

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para la amplificación del fragmento rs35532010 presente en el gen de la beta globina”


Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autores:

Axel Joffrey Rodriguez Bravo
Miguel Alexander Valle Soledispa

Directora:

Vivian Alejandra Neira Molina

ORCID:  0000-0002-1615-0746

Cuenca, Ecuador

2023-11-07

Resumen

Las talasemias son enfermedades hereditarias que resultan de defectos genéticos que causan una alteración en la síntesis de las cadenas de globina. La β -talasemia engloba un conjunto de mutaciones que provocan defectos en las cadenas β -globina. La mutación 27/28 +C, se caracteriza por la inserción de un nucleótido de citosina que provoca un cambio en el marco de lectura del gen dando lugar a la β -talasemia. Aunque se han reportado pocos casos en países donde la prevalencia de β -talasemia es muy alta, la información sobre esta mutación en Latinoamérica resulta escasa. Sin embargo, datos no publicados han identificado esta mutación de forma prevalente en la población ecuatoriana. El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo principal estandarizar un protocolo PCR para la amplificación del polimorfismo rs35532010 del gen de la hemoglobina subunidad beta (HBB). Se emplearon muestras de ADN comercial y cebadores específicos para amplificar el fragmento del gen en donde se ubica dicha mutación. Se realizaron tres distintos protocolos para la estandarización, siendo el primer ensayo el que permitió establecer las condiciones ideales de 1 μ l de ADN diluido a 80ng/ μ l, a una temperatura de alineación 64°C, para la identificación del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Sin embargo, se recomienda el uso de gel de poliacrilamida, de mayor resolución y amplio rango de separación, para mejorar la visualización de las bandas. La estandarización de este protocolo será de gran utilidad para una posterior secuenciación y así determinar el estado de cigosidad alélica en pacientes con β -talasemia.

Palabras clave: enfermedades hereditarias, mutación, protocolo, estandarización



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Thalassemias are hereditary diseases resulting from genetic defects that cause an alteration in the synthesis of globin chains. The β -thalassemia encompasses a group of mutations that cause defects in the β -globin chains. The 27/28 +C mutation, is characterized by the insertion of a cytosine nucleotide that causes a change in the reading frame of the gene resulting in β -thalassemia. Although few cases have been reported in countries where the prevalence of β -thalassemia is very high, information on this mutation in Latin America is scarce. However, unpublished data have identified this mutation as prevalent in the Ecuadorian population. The main objective of this titration work was to standardize a PCR protocol for the amplification of the rs35532010 polymorphism of the hemoglobin beta subunit (HBB) gene. Commercial DNA samples and specific primers were used to amplify the fragment of the gene where this mutation is located. Three different protocols were performed for standardization, being the first assay the one that allowed establishing the ideal conditions of 1 μ l of DNA diluted at 80ng/ μ l, at an alignment temperature of 64°C, for fragment identification by electrophoresis in 2% agarose gel. However, the use of polyacrylamide gel, of higher resolution and wide separation range, is recommended to improve the visualization of the bands. Standardization of this protocol will be of great utility for subsequent sequencing to determine allelic zygosity status in patients with β -thalassemia.

Keywords: hereditary diseases, mutation, protocol, standardization,



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	14
1.1. Antecedentes	14
1.2. Problemática	15
1.3. Justificación.....	16
1.4. Objetivos	17
1.4.1. Objetivo General	17
1.4.2. Objetivos específicos	17
2. Marco teórico	18
2.1. Herencia genética	18
2.2. Hemoglobina	18
2.3. Hemoglobinopatías	20
2.3.1. Presentaciones clínicas de las hemoglobinopatías	21
2.4. Talasemia.....	22
2.5. β -talasemia.....	22
2.5.1. Definición	22
2.5.2. Epidemiología	24
2.5.3. Etiología	25
2.5.4. Clasificación	25
2.5.4.1 β -talasemia mayor	26
2.5.4.2 β -talasemia intermedia.....	26
2.5.4.3 β -talasemia menor	27
2.5.5. Fisiopatología.....	27
2.5.6. Manifestaciones clínicas y complicaciones.....	28
2.5.7. Diagnóstico	28
2.5.7.1 Diagnóstico hematológico.....	28
2.5.7.2 Diagnóstico molecular	29
2.5.8. Mutaciones.....	29
2.5.9. Tratamiento	30
2.6. Mutación "CD 27/28 +C" - Polimorfismo rs35532010	31
2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31

2.7.1.	Fundamento	31
2.7.2.	Componentes.....	32
2.7.2.1	Muestra de ADN	32
2.7.2.2	Taq polimerasa	32
2.7.2.3	Soluciones amortiguadoras o buffers.....	33
2.7.2.4	Oligonucleótidos de cadena sencilla o "Primers"	33
2.7.2.5	Desoxinucleósidos trifosfatos	33
2.7.2.6	Cloruro de magnesio.....	33
2.7.2.7	Agua	33
2.7.2.8	Termociclador	34
2.7.3.	Etapas	34
2.7.3.1	Desnaturalización	34
2.7.3.2	Hibridación o alineamiento	34
2.7.3.3	Extensión o elongación.....	34
3.	Metodología.....	36
3.1.	Diseño y tipo de estudio	36
3.2.	Diseño de los primers/cebadores	36
3.3.	Cuantificación del ADN.....	37
3.4.	Estandarización de la técnica de PCR	37
3.4.1.	Estandarización de la concentración de ADN.....	37
3.4.2.	Estandarización de la cantidad de ADN.....	38
3.4.3.	Estandarización de la temperatura de alineación	39
3.5.	Electroforesis	42
4.	Resultados y discusión	43
4.1.	Preparación de los primer/cebadores	43
4.2.	Cuantificación ADN.....	43
4.2.1.	Fluorimetría.....	43
4.2.2.	Espectrofotometría.....	43
4.3.	Estandarización de la técnica de PCR	44
4.4.	Discusión final.....	46
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	50
5.1.	Conclusiones.....	50
5.2.	Recomendaciones	51
6.	Referencias	52

Índice de figuras

Figura 1: Estructura cristalina de la hemoglobina	19
Figura 2: Síntesis de globina a nivel molecular.....	19
Figura 3: Variantes normales de hemoglobina en etapas embrionaria, fetal y adulta.	20
Figura 4: Estructura de la hemoglobina en β -talasemia	23
Figura 5: Mutaciones que causan β -talasemia.	24
Figura 6: Representación de las fases de la PCR	35
Figura 7: Programa de amplificación de PCR para el gen de la beta globina.	40
Figura 8: Disposición de las muestras en rampas de temperatura del primer protocolo.....	40
Figura 9: Disposición de las muestras en rampas de temperatura del segundo protocolo. ...	41
Figura 10: Disposición de las muestras en el termociclador durante el tercer protocolo.....	41
Figura 11: Bandas de amplificación del marcador de peso molecular 100pb BIONEER.	42
Figura 12: Análisis in silico de la secuencia correspondiente a la pareja de primers 5.	43
Figura 13: Gel de electroforesis de ADN del primer protocolo	45
Figura 14: Gel de electroforesis de ADN del segundo protocolo	45
Figura 15: Gel de electroforesis de ADN del tercer protocolo	46

Índice de tablas

Tabla 1: Primers/cebadores diseñados para la amplificación del fragmento rs35532010.....	36
Tabla 2: Condiciones para determinar la cantidad óptima de solución de ADN	39
Tabla 3: Concentración de ADN determinado por fluorometría.	43
Tabla 4: Concentración de ADN determinado por espectrofotometría	44
Tabla 5: Secuencia de cebadores de oligonucleotides	48

Índice de anexos

Anexo A: Materiales, reactivos y equipos empleados para la estandarización del fragmento rs35532010	59
Anexo B: Selección del primer/cebador	60
Anexo C: Análisis in silico de los primers/cebadores.....	63
Anexo D: Cuantificación de ADN por Fluorometría	64
Anexo E: Cuantificación de ADN por Espectrofotometría	65
Anexo F: Preparación de las “Soluciones de trabajo”	66
Anexo G: Electroforesis en gel de agarosa al 2%	67
Anexo H: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.....	68
Anexo I: Ecuaciones y cálculos	69

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMH	Células madre hematopoyéticas
CO	Carboxihemoglobina
CO₂	Dióxido de carbono
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
Hb	Hemoglobinna
HBB	Globina beta
HbF	Hemoglobina fetal
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HLA	Sistema del antígeno leucocitario humano
ICC	Insuficiencia cardíaca congestiva
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTDT	Talasemia no dependiente de transfusión
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PCR-RT	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa
SCD	Enfermedad de células falciformes
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TDT	Talasemia dependiente de tranfusión
VCM	Volumen corpuscular medio

Glosario de términos

Alelo: Formas alternativas de un gen que ocupan el mismo sitio en los cromosomas homólogos. Su expresión determina los rasgos de un individuo.

