marcar o no diferencias en la característica estudiada, tal es el caso de la muestra aquí estudiada, en la cual marcadores genéticos asociados en muchas poblaciones de origen

africano y europeo no mostraron asociación como moduladores de la hemoglobina fetal en esta muestra poblacional.

El rs28384512 ubicado en la región intergénica *HBS1L-MYB*, juega un papel importante en la regulación de la hemoglobina fetal tanto en los individuos sanos como con anemia falciforme en la población colombiana.

PERSPECTIVAS

Aumentar el tamaño de muestras en las cuales se incluyan otros lugares de la Costa Pacífica y Atlántica, esto con el fin de ampliar el número de individuos con anemia falciforme y observar si las frecuencias de los alelos y haplotipos se mantiene o caso contrario estas frecuencias varían y se logra ver el efecto de los SNP's sobre los individuos enfermos.

Secuenciar la región promotora del gen $\text{A}\gamma$ -globina para determinar si los SNP's encontrados en el promotor de $\text{G}\gamma$ -globina se asocian o en otras palabras están ligados y afecta la expresión de cadenas γ -globina aumentando o disminuyendo los niveles de HbF en personas enfermas y sanas. Además para establecer si realmente los SNP's encontrados dentro de $\text{G}\gamma$ -globina son los que actúan sobre la expresión de la HbF o por el contrario solo son los de $\text{A}\gamma$ -globina.

Evaluar otros factores regulatorios en la región intergénica *HBS1L-MYB* y *BCL11A* que también están asociados con la modulación de la HbF.

BIBLIOGRAFÍA

- AHITUV, N. 2012. Gene Regulatory Sequences and Human Disease. Springer. 283 páginas.
- AHMED, S. & ANWAR, M. 2005. XmnI γ - Polymorphism in Six Unrelated Pakistani Families With Inv/Del γ ($\gamma\delta\beta$) o $\delta\beta$ -Thalassemia. American Journal of Hematology, 80:303-305.
- AKINSHEYE I., SOLOVIEFF, N., NGO, D., MALEK, A., SEBASTIANI, P., STEINBERG, M.H. & CHUI, D.H.K. 2012. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. American Journal of Hematology, doi: 10.1002/ajh.22221.
- ALEXANDER N., HIGGS D., DOVER, G & G. SERGEANT. 2004. Are there clinical phenotypes of homozygosis sickle cell anemia disease?. British Journal of Hematology. 126:606-61.
- ATILLA, G., ERAP YALIN, S., TULI, A., YALIN, E. & AKSOY, K. 2004. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in twin pregnancies and identification by VNTRs. Clinica Chimica Acta 350: 137-142.
- AZEVEDO M., VICARI, P., FERNANDES, A., GUIMARÃES, G. & FIGUEIREDO, M. 2006. XmnI polymorphism is associated with fetal hemoglobin levels in hypoplastic syndromes. Sao Paulo Medical Journal, 124(2): 110-111.
- BAILEY, K., S. MORRIS, P. THOMAS, G.R. SERJEANT. 1992. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. Archives of Disease in Childhood 67: 517-520.
- BARBOSA, C.G., GONÇALVES-SANTOS N.J., SOUZA-RIBEIRO S.B., MOURA-NETO J.P., TAKAHASHI, D., SILVA, D.O., HURTADO-GUERRERO, A.F., REIS, M.G. & GONÇALVES, M.S. 2010. Promotor Region Sequence Differences in A and G Gamma

Globin Genes of Brazilian Sickle Cell Anemia Patients. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 43(8): 705-711

BERNAL, M., A. GIRALDO, A. BERMUDEZ & E. MORENO. 1995. Estudio de la frecuencia de hemoglobinopatías en las islas de San Andrés y Providencia, Colombia. Biomédica 15 (1): 5-9.

CAI, S-P., ZHANG, J-Z., DOHERTY, M. & KAN, Y.W. 1989. A New TATA Box Mutation Detected at Prenatal Diagnosis for β -Thalassemia. American Journal Human Genetics, 45: 112-114.

CHANG Y.C.; SMITH, K.D.; MOORE, R.D.; SERGEANT, G.R. & DOVER, G.J.1995. An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender and age. Blood Journal, 85(4): 1111-1117.

CREARY, L., ULUG, P., MENZEL, S., McKENZIE, C., HANCHARD, N., TAYLOR, V., FARRALL, M., FORRESTER, T., & S.L. THEIN. 2009. Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients. PLoS ONE 4(1): e4218.

CUERVO, A. 1984. Determinación de la frecuencia del rasgo falciforme en la población de Bajo Calima, Buenaventura. Tesis de pregrado. Cali- Colombia, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 74 páginas.

DA CUNHA, A., BRUGNEROTTO, A., FINZI CORAT, M., DEVLIN, E., GIMENES, A., BARBOSA DE MELO, M., CORRÊA PASSOS, L. BODINE, D., SAAD, S. & COSTA, F. 2009. High Levels of Human γ -Globin are Expressed in Adult Mice Carrying a Transgene of the Brazilian Type of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin ($A\gamma$ -195). Hemoglobin, 33(6):439–447.

DANE. 2007. Colombia una nación multicultural: Su diversidad étnica. Dirección de censos y demografía. Disponible en: < http://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/colombia_nacion.pdf>

DE SOUZA, G., ANTONIAZZO, P. & BONINI-DOMINGOS, C. 2011. What influences Hb Fetal production in adulthood? Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy, 33(3):231-6.

DELGADO-BURBANO, M.E. 2006. Historia Poblacional, Orígenes Africanos y Microevolución de los Actuales Afro-colombiano Inferidos desde Caracteres Epigenéticos En La Dentición Decidua y Permanente. Revista Argentina de Antropología Biológica, 8(1): 85-109.

DOVER, G. J., K. D. SMITH, Y. C. CHANG, S PURVIS, A MAYS, D. A. MEYERS, C. SHEILS & G. SERJEANT. 1992. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. Blood 80: 816-824.

DUAN, Z-J., FANG, X., ROHDE, A., HAN, H., STAMATOYANNOPOULOS., G & LI, Q. 2002. Developmental specificity of recruitment of TBP to the TATA box of the human γ -globin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(8): 5509-5514.

EDOH D., C. ANTWI-BOSAIKO, & D. AMUZU. 2006. Fetal hemoglobin during infancy and in sickle cell adults. African Health Sciences 6(1): 51-54.

ENVER T, RAICH N, EBENS AJ, PAPAYANNOPOULOU T, COSTANTINI F, & STAMATOYANNOPOULOS G 1990. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. Nature;344(6264):309-313.

FANG, X., HAN, H., STAMATOYANNOPOULOS, G. & LI, Q. 2004. Developmentally Specific Role of the CCAAT Box in Regulation of Human γ -Globin Gene Expression. The Journal of Biological Chemistry, 279(7): 5444-5449

FANIS, P., KOUSIAPPA, I., PHYLACTIDES, M. & M. KLEANTHOUS. 2014. Genotyping of BCL11A and HBS1L-MYB SNPs associated with fetal haemoglobin levels: a SNaPshot minisequencing approach. *BMC Genomics*, 15:108.

FERTRIN KY, COSTA FF. 2010. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol*. 3(4):443–58.

FILIPE A., LI, Q., DEVEAUX, S., GODIN, I., ROMEO, P.-H., STAMATOYANNOPOULOS, G. & MIGNOTTE, V. 1999. Regulation of embryonic/fetal globin genes by nuclear hormone receptors: a novel perspective on hemoglobin switching. *EMBO Journal*, 18(3): 687-697.

FONG, C. 2007. Caracterización molecular de la hemoglobina en pacientes del sur-occidente colombiano. Tesis de pregrado. Universidad del Valle.

FUCHAROEN , S., SHIMIZU, K & FUKUMAKI, Y. 1990. A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the γ -globin gene in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression. *Nucleic Acids Research*, 18(17): 5245-5253.

FUCHAROEN, S., SIRITANARATKUL, N., WINICHAGOON, P., CHOWTHAWORN, J., WIPAPUN, S., MUANGSUP, W., SUCHET, C., POOLSUP, N., CHINDAVIJAK, B., POOTRAKIL, P., PIANKIJAGUM, A., SCHECHETER, A., & G. RODGERS. 1996. Hydroxyurea increases Hemoglobin F levels and improves the effectiveness of erythropoiesis in β -thalassemia/Hemoglobin E disease. *Blood*, 87 (3): 887-892.