Agarosa: Polisacárido constituido por unidades de agarobiosa, generalmente extraído de algas marinas. Su utilidad radica en la biología molecular para la separación de moléculas.

Amplificación génica: Aumento de número de copias de un gen perteneciente a un genoma.

Cigosidad: Característica que refleja el grado de similitud de los alelos para un determinado rasgo genético en un individuo.

Delección: Cambio genético de magnitud variable caracterizado por la pérdida de un segmento de ADN.

Electroforesis: Técnica de laboratorio que usa corriente eléctrica para separar moléculas de ADN, ARN o cualquier proteína en función de su tamaño y carga eléctrica.

Estandarización: Implementación de protocolos claros y precisos de métodos y formas de ejecutar un procedimiento de trabajo.

Gen: Unidad funcional básica de la herencia de un individuo.

Hemoglobina: Proteína localizada en el interior de los glóbulos rojos que ayuda al transporte de oxígeno desde los pulmones a los demás tejidos del cuerpo y del dióxido de carbono de regreso a los pulmones.

Mutación: Cambio en la secuencia de ADN de una célula.

PCR: Proceso de laboratorio que permite ejecutar muchas copias de un trozo determinado de ADN a partir de una muestra que presenta cantidades diminutas de este ADN.

Polimorfismo: Cambio frecuente en el código genético del ADN.

Talasemia: Grupo heterogéneo de alteraciones congénitas que resultan del defecto en la síntesis de una o varias cadenas de globina.

Dedicatorias

Con mucho amor dedico este trabajo a mis padres *Teodoro Rodríguez* y *Narcisa Bravo*, pilares fundamentales en mi vida, por siempre creer en mí, apoyarme e incentivar a cumplir mis metas, por ser los modelos de constancia y perseverancia que los caracterizan y sobre todo por su apoyo incondicional para conseguir cada uno de mis logros. Siempre fueron mi más grande inspiración y ejemplo para conseguir este objetivo de convertirme en Bioquímico Farmacéutico.

De la misma manera a mis hermanos *Heidy, Michael, Jordy, Carolina* y *Nahomy*, al igual que mis sobrinos, pues son un motor que continuamente me han ido impulsando hasta culminar mi periodo universitario y servir de ejemplo que todo se puede.

A mi abuelita *Carmen, Blanca* y mi tío *Oscar*, aunque su presencia terrenal no me acompañe, sepan que siempre los llevo en mi memoria, esperando que se sientan orgullosos.

A mis mejores amigos *Andrés Palta, Miguel Valle* y *Emilia Rivera*: deseo expresar mi más sincera gratitud y aprecio por su invaluable amistad durante los últimos cinco años, ya que son ustedes hicieron que los momentos difíciles y estresantes del periodo universitario se mucho más llevadero. A *Montserrat Martínez* y *Joel Reyes*, dos personas importantes que han sido una fuente inagotable de apoyo, quienes creyeron en mí aun cuando yo no lo hacía. Al igual que todas aquellas personas que han influido en todo este trayecto, ya sea porque me han acompañado desde el inicio hasta el final o simplemente formaron parte del camino.

Axel

El resultado de este trabajo va dedicado con todo mi corazón a mi madre *Juany Soledispa* quien, con su amor, comprensión y consejos ha sido el principal lucero que brilla mi camino. A mi padre *Oscar Valle*, ejemplo de honradez, sacrificio y paciencia, a quién admiro desde pequeño y admiraré hasta el final de mis días.

A mi hermano, *Kevin Valle* quién estuvo siempre a mi lado, me ayudó y me hizo sonreír en los momentos más complicados de la carrera. A mis tías, *Carmen* y *Gisela Soledispa* quienes han sido afectuosas conmigo y me cuidaron desde pequeño.

A mis abuelitos maternos y paternos, quienes me brindaron su cálido amor y cuidado. Siempre esperaron ver este momento y haré todo lo posible para que se sientan orgullosos desde el cielo. Que Dios los tenga en su santa gloria.

A mis amigos *Andrés Palta*, *Axel Rodríguez*, *Rubén Vire* y *Luis Samaniego* quienes se han convertido en verdaderos hermanos. Su lealtad, compañerismo y afecto han sido suficiente para convertirse en mi segunda familia. Espero y volvamos encontrarnos en el futuro.

A *Emilia Rivera*, quien ha sido una verdadera amiga y confidente en mi vida. Su apoyo y amistad ha sido fundamental para afrontar los retos de la vida universitaria. Te guardo mucho aprecio y cariño.

A todos aquellos amigos y compañeros que han hecho esta etapa una de las mejores de mi vida.

Miguel

Agradecimientos

Primeramente, a Dios Todopoderoso por darme su bendición, fuerza, sabiduría e inteligencia, renovándome día a día con salud para alcanzar todos mis sueños. Segundo a mis padres, que siempre estuvieron presentes para darme el valor, fuerza y el apoyo necesario para culminar este periodo de mi vida.

Así mismo también agradecer de manera especial a nuestra tutora de tesis, la *Dra. Alejandra Neira*, quién nos guio con sus conocimientos para el desarrollo y culminación de este trabajo de titulación. Por último, a *Miguel*, amigo, compañero y futuro colega por su esfuerzo, dedicación y entrega en la elaboración de este trabajo.

Axel

A Dios por ser la luz que ha orientado mi vida, que me ha brindado la fuerza necesaria para continuar sin importar las dificultades presentadas en el camino y me ha dado una vida llena de aprendizaje, experiencias y sabiduría para reconocer mis virtudes y defectos.

A mis padres que me dieron todo el apoyo necesario para no rendirme, la educación y el hogar donde adquirí los valores que hoy me definen. Los amo con toda mi vida.

A mi compañero de tesis y amigo Axel Rodríguez por su lealtad, compañía, paciencia para realizar este trabajo.

A la Universidad de Cuenca, a la Facultad de Ciencias Químicas, al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biociencias, a demás amigos y docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia. A la Dra. Alejandra Neira, tutora del trabajo de titulación, por la guía, paciencia y conocimientos compartidos. Por ayudarnos a ampliar nuestra visión en el campo de la Biología Molecular. A Ana por acompañarnos en este trabajo y ayudarnos a usar el equipo de electroforesis. A la SENESCYT por el apoyo brindado durante toda mi carrera universitaria.

Miguel

Introducción

1.1. Antecedentes

Las hemoglobinopatías son enfermedades genéticas hereditarias caracterizadas por una alteración en la síntesis, estructura y/o función de la molécula de hemoglobina como resultado de mutaciones o deleciones en los genes que codifican las cadenas de globina. Hasta el momento, se conocen alrededor de 1700 mutaciones que afectan aproximadamente al 7% de la población mundial (Bashir, Ehsan, & Jafri, 2017; Bellis & Parant, 2022; Carvajal, 2019).

Según Eandi y colaboradores (2015), estos trastornos pueden originarse por la síntesis de una hemoglobina de estructura anormal (hemoglobinopatías estructurales) o por la síntesis reducida o ausente de las cadenas de globina (talasemias). Las talasemias reciben su nombre según la cadena cuya síntesis haya sido afectada: a) la α -talasemia, donde las cadenas α no son sintetizadas; b) la β -talasemia, que presenta defectos en la cadena de globina β de la hemoglobina, y c) la δ - β -talasemia, cuando falta más de una cadena (Goñi, Galindo, & Goñi, 2008).

La β -talasemia es una enfermedad hereditaria de tipo autosómico recesivo que se origina por mutaciones en el gen de la hemoglobina subunidad beta (*HBB*), localizado en el cromosoma 11. Este gen se encarga de la síntesis de las cadenas β (Eandi et al., 2015). De acuerdo con el estudio de Bellis y Parant (2022), la herencia del gen *HBB* puede conducir a tres situaciones en el genotipo: 1) homocigoto sano, cuando ninguno de los alelos presenta la mutación del gen y, por lo tanto, el individuo no se encuentra afectado; 2) heterocigoto, cuando el individuo es portador de la enfermedad, ya que uno de los dos alelos está mutado, sin embargo no presenta la enfermedad; y 3) homocigoto mutante, cuando el individuo padece de β -talasemia al tener ambos alelos mutados.

Esta patología de la sangre es una de las más comunes y graves que se conocen, ya que el exceso de cadenas α -globina genera la formación de un tetrámero insoluble, produciendo una precipitación y daño de la membrana del eritrocito y, consecuentemente, una eritropoyesis deficiente y hemólisis (Eandi et al., 2015; Goñi, Galindo, & Goñi, 2008).