GALARNEAU, G., PALMER, C.D., SANKARAN, V.G., ORKIN, S.H., HIRSCHHORN, J.N. & LETTRE, G. 2010. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nature Genetics*, 42(12): 1049-1051.

GARNER CP, TATU T, BEST S, CREARY L, THEIN SL. 2002. Evidence of genetic interaction between the β -globin complex and chromosome 8q in the expression of fetal hemoglobin. *Am J Hum Genet.*;70 (3):793-9.

GONÇALVES, M., G. C. BOMFIM, E. MACIEL, I. CERQUEIRA, I. LYRA, A. ZANETTE, G. BOMFIM, E. ADORNO, A. ALBUQUERQUE, A. PONTES, M. DUPUIT, G. FERNANDES & M. DOS REIS. 2003. β S –Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia; Northeastern Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological research 36: 1283-1286.

GUMUCIO, D. L., K. L. ROOD, T. A. GRAY, M. F. RIORDAN, C. I. SARTOR & F. S. COLLINS. 1988. Nuclear proteins that bind the human gamma-globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. Molecular and Cellular Biology 8 (12): 5310-5322.

HARJU, S.; McQueen, K.J. & K. PETERSON. 2002. Chromatin structure and control of β -like globin gene switching. Exp. Biol. Med. Vol 227 (9):683-700.

HOPPE, C., KLITZ, W., CHENG, S., APPLE, R., STEINER, L., ROBLES, L., GIRARD, T., VICHINSKY, E & STYLES, L. 2004. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. Blood Journal, 103(6): 2391-2396.

INGRAM, V.M. 1957. Gene mutations in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. Nature vol.180:326-328.

JANE, S.M., GUMUCIO, D.L., NEY, P.A., CUNNINGHAM, J.M. & NIENHUIS, A.W. 1993. Methylation-Enhanced Binding of Sp1 to the Stage Selector Element of the Human γ -Globin Gene Promoter May Regulate Developmental Specificity of Expression. Molecular and Cellular Biology, 13(6): 3272-3281.

JARAMILLO, M., SÁENZ, I., PEREIRA, F. 1997. Tamizaje para anemia de células falciformes en recién nacidos del Hospital Universitario del Valle y del Hospital Mario Correa Renjifo. Actual pediátr, 7(1): 3-13.

JAWAID K, WAHLBERG K, THEIN SL, BEST S. 2010 Binding patterns of BCL11A in the globin and GATA1 loci and characterization of the BCL11A fetal hemoglobin locus. *Blood Cells Mol Dis*, 45(2):140-146.

KAMATANI Y, MATSUDA K, OKADA Y, KUBO M, HOSONO N, DAIGO Y, NAKAMURA Y, & KAMATANI N. 2010. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat. Genet.* 42:210–215.

KATO, G., M. GLADWIN & M. STEINBERG. 2007. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development. *Blood reviews* 21: 37-47.

KAUL, D., M. E. FABRY & R. L. NAGEL. 1996. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood reviews* 10: 29-44.

KLUG, W.S., CUMMINGS, M.R. & SPENCER, C.A. 2006. *Conceptos de Genética*. Octava edición. Pearson. 920 páginas.

LANCLOS, KD., ONER, C., DIMOVSKI, AJ., GU, YC. & HUISMAN, TH. 1991. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the G gamma- and A gamma-globin genes of beta S chromosomes with five different haplotypes. *Blood Journal*, 77: 2488-2496.

LANGDOM, S.D & KAUFMAN, R.E. 1998. Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers. *Blood Journal*, 91 (1): 309-318.

LEIKIN, S., D. GALLAGHER, T. KINNEY, D. SLOANE, P. KLUG, W. RIDA & COOPERATIVE STUDY OF SICKLE CELL DISEASE. 1989. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatrics* 84 (3): 500-507.

LETTRE, G., V. G. SANKARAN, M. A. C. BEZERRA, A. S. ARAUJO, M. UDA, S. SANNA, A. CAO, D. SCHLESSINGER, F. F. COSTA, J. N. HIRSCHHORN, & S.H. ORKIN. 2008. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 105(33): 11869-11874.

LI, L. R., Z. W. DU, H. L. ZHAO, X. L. LIU, X. D. HUANG, J. SHEN, L. M. JU, F. D. FANG, J. W. ZHANG. 2005. T to C substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding in vitro differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 280 (9):7452-7459.