Actualmente, se han identificado más de 800 mutaciones distintas que afectan al gen de la globina β . Una de ellas es la mutación 27/28 +C, que genera un cambio en el marco de lectura del gen. Esta mutación se considera muy rara en países del Medio Oriente y sur de Asia. Sin embargo, se han identificado algunos casos en población ecuatoriana. Dicha mutación

provoca un cambio de marco de lectura debido a la inserción de una base nitrogenada (citosina) en el codón 27-28, lo que altera por completo el sentido de la cadena. Tal es su rareza que, desde el primer caso reportado en 1992, el porcentaje de pacientes que presentan este polimorfismo no sobrepasa el 2% (Cai et al., 1991; Lin, Lin, Lin, & Chang, 1991; Wong et al., 1987).

1.2. Problemática

Aproximadamente 360 millones de personas padecen algún tipo de hemoglobinopatía, lo que representa alrededor del 7% de la población mundial. Entre ellos, se estima que alrededor de 100 millones de personas son portadoras de β -talasemia. Estas enfermedades son altamente prevalentes en países del Mediterráneo, Medio Oriente, África Occidental y el Sudeste Asiático. Debido a la alta tasa de migración de personas originarias de estas regiones, la talasemia se ha introducido en el continente europeo y americano, zonas donde antes se consideraba una enfermedad rara (Bashir, Ehsan, & Jafri, 2017; Taher, Musallam, & Cappellini, 2021).

En la actualidad, se han identificado numerosas mutaciones causantes de la β -talasemia, incluyendo el polimorfismo rs35532010, el cual consiste en la inserción de un nucleótido de citosina en el codón 27-28 del gen HBB, provocando un corrimiento del marco de lectura (Sayani & Kwiatkowski, 2015). A pesar de ser reportada en el continente asiático, es una mutación rara, de baja prevalencia y escasa información (Lin et al., 2013; Liu et al., 2011). Sin embargo, el estudio realizado en la Universidad del Azuay "Identificación de mutaciones con prueba de hibridación genómica en pacientes con talasemia y familiares de primer y segundo grado de consanguinidad", cuyos datos aún no han sido publicados, se ha identificado varios pacientes que presentan esta mutación en el gen de hemoglobina β .

El asesoramiento genético, el cribado poblacional, el diagnóstico prenatal y la interrupción del embarazo son estrategias ampliamente utilizadas para controlar la β -talasemia una vez que se ha determinado el estado de cigosidad del individuo (Angastionitis & Modell, 1998). Sin embargo, en Ecuador, debido al lento desarrollo tecnológico en lo que respecta al análisis genético, esta determinación resulta ser dificultosa y problemática. En el año 2012, el Ministerio de Salud Pública publicó la "Política Nacional de Genética en Salud Humana 2013-2023", en la que se mencionó el escaso número de especialistas en Genética clínica y la limitada cantidad de laboratorios capaces de realizar diagnósticos precisos y establecer tratamientos efectivos para el manejo de estas enfermedades.

1.3. Justificación

En Latinoamérica, en general, y en Ecuador, en particular, existe escasa información sobre la prevalencia y estudios a nivel molecular acerca de las mutaciones causantes de la β -talasemia. La estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitirá la amplificación de un fragmento específico de ADN, en este caso, del segmento en donde se ubica el polimorfismo rs35532010 presente en el gen de la hemoglobina subunidad beta (HBB). Su amplificación posibilitará la realización de la secuenciación de Sanger para determinar el estado de cigosidad de esta mutación, lo cual resulta primordial para el diagnóstico preciso de la enfermedad.

La prevención de la β -talasemia originada por esta mutación es un objetivo de vital importancia para garantizar la salud y el bienestar de la población ecuatoriana. Mediante el asesoramiento genético a los pacientes heterocigotos “portadores” y a los homocigotos mutantes, se proporciona información clave sobre los riesgos hereditarios en su descendencia. Por otro lado, la implementación de un tratamiento efectivo para las personas afectadas mejora significativamente su calidad de vida y reduce las complicaciones asociadas con la enfermedad. En este sentido, con las estrategias preventivas, no solo se contribuye a disminuir la incidencia de la β -talasemia en la población ecuatoriana, sino que también se sientan las bases para futuros estudios de prevalencia y se establece un enfoque integral para el manejo de esta enfermedad en el país.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Estandarizar un protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del segmento rs35532010 del gen de la hemoglobina subunidad beta (HBB).

1.4.2. Objetivos específicos

- Diseñar y sintetizar los cebadores o primers específicos para la posterior amplificación del polimorfismo rs35532010.
- Amplificar el fragmento rs35532010 mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- Verificar la presencia del amplicón mediante el análisis por electroforesis en gel de agarosa.

Marco teórico

2.1. Herencia genética

Los seres humanos poseen células somáticas que contienen 23 pares de cromosomas, lo cual los convierte en organismos diploides. La mitad de los cromosomas son heredados por la madre y la otra mitad por el padre y son indispensables para la transmisión de los rasgos pues portan los genes que se transmiten de generación en generación (Arbeláez-García, 2009; Ramos, Colodrón, Serrano, & Tomé, 2016).

Las distintas variantes de un gen se conocen como alelos, los individuos que tienen alelos idénticos en cada cromosoma se denominan homocigotos, mientras que aquellos que poseen un alelo diferente en cada cromosoma se conocen como heterocigotos (Arbeláez-García, 2009; Ramos, Colodrón, Serrano, & Tomé, 2016). Las mutaciones son alteraciones que ocurren en la secuencia del ADN (ácido desoxirribonucleico). Muy a menudo estas alteraciones tienden a originar efectos deletéreos, lo cual las convierte en fuentes de enfermedades. Dado que el material genético es transmitido de generación en generación, si dos padres portadores de una mutación tienen descendencia, estas mutaciones pueden heredarse a los hijos ocasionando varios escenarios como: i) una probabilidad del 50% de que quienes hereden estos cambios se conviertan en portadores de la enfermedad, ii) un 25% de probabilidad de heredar la enfermedad y iii) un 25% de no resultar afectado al no haber heredado ningún alelo mutante (Pierce, 2016; Papadakis & McPee, 2017).

2.2. Hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es la proteína más abundante en el eritrocito y tiene la función de transportar el oxígeno desde los pulmones hacia los demás tejidos del cuerpo, uniendo y liberando O₂ de manera cooperativa. Además, participa también en el transporte de aproximadamente un 25% del CO₂ desde los tejidos hacia los pulmones (Chiappe, 2017). Es un heterotetrámero constituido por dos cadenas α y dos no α similares en estructura y tamaño (Ahmed, Ghatge, & Safo, 2020), como se observa en la Figura 1.

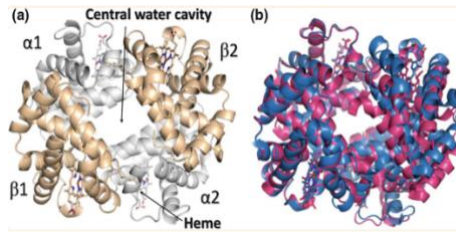


Figura 1: Estructura cristalina de la hemoglobina (Hb). A) Estructura cuaternaria general de Hb con las dos cadenas α y no α coloreadas en gris y tostado, respectivamente. B) Estructura de Hb oxigenada (R) en color magenta superpuesta en Hb desoxigenada de color azul. Obsérvese que la cavidad de agua central es más grande en la estructura desoxigenada. Fuente: (Ahmed, Ghatge, & Safo, 2020).

El grupo prostético hemo (conformado por protoporfirina IX + Fe) se encuentra alojado en un bolsillo hidrofóbico determinado por la estructura terciaria de cada cadena de globina. A nivel molecular, las cadenas de globina tipo α están conformadas por 141 aminoácidos y están codificadas por los genes que se localizan en el locus 16p13.3; en el cluster de α -globina que incluye el gen embrionario HbZ, el pseudogen HBZP, el gen HBM, el pseudogen HBAP1, los genes HBA2 y HBA1 y HBQ1 (Scheps et al., 2015). Las hemoglobinas de tipo no α presentan 146 aminoácidos y están codificadas por aquellos genes localizados en el locus 11p15.5 (Figura 2).