LI, Q., FANG, X., OLAVE, I., HAN, H., YU, M., XIANG, P. & TAMATOYANNOPOULOS, G. 2006. Transcriptional potential of the g-globin gene is dependent on the CACCC box in a developmental stage-specific manner. *Nucleic Acids Research*, 34(14): 3909-3916.

LIBERATI, C., CERA, M.R., SECCO, P., SANTORO, C., MANTOVANI, R., OTTOLENGHI, S., & RONCHI, A. 2001. Cooperation and Competition between the Binding of COUP-TFII and NF-Y on Human epsilon- and gamma-Globin Gene Promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (45): 41700-41709.

LIU, L., DU, Z-W., ZHAO, H-L., LIU, X-L., HUANG, X-D., SHEN, J., JU, L-M., FANG, F-D. & ZHANG, J-W. 2005. T to C Substitution at -175 or -173 of the γ -Globin Promoter Affects GATA-1 and Oct-1 Binding in Vitro Differently but Can Independently Reproduce the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Phenotype in Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (9): 7452-7459.

LIU, L., MURALIDHAR, S., SINGH, M., SYLVAN, C., KALRA, I.S., QUINN, C.T., ONYEKWERE, O.C. & PACE, B.S. 2009. High-density SNP genotyping to define β -globin locus haplotypes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42: 16-24.

LYRA, I., GONCALVES, J.PELLEGRINEI, M. GESTERRA, M. CARVASTRO, S.OLALLA, M. FIGUEREIDO & F. COSTA. 2005. Clinical hematological and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients for two different cities in Brazil. *Cod. Saude publica* 21(4): 1287-1920.

MAKANI, J., MENZEL, S., NKYA, S., COX, S., DRASAR, E., SOKA, D., KOMBA, A., MGAYA, J., ROOKS, H., VASAVDA, N., FEGAN, G., NEWTON, C., FARRALL, M., &

- S.L., THEIN. 2011. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood*. 117 (4):1390-1392.
- MENZEL, S. & S.L THEIN. 2009. Genetic architecture of hemoglobin F control. *Hematology*. 16:179-186.
- MENZEL, S., JIANG, J., SILVER, N., GALLAGHER, J., CUNNINGHAM, J., SURDULESCU, G., LATHROP, M., FARRALL, M., SPECTOR, T.D & S.L. THEIN. 2007. The HBS1L-MYB intergénica region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet and monocyte counts in humans. *Blood*. vol.110 (10):3624-3626.
- MESA NR, MONDRAGÓN MC, SOTO ID, PARRA MV, DUQUE C, ORTÍZ-BARRIENTOS D. 2000. Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre-and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am J Hum Genet*. Elsevier; 67(5):1277–86.
- MILLER, S. A., DYKES D.D. & POLESKY H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16(3): 1215.
- NAGEL RL, FABRY ME, PAGNIER J, et al. 1985. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa: the Senegal type and the Benin type. *N Engl. J Med*;312(14):880-884.
- NGUYEN, T.K.T., JOLY, P., BARDEL, C., MOULSMA, M., BONELLO-PALOT N., & A. FRANCINA. 2010. The XmnI G γ polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 β -thalassemia intermedia patients. *Blood cells, Mol, and Diseases*. 45 (2): 124-127.
- PAULING, L., H. ITANO, S. J. SINGER & I. WELLS. 1949. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 110(2865): 543-548.
- PEREIRA, F. & I. SÁENZ. 1996. Hemoglobinopatías en niños. *Colombia Médica* 27(3-4):146-149.

- PEREZ, C. & COSTANTINI, F. 1990. Roles of Fetal γ -Globin Promoter Elements and the Adult β -Globin 3' Enhancer in the Stage-Specific Expression of Globin Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 10 (3):1116-1125.
- PLATT, O., D. BRAMBILLA, W. ROSSE, P. MILNER, O. CASTRO, M. STEINBERG & P. KLUG. 1994. Mortality in sickle cell disease-Life expectancy and risk factors for early death. *The New England Journal of Medicine* 330 (23): 1639-1644.
- POURFARZAD, F. 2010. γ -Globin Reactivation. Doctor. Erasmus University Rotterdam. 163 páginas.
- PROVAN, D. & GRIBBEN, J. 2010. *Molecular Hematology*. Tercera edición. Blackwell Publishing Ltd. 428 páginas.
- QUINN, C., N. LEE, E. SHULL, N. AHMAD, Z. ROGERS & G. BUCHANAN. 2008. Prediction of Adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas newborn cohort. *Blood* 111: 544-548.
- RAYMOND M & F ROUSSET. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- RONCHI, A., NICOLIS, S., SANTORO, C. & OTTOLENGHI, S. 1989. Increased Sp1 binding mediates erythroid-specific overexpression of a mutated (HPFH) γ -globulin promoter. *Nucleic Acids Research*, 17 (24): 10231-10235.
- RONDÓN, F., OSORIO, J.C., PEÑA, A.V., GARCÉS, H.A. & BARRETO, G. 2008. Diversidad genética en poblaciones humanas de dos regiones colombianas. *Colombia Médica*, 39 (Supl 2): 52-60.
- ROSENBERG, N., HUANG, L., JEWETT, E., SZPIECH, Z., JANKOVIC, I., & M. BOEHNKE. 2011. Genome-wide association studies in diverse populations. *Nature*. 11: 356-366.

RYAN, T.M., SUN, C-W., REN, J. & TOWNES T.M. 2000. Human γ -globin gene promoter element regulates human β -globin gene developmental specificity. *Nucleic Acids Research*, 28 (14): 2736-2740.

SALAS, A., ACOSTA, A., ÁLVAREZ-IGLESIAS, V., CEREZO, M., PHILLIPS, C. LAREU, V. & CARRACEDO, Á. 2008. The mtDNA Ancestry of Admixed Colombian Populations A. *American Journal of Human Biology*, 20: 584-591.

SAMPIETRO, M., THEIN, SL., CONTRERAS, M. & PAZMANY, L. 1992. Variation of HbF and F-cell number with the G-gamma Xmn I (C-T) polymorphism in normal individuals [letter]. *Blood Journal*, 79 (3): 832-833.

SEEDGEWICK, A., TIMOFEEV, N., SEBASTIANI, P., SO, J., MA, E., CHAN, L.C., FUCHAROEN, G., FUCHAROEN, S., BARBOSA, C., VARDARAJAN, B., FARRER, L., BALDWIN, C., STEINBERG, M., & D. CHUI. 2008. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with β -hemoglobinopathies. *Blood, Cells, Molecules and Diseases*. vol 41(3): 255-258.

SILVA, J. R., D. MALAMBO, D. F. SILVA, E. FALS, O. FALS & J. REY. 1998. Tamizaje de hemoglobinopatías en una muestra de la población infantil de Cartagena. *Pediatría* 33(2): 86-89

SINGER, K., A. I. CHERNOFF & L. SINGER. 1951. Studies on Abnormal Hemoglobins: I. Their Demonstration in Sickle Cell Anemia and Other Hematologic Disorders by Means of Alkali Denaturation. *Blood* 6: 413-428.

SO J., SONG, Y-Q., TSANG, S., TANG, L-F., CHAN, A., MA, E. & L-C., CHAN. 2008. The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is a quantitative trait locus controlling foetal haemoglobin level in beta thalassaemia carriers. *J. Med.Genet.* vol 45 (11): 745-751.

SOLOVIEFF, N., MILTON, J.N., HARTLEY, S.W., SHERVA, R., SEBASTIANI, P., DWORKIS, D.A., KLINGS, E.S., FARRER, L. A., GARRETT, M.E., ASHLEY-KOCH,

A., TELEN, M.J FUCHAROEN, S. YIN HA, S., CHI-KONG LI, CHUI, D.H., BALDWIN, C.T. & STEINBERG, M. 2009. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. *Blood Journal*, 115: 1815-1822.

SOLOVIEFF, N., MILTON, J.N., HARTLEY, S.W., SHERVA, R., SEBASTIANI, P., DWORKIS, D.A., KLINGS, E.S., FARRER, L.A., GARRETT, M.E., KOCH, A.A., TELEN, M.J., FUCHAROEN, S., YIN HA, S., LI, C.K., CHUI, D., BALDWIN, C. & M.H. STEINBERG. 2010. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. *Blood*. vol 115 (9): 1815-1822.