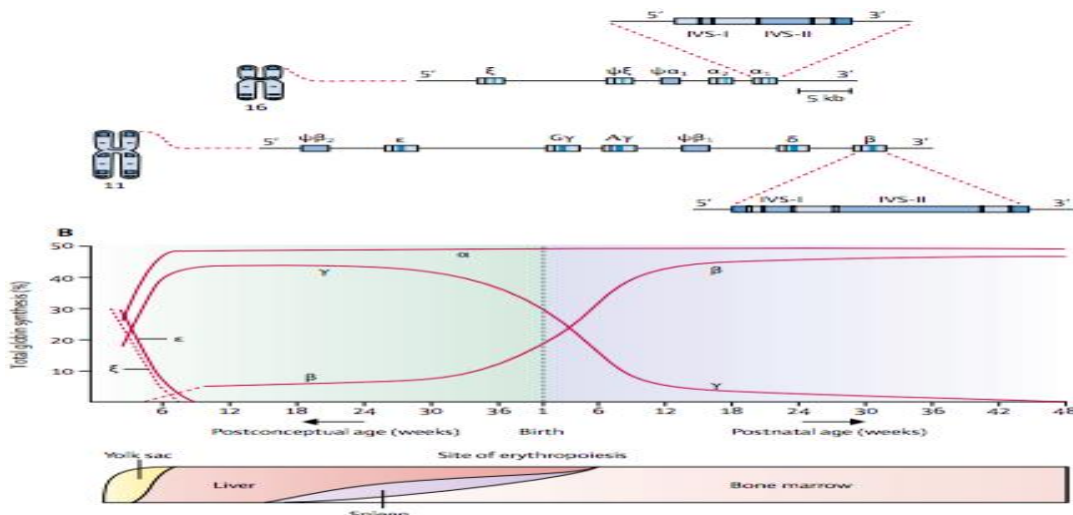


Figura 2: Síntesis de globina a nivel molecular. A) Organización de la familia α en el cromosoma 16 y la familia de globina β en el cromosoma 11. B) Los sitios de eritropoyesis y el patrón de síntesis de globina durante el desarrollo. γ designa pseudogenes que no se expresan. Los tres exones de los genes de globina se muestran en azul pálido. IVS= Segmentos intermedios o intrones. Fuente: (Thaer, Weatherall, & Capellini, 2018).

Existen diferentes variantes de hemoglobina: en la etapa embrionaria se encuentra la Gower I ($\alpha_2\epsilon_2$); fetal ($\alpha_2\gamma_2$); A ($\alpha_2\beta_2$); A2 ($\alpha_2\delta_2$) en etapa adulta (Figura 3). En el adulto, las hemoglobinas normales son HbA, HbA2 y HbF. Cuando existen patologías pueden aparecer homotetrámeros como las hemoglobinas Bart's (γ_4) y H (β_4) (Chiappe, 2017; Erramouspe & Eandi, 2017).

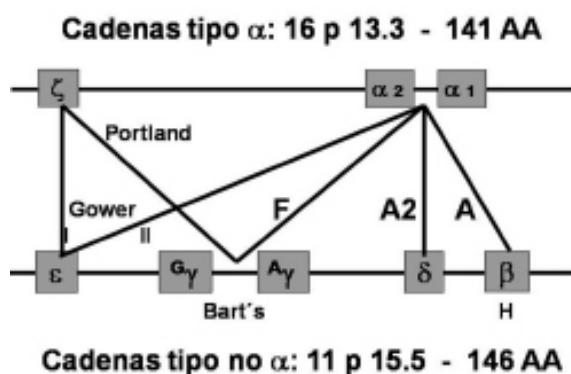


Figura 3: Variantes normales de hemoglobina en etapas embrionaria, fetal y adulta. Fuente: (Chiappe, 2017)

Durante el primer mes de gestación, las hemoglobinas embrionarias $\beta_2\epsilon_2$, $\alpha_2\epsilon_2$ y $\beta_2\gamma_2$ se forman en las células eritroides del saco vitelino. Posteriormente, los sitios de eritropoyesis se desplazan gradualmente del hígado y bazo a la médula ósea. Antes del nacimiento se produce un cambio de expresión de globina α y globina β . A los 6 meses, el 95% de la hemoglobina en los glóbulos rojos normales es HbA adulta y el restante consta de dos componentes menores, HbA2 y HbF (Thaer, Weatherall, & Capellini, 2018).

2.3. Hemoglobinopatías

Se definen como trastornos genéticos hereditarios que modifican la síntesis de genes de globina de forma “cualitativa”, es decir, la cantidad de globina es normal, sin embargo, se producen cambios de aminoácidos que alteran su estructura primaria o “cuantitativa” al impedir la síntesis total o parcial de dichas cadenas sin verse afectada su estructura, convirtiéndose en causas importantes de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Erramouspe & Eandi, 2017). Existen hemoglobinopatías secundarias a otros procesos patológicos o intoxicaciones por CO (carboxihemoglobina) o S (sulfohemoglobina) (Nelson & Cox, 2019). Cuando la causa es genética, estos trastornos monogénicos constituyen las enfermedades raras más frecuentes en Europa y en áreas donde la malaria ha sido endémica incluidos el África subsahariana, países del mediterráneo o sureste de Asia, sin embargo, la

migración de la población a áreas no endémicas ha contribuido para expandir la patología por todo el mundo (Sabath, 2023; Magrin, Miccio, & Cavazzana, 2019). Alrededor del 3-7% de la población mundial presenta un rasgo defectuoso de hemoglobina (Hb) y, hasta la fecha, se han reportado más de 2.000 variantes sin mencionar a aquellas que aún se encuentran en investigación (Giardine et al., 2014; Modell & Darlison, 2008).

Las mutaciones en los genes de globina generan una forma anormal de la hemoglobina dando como resultado la enfermedad de las hemoglobinas C, D y E; enfermedad de células falciformes (SCD) o una producción deficiente de polipéptidos α y β , y, por lo tanto, un desequilibrio total de las cadenas de globina provocando las denominadas α -talasemia y β -talasemia, respectivamente (Wienert, Martyn, Funnell, Quinlan, & Crossley, 2018). Muchas de estas variantes, en estado heterocigoto u homocigoto, se presentan de forma asintomática. Hemoglobinopatías sintomáticas como HbS, HbC, β -talasemia, determinadas variantes de α -talasemia, Hb Lepore, entre otras, son causantes de enfermedades en condiciones de doble heterocigosis u homocigosis con algunas excepciones (HbD y HbE). A pesar de que la mayoría se presentan de forma asintomática, la principal sintomatología es la anemia causada por la ineficacia de eritropoyesis, presencia de metahemoglobinemia con o sin inestabilidad de hemoglobinas o hemoglobinas con afinidad de unión de oxígeno alteradas (Ghosh, Gosh, Agrawal, & Nadkarni, 2019).

La β -talasemia y la enfermedad de células falciformes son las hemoglobinopatías monogénicas de mayor prevalencia (Magrin, Miccio, & Cavazzana, 2019). Dan lugar a complicaciones crónicas perjudiciales para la calidad de vida de los pacientes llegando incluso a producirles la muerte prematura si no reciben el tratamiento adecuado (Martínez et al., 2014).

2.3.1. Presentaciones clínicas de las hemoglobinopatías

- **Hemoglobinopatías estructurales:** Existe un defecto mutacional que genera alteraciones en la estructura primaria de las cadenas de globina cuya síntesis es normal. Entre ellas, la HbS, HbC, HbD, etc (Chiappe, 2017).
- **Síndromes talasémicos:** Se producen debido a la disminución de la síntesis de cadenas de globina con estructura normal o ausente de la cadena de globina afectada. Se encuentran la α -talasemia, β -talasemia, γ -talasemia o γ - β -talasemia (Martin & Thompson, 2013).

- **Hemoglobinopatías talasémicas:** Se presenten ambos defectos. Constant Spring y la Hb Lepore son las más frecuente (Chiappe, 2017).
- **Síndromes de sobreexpresión:** Ocurre un aumento descontrolado de la síntesis de una cadena de globina con estructura primaria (Chiappe, 2017).

2.4. Talasemia

Descrita por primera vez en 1925, implica una serie de defectos genéticos caracterizados por la síntesis insuficientes o nulas de cadena de α o β -globina (Oikonomidou & Rivella, 2018). Se generan por la eliminación de los genes estructurales que involucran una disminución de la síntesis o estabilidad de la proteína (Erramouspe & Eandi, 2017). Generalmente se presenta de forma asintomática en los estados de rasgo y portador (Baird, Batten, & Sparks, 2022). En pacientes sanos las cadenas α y β se producen en cantidades equilibradas, sin embargo, en trastornos talasémicos, existe una maduración anormal de los glóbulos rojos, siendo la microcitosia la manifestación característica (Needs, González-Mosquera, & Lynch, 2023).