STEFFLOVA, K., DULIK, M.C., BARNHOLTZ-SLOAN, J.S., PAI, A.A., WALKER, E.H. & REBBECK, T.R. 2010. Dissecting the Within-Africa Ancestry of Populations of African Descent in the Americas, *PLoS ONE*, 6(1): e14495.

STEINBERG M.H. 2009. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Sci World J*, 9:46-67.

STEINBERG M.H, & NAGEL R.L. 2009. Genetic modulation of sickle cell disease and thalassemia. *Pathophysiology and clinical management*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 638-657.

STOMING, T.A., STOMING, G.S., LANCLOS, K.D., FEI, Y.J., ALTAY, C., KUTLAR, F. & HUISMAN, T.H.J. 1989. An $A\gamma$ Type of Nondeletional Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin With a T→C Mutation at Position -175 to the Cap Site of the $A\gamma$ Globin Gene. *Blood Journal*, 73(1): 329-333.

STUART, M. & R. NAGEL. 2004. Sickle-cell disease. *Lancet* 364:1343-1360.

SUZUKI, M., YAMAZAKI, H., MUKAI, H., MOTOHASHI, H., SHI, L., TANABE, O., ENGEL, J. & M. YAMAMOTO. 2013. Disruption of the HBS1L-MYB locus causes

hereditary persistence of fetal hemoglobin in mouse. *Molecular Cell Biology*. 33(8): 1687-1695.

SYKES, K & KAUFMAN, R. 1989. A Naturally Occurring Gamma Globin Gene Mutation Enhances SP1 Binding Activity. *American Society for Microbiology*, 10 (1): 95-102.

TANABE, O., KATSUOKA, F., CAMPBELL, A.D., SONG, W., YAMAMOTO, M., TANIMOTO, K., & ENGEL, J.D. 2002. An embryonic/fetal beta-type globin gene repressor contains a nuclear receptor TR2/TR4 heterodimer. *EMBO Journal*, 21 (13): 3434-3442.

TANABE, O., MCPHEE, D., KOBAYASHI, S., SHEN, Y., BRANDT, W., JIANG, X., CAMPBELL, A.D., CHEN, Y-T., CHANG, C.S., YAMAMOTO, M., TANIMOTO, K. & ENGEL J.D. 2007a. Embryonic and fetal beta-globin gene repression by the orphan nuclear receptors, TR2 and TR4. *EMBO Journal*, 26 (9): 2295-2306.

TANABE, O., SHEN, Y., LIU, Q., CAMPBELL, A.D., KUROHA, T., YAMAMOTO, M. & ENGEL, J.D. 2007b. The TR2 and TR4 orphan nuclear receptors repress Gata1 transcription. *Genes & Development*, 21: 2832-2844.

TEIXEIRA, S.M., CORTELLAZZI, L.C. & GROTTTO, H.Z.W. 2003. Effect of hydroxyurea on G gamma chain fetal hemoglobin synthesis by sickle-cell disease patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36 (10): 1289-1292.

THEIN, S.L, & S. MENZEL. 2009. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology*, 145. 445-467.

THEIN, S.L., MENZEL, S., PENG, X., BEST, S., JIANG, J., CLOSE, J., SILVER, N., GEROVASILLI, A., PING, C., YAMAGUCHI, M., WAHLBERG, K., ULUG, P., SPECTOR, T., GARNER, C., MATSUDA, F., FARALL. M. & M. LATHROP. 2007. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *PNAS*. 104 (27): 11346-11451.

THEIN, SWEE LAY. 2013. Genetic association studies in β -hemoglobinopathies. Hematology. vol 2013. (1): 354-361.

UDA, M., GALANELLO, R., SANNA, S., LETTRE, G., SANKARAN, V.G., CHEN, W., USALA, G., BUSONERO, F., MASCHIO, A., ALBAI, G., PIRAS, M.G., SESTU, N., LAI, S., DEI, M., MULAS, A., CRISPONI, L., NAITZA, S., ASUNIS, I., DEIANA, M., NAGARAJA, R., PERSEU, L., SATTA, S., CIPOLLINA, M.D., SOLLAINO, C., MOI, P., HIRSCHHORN, J.N., ORKIN, S.H., ABECASIS, G.R., SCHLESSINGER, D. & CAO, A. 2008. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 (5): 1620-1625.

ULRICH, M.J., GRAY, W.J. & LEY, T.J. 1992. An Intramolecular DNA Triplex Is Disrupted by Point Mutations Associated with Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. The Journal of Biological Chemistry, 267 (26): 18649-18658.

VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., CASTAÑEDA-RICO, S., GARRIDO-GARDUÑO, T. & GUTIÉRREZ-GARCÍA T.A. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. Revista Chilena de Historia Natural, 82: 277-297.

WAKELEY, J., NIELSEN, R., NEEN, S., LIU-CORDERO. & ARDLIE, K. 2001. The Discovery of Single-Nucleotide Polymorphisms and Inferences about Human Demographic History. The American Society of Human Genetics, 69:1332-1347.

WALL, L., DESTROISMAISONS, N., DELVOYE, N. & GUY, L-G. 1996. CAAT/Enhancer-binding Proteins Are Involved in β -Globin Gene Expression and Are Differentially Expressed in Murine Erythroleukemia and K562 Cells. The Journal of Biological Chemistry, 271 (28): 16477-16484

WILBER, A., NIENHUIS, A.W. & PERSONS, D.A. 2011. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. Blood Journal, 117 (15): 3945-3953.

WOOD, W.G., G. STAMATOYANNOPOULOS, G. LIM, P.E. NUTE. 1975. F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of Hb F. Blood 46 (5): 671-682.

ANEXOS

ANEXO A



INFORME DE CONSENTIMIENTO.

Título del proyecto: COMPARACION DE LAS FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS LIGADOS A LA HEMOGLOBINA S EN DOS POBLACIONES COLOMBIANAS Y SU APLICACIÓN COMO MARCADOR DE SEVERIDAD PARA ANEMIA FALCIFORME.

Investigadores: Cristian Javier Fong Reales, María Alejandra Lizarralde, John Díaz y Guillermo Barreto.

Institución: Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, sección de Genética, Laboratorio de Genética Molecular Humana. Ciudadela universitaria Meléndez- Edificio 320 Oficina 4040- A.A. 25360.

La Universidad del Valle a través del Laboratorio de Genética Molecular Humana, está desarrollando un estudio genético sobre la detección de la mutación causante de la anemia falciforme y de los patrones mutacionales (haplotipos) ligados a esta enfermedad por medio de herramientas moleculares.

El proyecto tiene como objetivos los siguientes puntos desarrollar un método genético que permita predecir hasta cierto punto las complicaciones clínicas que individuos con anemia falciforme puedan sufrir.

De igual forma se quiere saber si las características genéticas de los enfermos con anemia falciforme que se encuentran en la Costa Pacífica colombiana son iguales o diferentes a las características presentes en los enfermos de la costa atlántica.

Este trabajo también pretende saber que tan diferente son a nivel genético los afectados con anemia falciforme y si estas diferencias están relacionadas con la variación de síntomas que tiene esta enfermedad.

La participación consiste en suministrar voluntariamente por parte del paciente la información pertinente al diagnóstico de Anemia falciforme. Además de proporcionar una muestra de sangre periférica (4 ml) para el análisis genético molecular pertinente. Las muestras de sangre serán tomadas por personal del laboratorio de hematología o clínico de cada institución remitente, con todas las normas asépticas que implica el procedimiento. La manipulación, procesamiento y almacenamiento temporal de las muestras, serán responsabilidad de los investigadores del Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle el manejo de las muestras se realizará cumpliendo todas las normas de bioseguridad y sanitarias pertinentes. Al finalizar el estudio las muestras serán desechadas. La extracción de la sangre no ocasionará riesgos adversos para la salud, psicológica o fisiológica del paciente, tampoco tendrá contradicciones de ningún tipo, ni afectara ningún tratamiento al que este siendo sometido el paciente. Las muestras serán rotuladas mediante códigos que solo conocerán los investigadores. En ningún momento y bajo ninguna circunstancia se podrán revelar los resultados de los pacientes a terceros, como tampoco se utilizaran los nombres de los pacientes en alguna publicación que genere el proyecto. El folder con los códigos de las muestras y el que tiene la información clínica serán mantenidos bajo llave por el investigador principal (Dr. Guillermo Barreto).

Los resultados se entregarán de forma personal y por escrito a lo cual le seguirá un proceso de consejería genética en donde se le explicará al paciente las implicaciones de los resultados en su vida diaria y el riesgo de recurrencia en sus familiares.