El 90% de los portadores son originarios de África subsahariana, Oriente Medio, subcontinente indio y sudeste asiático, sin embargo, la mayor movilidad migratoria ha contribuido que se expanda a Estados Unidos, Canadá, Australia, América del Sur y norte de Europa (Kattamis, Forni, Aydinok, & Viprakasit, 2020; Weatherall, Williams, Allen, & O'Donnell, 2010). Cerca de 68.000 niños nacen con diversos síndromes talasémicos al año, convirtiéndolo en el trastorno autosómico recesivo más común a nivel mundial (Modell & Darlison, 2008; Taewraktul et al., 2018).

Las talasemias se pueden distinguir según la cadena de globina en donde se presente el defecto siendo las más importantes las α -talasemias y β -talasemias (Kattamis, Forni, Aydinok, & Viprakasit, 2020). La α -talasemia es un desorden genético monogénico que afecta al 5% de la población mundial. Presentan una gran heterogeneidad fenotípica debido a la diversidad de sus bases moleculares. La causa más frecuente son las deleciones donde se pierden una o ambas copias de los genes HBA de un mismo cromosoma. La anemia hemolítica es la manifestación clínica más importante llegando incluso a requerir transfusiones (Scheps et al., 2015).

2.5. β -talasemia

2.5.1. Definición

Pertenecen al grupo de anemias hereditarias autosómicas recesivas heterogéneas caracterizadas por mutaciones que provocan una actividad reducida o ausente de las cadenas β -globina (Lei et al., 2019). Existe un exceso de cadenas de globina α no unidas que precipitan en precursores eritroides en la médula ósea y en los eritrocitos maduros. Se produce una eritropoyesis ineficaz y hemólisis periférica, y en última instancia, reduce la producción de eritrocitos desencadenando en anemia microcítica hipocrómica, sangre periférica anormal con glóbulos rojos anucleados y cantidades reducidas de HbA (He et al., 2019; Tari, et al., 2018; Origa, 2021; De Sanctis et al., 2017; Musallam, Bou-Fakhredin, Capellini, & Taher, 2021).

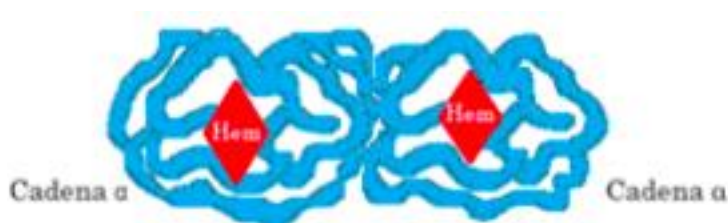


Figura 4: Estructura de la hemoglobina en β -talasemia. Fuente: (Carvajal, 2019).

Desde el punto de vista molecular, la β -talasemia es consecuencia de sustituciones de bases en intrones, exones y regiones promotoras de genes de β -globina, a diferencia de la α -talasemia que es consecuencia de deleciones que eliminan el gen HBA (Stauder, Valent, & Theurl, 2018). Aproximadamente el 1,5% de la población mundial es portadora de esta anemia hereditaria; la mayoría de ellas en países en desarrollo (Origa, 2017; Tari et al., 2018). Las personas que heredan dos copias anormales del gen de la globina β desarrollan anemia, y generalmente requerirán transfusiones de glóbulos rojos por el resto de su vida para mantener sus niveles adecuados de hemoglobina (Thein, 2013).

Se han caracterizado alrededor de 300 alelos de β -talasemia y, a diferencia de la α -talasemia, la gran mayoría de las β -talasemias son causadas por mutaciones que involucran uno o un número limitado de nucleótidos dentro del gen β o sus regiones flanqueantes inmediatas (Giardine et al., 2011). A continuación, se resumen los mecanismos subyacentes de la β -talasemia (Figura 5).

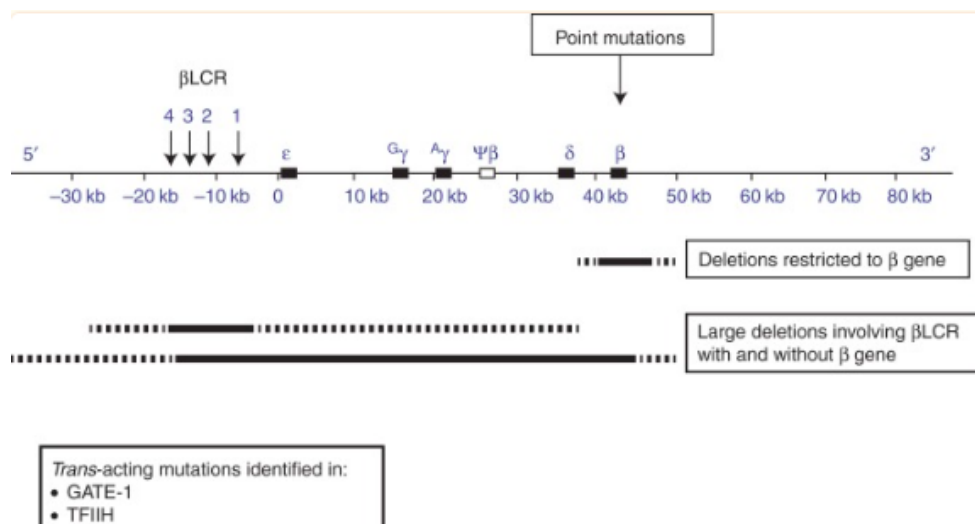


Figura 5: Mutaciones que causan β-talasemia. El panel superior representa el grupo de genes de globina β con el control del locus superior (βLCR). Las mutaciones pueden actuar en cis que incluyen mutaciones que afectan al gen β estructural, deleciones restringidas al gen β y deleciones que involucran al (βLCR) con o sin el gen β. Las líneas discontinuas representan variaciones en la cantidad de ADN lateral eliminado por distintas deleciones.

Fuente: (Scheeps et al., 2015).

Puede variar desde una β-talasemia mayor (β-tM) que presenta una anemia severa en los primeros años de vida siendo una enfermedad grave transfusión dependiente, a formas más leves, heterocigotos caracterizados con anemia microcítica e hipocrómica sin manifestaciones evidentes como en la β-talasemia menor (β-tm) y formas intermedias como la β-tl independientes de transfusión (Vitrano et al., 2017).

2.5.2. Epidemiología

Históricamente la prevalencia de la β-talasemia ha sido más alta en países de todo el mediterráneo, Oriente medio, ciertas zonas de Asia Central, India, Sur de China y estados del norte de África, sin embargo, en los últimos años se ha extendido a Europa Occidental y América del Norte (Kattamis, Forni, Aydinok, & Viprakasit, 2020). La deriva genética y migraciones son factores que contribuyen a la prevalencia de la β-talasemia en estas zonas (Origa, 2017). En medio Oriente, la prevalencia es mayor debido a una alta tasa de portadores y a la preferencia cultural de matrimonios consanguíneos. Sin embargo, la inducción de programas de prevención en esta región ha llevado a una disminución de los casos en estas últimas décadas (Mondal & Mandal, 2016; Teli, Deori, & Protim, 2016; De Sanctis et al., 2017).

2.5.3. Etiología

Hasta la fecha se han reportado más de 500 mutaciones puntuales del gen de la β -globina, dando lugar a una amplia variabilidad fenotípica y genotípica (Kountouris et al., 2014). La mayoría son sustituciones, deleciones o inserciones de un nucleótido que conduce a un cambio de marco y afectan al control transcripcional, traducción, empalme del gen HBB y producto génico (Needs, González-Mosquera, & Lynch, 2023; Cao & Galanello, 2010). Muchas de las variantes se heredan de forma mendeliana recesiva, pero existe un pequeño subgrupo de alelos de β -talasemia que se comportan de manera dominante (Weatherall & Clegg, 2001). Las mutaciones pueden ser leves que causan una reducción relativa en la producción de las cadenas β o graves que resultan en la ausencia completa de su síntesis con afectación multiorgánica y dependiente de transfusiones de por vida (Taher, Weatherall, & Capellini, 2018; De Sanctis et al., 2017). En raras ocasiones, los defectos pueden ser ocasionados por deleciones del gen de la globina β en el cromosoma 11 (Needs, González-Mosquera, & Lynch, 2023). Las mutaciones se reflejan por la gravedad de los síntomas clínicos, incluso personas con una sola copia anormal del gen pueden verse afectadas, sin embargo, las manifestaciones son menores (Hashmi, Fernández, & Seul, 2020).