La participación del paciente en el presente proyecto no implicará ningún costo relacionado con las pruebas de laboratorio que se van a realizar.

Habiendo escuchado la anterior información acepto participar como voluntario en el estudio bajo las condiciones expuestas, reservándome el derecho a retirarme en cualquier momento sin justa causa y sin previo aviso.

NOMBRE: _____ cc No. _____

FIRMA: _____ HUELLA DIGITAL

LUGAR Y FECHA: _____

Testigo 1

NOMBRE: _____ cc No. _____

FIRMA: _____

DIRECCIÓN: _____

LUGAR Y FECHA: _____

Testigo 2

NOMBRE: _____ cc No. _____

FIRMA: _____

DIRECCIÓN: _____

LUGAR Y FECHA: _____



INFORME DE CONSENTIMIENTO

Titulo del proyecto: EVALUACIÓN DEL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG PARA LA HEMOGLOBINA S EN UNA MUESTRA POBLACIONAL DE BUENAVENTURA, COLOMBIA.

Investigadores: Diana Carolina Ortega, Cristian Fong Reales y Guillermo Barreto Rodríguez.

Institución: Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, sección de Genética, Laboratorio de Genética Molecular Humana. Ciudadela universitaria Meléndez- Edificio 320 Oficina 4040- A.A. 25360.

La Universidad del Valle a través del Laboratorio de Genética Molecular Humana, está desarrollando un estudio genético sobre el estado actual del gen para la hemoglobina S, asociado a la enfermedad de células falciformes, en la zona urbana de la ciudad de Buenaventura.

El proyecto tiene como objetivos: verificar si la frecuencia de heterocigotos para HbS se mantiene según el equilibrio Hardy-Weinberg o existe un exceso; establecer frecuencias para HbS en la población urbana de Buenaventura para adultos y niños entre los 5 y 10 años; y finalmente, comparar las frecuencias observadas y esperadas para los distintos genotipos AA, SA y SS en niños y adultos, determinando si ha ocurrido selección y sobredominancia para eficacia entre estos.

La participación consiste en suministrar voluntariamente por parte del paciente la información pertinente al diagnóstico de Anemia falciforme. Además de proporcionar una muestra de sangre periférica (4 ml) para el análisis genético molecular pertinente. Las muestras de sangre serán tomadas por auxiliares de enfermería y estudiantes del proyecto

capacitados para toma de muestra. La manipulación, procesamiento y almacenamiento temporal de las muestras, serán responsabilidad de los investigadores del Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle el manejo de las muestras se realizará cumpliendo todas las normas de bioseguridad y sanitarias pertinentes. Al finalizar el estudio las muestras serán desechadas.

La extracción de la sangre no ocasionará riesgos adversos para la salud, psicológica o fisiológica del paciente, tampoco tendrá contradicciones de ningún tipo, ni afectará ningún tratamiento al que este siendo sometido el paciente. Las muestras serán rotuladas mediante códigos que solo conocerán los investigadores. En ningún momento y bajo ninguna circunstancia se podrán revelar los resultados de los pacientes a terceros, como tampoco se utilizarán los nombres de los pacientes en alguna publicación que genere el proyecto. El folder con los códigos de las muestras y el que tiene la información clínica serán mantenidos bajo llave por el investigador principal (Dr. Guillermo Barreto).

Los resultados se entregarán de forma personal y por escrito a lo cual le seguirá un proceso de consejería genética en donde se le explicará al paciente las implicaciones de los resultados en su vida diaria y el riesgo de recurrencia en sus familiares.

La participación del paciente en el presente proyecto no implicará ningún costo relacionado con las pruebas de laboratorio que se van a realizar.

Habiendo escuchado la anterior información acepto participar como voluntario en el estudio bajo las condiciones expuestas, reservándome el derecho a retirarme en cualquier momento sin justa causa y sin previo aviso.

NOMBRE: _____ cc No. _____

FIRMA: _____

HUELLA DIGITAL

DIRECCIÓN: _____

LUGAR Y FECHA: _____

Testigo 1

NOMBRE: _____ cc No. _____

FIRMA: _____

DIRECCIÓN: _____

LUGAR Y FECHA: _____

Testigo 2

NOMBRE: _____ cc No. _____

FIRMA: _____

DIRECCIÓN: _____

LUGAR Y FECHA: _____