Como la transmisión del gen corresponde a un modo hereditario recesivo mencionado anteriormente pueden ocurrir tres situaciones:

- Los dos cromosomas de un individuo contienen un gen no mutado por lo que el individuo no está afectado (homocigoto sano).
- Uno de los dos cromosomas contiene un gen mutado, en este caso el individuo no está enfermo, sino que es un portador (heterocigoto sano).
- Ambos cromosomas presentan un gen mutado (homocigoto enfermo con β -talasemia) (Bellis & Parant, 2022).

Al momento de la concepción cada hermano de un individuo afectado tiene 25% de presentar la hemoglobinopatía, un 50% de ser asintomático y un 25% de no estar afectado ni ser portador (Origa, 2021).

2.5.4. Clasificación

Los pacientes que presentan β -talasemia comúnmente se clasifican según sus características clínicas y requisitos de transfusión sanguínea (Grech, Borg, & Borg, 2021).

- β -talasemia mayor o Anemia de Cooley o Anemia Mediterránea.

- β -talasemia Intermedia.
- β -talasemia menor o "Portador de β -talasemia" / Rasgo de talasemia o talasemia β heterocigótica.

Otra forma válida de clasificar a la β -talasemia es de acuerdo con la necesidad de transfusión, encontrándose una talasemia no dependiente de transfusión (NTDT) y talasemia dependiente de transfusión (TDT). En el primer grupo, los pacientes requieren ocasionalmente de transfusión durante el embarazo, infecciones o cirugía. Los pacientes con TDT requieren de transfusiones crónicas de glóbulos rojos para sobrevivir y terapia de quelación con hierro para contrarrestar la sobrecarga del elemento y el daño orgánico posterior (Taher & Capellini, 2018; Motta, Bou-Fakhredin, Taher, & Capellini, 2020).

2.5.4.1 β -talasemia mayor

Denominada anemia de Cooley, representa el tipo más severo de β -talasemia que tiene lugar cuando los individuos son homocigotos para la mutación β^0 o cuando poseen una mutación β^0 y una β^+ . La cantidad de HbA es baja y no existe producción de las cadenas β por lo que es imposible la formación del tetrámero normal de la hemoglobina (Angulo, Koss, & Monge, 2020). Suele aparecer entre los 6 meses y 2 años, por lo general, sufren de anemia severa, insuficiencia cardíaca, fatiga y caquexia. Presentan niveles de Hb menores a 3-4g/dl y HbF menor al 90% (Ali et al., 2021). Los signos clínicos más evidentes son la diarrea, irritabilidad, infecciones y esplenomegalia, hemólisis extrema que provoca hipertensión pulmonar, litiasis y ulceraciones. Cuando no existe tratamiento oportuno, el niño puede experimentar ictericia, visceromegalias, ulceraciones en miembros inferiores y anomalías esqueléticas a consecuencia del aumento en la eritropoyesis extramedular (Angulo, Koss, & Monge, 2020).

2.5.4.2 β -talasemia intermedia

Presenta un amplio espectro clínico de fenotipos de β -talasemia. Los fenotipos pueden resultar del aumento de cadenas de globina α por el genotipo α triplicado asociado a la heterocigosidad β y por la interacción de la talasemia β y δ - β . Los pacientes se presentan de forma asintomática hasta alcanzar la adultez, se presenta anemia leve y niveles de hemoglobina entre 7 y 10g/dl con transfusiones sanguíneas ocasionales. En las formas más severas, esta se manifiesta en edades comprendidas de 2 y 6 años sin necesidad de transfusiones para su supervivencia (Taher, Isma'eel, & Capellini, 2006).

Gran parte de los pacientes con β -tl son homocigotos o heterocigotos compuestos para la β -talasemia, donde ambos loci se encuentran afectados y la enfermedad toma un patrón genético recesivo. En menor frecuencia, se puede verse afectado un solo locus de β -globina, donde la β -tl es de herencia autosómica dominante como en el caso de las hemoglobinas hiperinestables (Ropero, González, Martínez, Torres, & Benavente, 2021; Musallam, Taher, & Rachmilewitz, 2012).

Las complicaciones relacionadas con β -tl son la insuficiencia cardíaca, diabetes e hipogonadismo. Se ha reportado eritropoyesis extramedular, colelitiasis y trastornos hepáticos, enfermedad renal y nefrolitiasis, trombofilia, ICC, hipertensión pulmonar y anomalías óseas (Asadov, Alimirzoeva, Mammadova, Aliyeva, & Gafarova, 2018).

2.5.4.3 β -talasemia menor

Los pacientes con β -tm presentan una mutación del gen β heterocigoto (gen normal y una mutación beta⁺). Una de las características clínicas más importantes asociadas con la morbimortalidad de los pacientes es la acumulación de subunidades de cadenas de globina, como es el caso de la cadena alfa. Con la ausencia de las cadenas β se forman radicales reactivos que ocasionan daños a las membranas de los eritrocitos (Angulo, Koss, & Monge, 2020). Los pacientes se muestran asintomáticos o muestran pocas manifestaciones clínicas tales como la hepatoesplenomegalia leve asociada con el aumento de la eritropoyesis, ictericia y síntomas propios del síndrome anémico (Rund & Rachmilewitz, 2005).

En el hemograma, los niveles de hemoglobina alcanzan rangos de 11 a 13g/dl con VMC de 70fl y HCM menor de 23pg. La morfología de los eritrocitos se ve ampliamente alterada, encontrándose microcitosis, células dianas, hipocromía, poiquilocitosis y punteado basófilo. La identificación de estas alteraciones no diagnostica directamente la β -talasemia menor debido a que se podría relacionar también con anemia ferropriva por lo que el diagnóstico diferencial debe estar basado en electroforesis de Hb y niveles de HbA₂ y HbF (Vargas, 2011).

2.5.5. Fisiopatología

Durante el desarrollo del individuo, a nivel molecular se da la síntesis de varias cadenas que derivan en variantes de la hemoglobina. Tal es el caso la α -globina que aparece durante el desarrollo fetal y es constante a lo largo de la vida del paciente o la γ -globina que se activa en el desarrollo embrionario temprano para la síntesis de HbF, cuyos valores disminuyen en los primeros 6 meses de vida (Martin & Thompson, 2013). La β -globina comienza su síntesis

a finales de la gestación para dar lugar a la HbA que alcanza niveles estables en el primer año de vida. Después de esta edad, el 95% de la Hb corresponde a HbA, el 3.5% a la HbA₂ y la HbF ocupa menos del 1% (Carvajal, 2019). La función normal de eritropoyesis se ve afectada por la acumulación de glóbulos rojos defectuosos en el bazo (Martin & Thompson, 2013). En la β -talasemia, existe una disminución de cadenas de globina β que da lugar a cantidades reducidas de HbA por célula y la interacción del exceso relativo de cadenas α con la membrana de los glóbulos rojos provoca hemólisis y muerte celular intramedular prematura (Martin & Thompson, 2013). La acumulación de las cadenas de globina α produce tetrámeros α inestables que inducen estrés oxidativo sustancial que provoca alteraciones celulares y estructurales lo que se manifiesta clínicamente como una anemia hemolítica crónica (Kattamis, Kwiatkowski, & Aydinok, 2022). La apoptosis de los eritrocitos se relaciona con el aumento de la fosfatidilserina, importante para la remoción prematura por macrófagos medulares hiperplásicos de eritroblastos con rigidez de su citoesqueleto (Sáenz-Renaud & Rodríguez-Romero, 2006).

2.5.6. Manifestaciones clínicas y complicaciones

Las presentaciones clínicas varían en pacientes con talasemia, pueden cursar de forma asintomática hasta la necesidad de transfusiones de sangre por la anemia severa que se presenta (Martin & Thompson, 2013). Múltiples patologías pueden aparecer como complicaciones en pacientes con talasemia, tales como insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, hematopoyesis extramedular, osteoporosis, colelitiasis, infecciones, trombosis y endocrinopatías, que aumentan la morbilidad y mortalidad de la enfermedad. Factores como la edad avanzada, anemia, sobrecarga de hierro, esplenectomía, genotipos severos de talasemia y terapia de quelación de hierro contribuyen a las complicaciones de la enfermedad (Taewraktul et al., 2018).

La gravedad clínica de la β -talasemia se encuentra influenciada por factores genéticos no relacionados con la globina, condiciones ambientales y el manejo de la enfermedad (Origa, 2017). Las personas con defectos en el gen de la β -globina pueden cursar con cuadros clínicos graves como la anemia hemolítica sintomática o convertirse en un portador asintomático (Islam et al., 2021).

2.5.7. Diagnóstico

2.5.7.1 Diagnóstico hematológico

Por lo general se muestra anemia severa con niveles de Hb menores a 7 g/dl con presencia de eritrocitos microcíticos, poiquilocitos y hematíes inmaduros, relacionados con el grado de anemia. Es posible realizar electroforesis o cromatografía para observar la distribución de las hemoglobinas en el paciente (Angulo, Koss & Monge, 2020). En formas severas, no existe la síntesis de cadenas globina β por lo que la ausencia de Hb es evidente, sin embargo, hay un aumento compensatorio de HbF y HbA₂. Entonces, con niveles aumentados de HbA₂ se puede sospechar de un trastorno de β -talasemia (Hoffbrand & Steensma, 2019).

2.5.7.2 Diagnóstico molecular

El diagnóstico generalmente es confirmado con técnicas electroforéticas o análisis moleculares al identificar las mutaciones puntuales más frecuentes (Lazarte et al., 2012). Existen técnicas de reacción en polimerasa de cadena o secuenciación de gen para determinar las mutaciones puntuales, sin embargo, el diagnóstico clínico se basa en el hemograma, características clínicas y electroforesis de hemoglobina (Hoffman et al., 2018). Los métodos que más se emplean son el análisis blot inverso y la amplificación específica utilizando cebadores o sondas complementarias a las regiones donde se ubican las mutaciones más prevalentes. Si no se logra detectar la mutación, se recomienda realizar un análisis de secuencia del gen de la globina β para su detección. Con el análisis se puede establecer si el paciente afectado pertenece o no a una ascendencia de alto riesgo o si se presenta una o ninguna variante patogénica (Galanello & Origa, 2010).

2.5.8. Mutaciones

Los pacientes de cada población étnica poseen sus propios tipos específicos de mutaciones, siendo algunas muy comunes y otras muy raras. Hasta el 2014, en China se han detectado 45 mutaciones de un sólo nucleótido y pequeñas deleciones en el gen de la globina β (Lin et al, 2014). Actualmente se han reportado más de 500 mutaciones presentes en el gen de la globina β , cuyo espectro es variable en diferentes grupos étnicos. Se han documentado las mutaciones de la β -talasemia en el sur de China, especialmente en Guanxi (6,78%) y Guangdong (2,54%), dos provincias donde la talasemia ocurre con mayor frecuencia (Zhang et al., 2015; Chen et al., 2010).

Cada población presenta un grupo diferente de mutaciones de la β -talasemia donde se engloban unas muy comunes y un número variable de raras. En la comunidad China se han registrado 12 nuevos espectros de mutación: codón de cambio de marco 41 y 42 (-TCTT); sustitución C \rightarrow T en la posición 654 del intrón 2 (IVS-2); la mutación sin sentido A \rightarrow T en el

codón 17; la mutación en la posición -28 (A → G), posición -29 (A → G) y posición -30 (T → C) de la región promotora; la mutación G → T en la posición 1 del intrón 1 (IVS-1); el codón de cambio de marco 14 y 15 (+G); la mutación G → C en la posición 5 de IVS-1; el codón de cambio de marco 71 y 72 (+A) y el codón de cambio de marco 71 (+T); (9) el codón de cambio de marco 27 y 28 (+C); la mutación sin sentido G → T en el codón 43; una delección de 4 nucleótidos (nt) (-AAAC) en la posición +40 del sitio cap; y la mutación del codón inicial (ATG → AGG). En el sur de China, las 4 primeras representan el 91% de las β -talasemia (Chang et al., 1992).

Un estudio realizado por Lin y colaboradores (2014) en Jiangxi mostró que de los 9842 pacientes con edades comprendidas entre los 18 y 70 años nativos de dicha provincia se encontraron 172 cromosomas con 16 de las mutaciones más conocidas de la β -talasemia de mayor prevalencia en la población China. Únicamente 9 muestras eran portadoras compuestas de α y β talasemia (0,18%). En Taiwán, las enfermedades hereditarias más comunes son aquellas donde existen trastornos del gen de la hemoglobina, siendo la β -talasemia una de las más representativas. En dicho país, ocurre con una frecuencia de 1-3%. Existen más de 1.000 variantes anormales que afectan al gen de la globina β , donde la mayoría se deben a mutaciones estructurales caracterizadas por la sustitución de un aminoácido en la cadena de la globina (Liu et al., 2011).

2.5.9. Tratamiento

Desde 1981, la única opción de tratamiento curativo es el alotransplante de células hematopoyéticas (Park et al., 2018; Li et al., 2018). La tasa de éxito alcanza un 90% en casos de niños reportados con β -talasemia severa (Zhang, Hao, Xu, Liu, & Jiang, 2017). Sin embargo, la pequeña proporción de pacientes compatibles en HLA, sumado a las toxicidades que se pueden presentar en el procedimiento limitan este enfoque a una fracción de los individuos afectados (Dong & Rivella, 2017; Fitzhugh, Abraham, & Hsieh, 2017). El mayor riesgo de rechazo en la β -talasemia se debe a la excesiva exposición previa a los trasplantes de sangre que conlleva a la aloinmunización (Korula, Devasia, Lakshmi, Abraham, & Sindhuvi, 2018). Estas limitaciones han permitido desarrollar una nueva alternativa terapéutica, la terapia génica mediante modificación ex vivo de células madre hematopoyéticas (CMH) seguida de un injerto autólogo. (Boulad, Mansilla-Soto, Cabriolu, Rivière, & Sadelain, 2018).

2.6. Mutación "CD 27/28 +C" - Polimorfismo rs35532010

Normalmente la secuencia de los codones 27-28 es GCC CTG, sin embargo, existe una mutación que ocasiona un cambio de marco de lectura provocada por la inserción de una citosina en el codón 27-28 del gen β -hemoglobina alterando todo el recorrido de la cadena. Así, la mutación no permite la síntesis de la cadena normal provocando la β -talasemia. En el año de 1991, se detectó en Taiwán una nueva mutación de cambio de marco al analizar 64 genes de β -talasemia en 37 pacientes con dicha patología, usando los métodos de secuenciación directa descritos por Wong y colaboradores (1987) donde se caracterizaron tres mutaciones desconocidas, en dos de estas se evidenció la inserción de una citosina entre los codones 27-28 dejando una secuencia distinta (GCC CTG a GCC C CCTG); el porcentaje que representó la mutación fue del 2,7%. Lin menciona que la nueva mutación da como resultado el cambio de marco de lectura y conduce a un nuevo fenotipo selectivo de β -talasemia por una terminación prematura de la traducción en el nuevo codón 59. Los pacientes que presentaron esta mutación lo heredaron de sus padres taiwaneses Hakka y reciben regularmente transfusiones de glóbulos rojos y tratamiento con deferoxamina subcutánea (Lin, Lin, Lin, & Chang, 1991, Wong et al., 1987). El primer reporte que se tiene registrado en América es de un estudio publicado en Toronto en 1992, donde se describe el caso de una estudiante de 19 años con diagnóstico de β -talasemia desde el primer año con padres originarios de la provincia de Guangdong. En esta familia se evidenció que la nueva mutación alteró el marco de lectura del gen HBB resultando en la alteración del codón 43 (GAG) a uno mutante (TGA) de terminación (Cai et al., 1991).

En el estudio realizado por Liu y colaboradores en el año 2011 en donde se buscó determinar las distintas variantes moleculares en pacientes que presentan los distintos tipos de talasemia, se encontró que, de 3578 pacientes, el 20,8% presentaba β -talasemia. De este porcentaje, únicamente se reportó un caso de β -talasemia caracterizada con la mutación CD 27/28 +C (Liu et al., 2011).

2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.7.1. Fundamento

Impulsada a mediados de 1980 por el químico Kary Mullis, la PCR (Polimerase Chain Reaction) o algunas veces llamada "fotocopiado molecular" es una técnica de laboratorio rápida, sencilla, específica y económica que se fundamenta en una reacción enzimática in vitro que permite la producción (amplificación) de millones a miles de millones de pequeños fragmentos de un segmento específico de ADN durante varios ciclos en los que la secuencia

en blanco es fielmente copiada. Se aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual sintetiza naturalmente el ADN de las células. El nombre de la técnica depende del tipo de sustrato que se esté empleando, si se emplea ADN genómico se habla de una PCR típica, pero si se usa ADN complementario proveniente de ARNm se le conoce como RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción) controlada por la enzima transcriptasa reversa que convierte la molécula de ARNm en ADN complementario. El ADNc es usado cuando se analiza la expresión de ARNm de algún gen de interés (De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013; Manzaba, 2019; Pedrosa, 1999).

La polimerasa proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* (resistente a temperaturas de hasta 75°C), por lo que su funcionalidad es posible a temperaturas elevadas, siendo su nombre comercial más común “Taq polimerase”. Esta polimerasa termorresistente permite desnaturalizar el ADN a 94°C sin degradar la enzima con la amplificación de un segmento específico de ADN (Mérida & Moreno, 2015; Villegas, Sánchez, & Chuaire, 2009).

Es una técnica biológica molecular de alta especificidad, sensibilidad y versatilidad para la identificación de mínimas cantidades de un determinado fragmento específico de ADN. Hay que tener en cuenta que cuando se realiza una técnica de PCR, se está imitando al proceso que tiene lugar en la célula cuando el ADN es sintetizado (Mérida & Moreno, 2015; Rodríguez & Barrera, 2004).

2.7.2. Componentes

2.7.2.1 Muestra de ADN

Puede ser comercial o de un paciente a partir del cual se pretende obtener una copia de un fragmento (De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

2.7.2.2 Taq polimerasa

La mayoría de las enzimas se obtienen de forma comercial con una alta eficiencia y los casos reportados de fallas se deben a la manipulación incorrecta por parte del usuario. Es la enzima más usada con frecuencia, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, permite la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia en blanco. Existen otras enzimas como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Para una mayor especificidad en la reacción se debe poseer otros elementos como primers, dNTPs, MgCl₂, buffers y H₂O (Saiki et al., 1988; Carriello, Swenberg, & Skopek, 1991).

2.7.2.3 Soluciones amortiguadoras o buffers

Se usa concentrada diez veces, generalmente incluye Tris-HCl a un pH=8.4 en temperatura ambiente, KCl, gelatina y MgCl₂. Usualmente se hace uso de coadyuvantes que aumentan la especificidad y fidelidad de la reacción como el dimetilsulfóxido (DMSO) para disminuir la estructura secundaria del ADN, tween 20 o tritón X-100 para la estabilización de la enzima (Pomp & Medrano, 1991).

2.7.2.4 Oligonucleótidos de cadena sencilla o "Primers"

Los primers, cebadores u oligos Forward (F) y Reverse (R) se definen como secuencias de oligonucleótidos de cadena sencilla que delimitan la secuencia en blanco que se pretende amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente poseen una longitud comprendida de 18 a 30 nucleótidos y la proporción de G-C debe estar entre el 40 y 75% de la secuencia. Caso contrario, pueden formarse productos inespecíficos (dímeros) que afectan a la especificidad de la reacción (Brownie et al., 1997). Los oligos Forward (F) y Reverse (R) deben hibridarse con el templado y las cadenas de ADN puedan extenderse por la taq polimerase en dirección 5'-3' (De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

2.7.2.5 Desoxinucleósidos trifosfatos

Corresponden a los ladrillos o bases nitrogenadas sobre los cuales se construyen las nuevas cadenas de ADN. Deben poseer una concentración similar y relacionada con la de Mg⁺², puesto que actúa como agente quelante sobre los dNTPs, caso contrario se afecta a la especificidad y fidelidad de la reacción. Por lo general se utilizan concentraciones de 0,2 a 1mM (De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013; Rodríguez & Barrera, 2004).

2.7.2.6 Cloruro de magnesio

Cofactor enzimático que tiene la finalidad de estabilizar el ADN de una sola cadena. La concentración juega un papel crítico en la reacción debido a que influye en su especificidad, por lo que se debe mantener una concentración adecuada entre 0,5 y 2,5mM. Concentraciones elevadas disminuye la especificidad e insuficientes dan lugar a bajo rendimiento (De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013; Rodríguez & Barrera, 2004; Barrera-Saldaña, Ortiz-López, Rojas-Martínez, & Reséndez-Pérez, 1993).

2.7.2.7 Agua

Debe ser destilada libre de nucleasas. Tiene la función de disolvente en la reacción (De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

2.7.2.8 Termociclador

Conocido también como secuenciador térmico, es un equipo que facilita la ejecución de la reacción en cadena de la polimerasa mediante la realización automática y cíclica de temperaturas necesarias para la amplificación de un segmento específico de ADN. Son empleados para amplificaciones cualitativas o determinaciones cuantitativas del ADN amplificado dando resultados precisos, exactos y uniformes. Son utilizados en laboratorios de investigación biológica y molecular para múltiples aplicaciones, destacando la detección de expresión de genes en enfermedades hereditarias, clonación de genes, identificación de huellas, pruebas de paternidad o diagnóstico de enfermedades destructivas (Armas et al., 2006).

2.7.3. Etapas

2.7.3.1 Desnaturalización

Se separan las dos hebras del ADN mediante el calentamiento a una temperatura de 94°C durante 5 minutos dependiendo de la calidad y peso molecular del ADN. Con el calentamiento el ADN molde se desnaturaliza para la síntesis de su nueva cadena complementaria. El tiempo de incubación debe ser bajo debido a que a estas temperaturas es común que la actividad de la enzima disminuya rápidamente (Rodríguez & Barrera, 2004).

2.7.3.2 Hibridación o alineamiento

En esta fase ocurre la unión de los cebadores o primers a sus secuencias complementarias de la muestra de ADN, se produce el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde. El forward (F) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar; el que se une al extremo 3' es el reverse (R). La temperatura debe oscilar entre los 40 y 72°C para que ocurra el alineamiento específico entre ambos cebadores, esta temperatura se la conoce como temperatura de hibridación o annealing, donde el primer se adhiere eficientemente a su secuencia complementaria. Dicha temperatura depende las bases nitrogenadas. Un aumento de la temperatura mejora la especificidad debido a que reduce las uniones incorrectas de los cebadores y la extensión incorrecta de los nucleótidos en el extremo 3'. Para la elección de los primers hay que verificar que presenten la misma cantidad de Adenina-Timina y Citosina-Guanina y una concentración de 0,1 a 0,5 μM (Rodríguez & Barrera, 2004).

2.7.3.3 Extensión o elongación

Finalmente, la polimerasa copia la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos en dirección 5' – 3'. La temperatura debe ser alta para evitar uniones inespecíficas de los iniciadores, por lo general se trabaja a temperaturas dadas de 72°C (Rodríguez & Barrera, 2004).

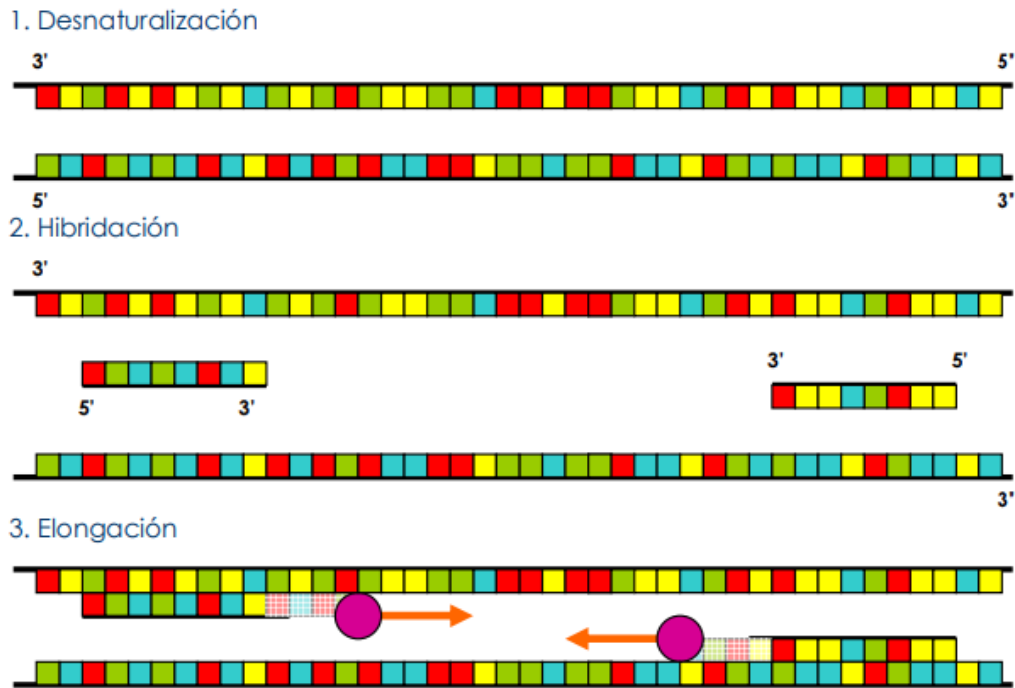


Figura 6: Representación de las fases de la PCR. Fuente: (Pérez, s.f.)

Metodología

3.1. Diseño y tipo de estudio

El presente trabajo es un estudio técnico de estandarización de una prueba diagnóstica llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biociencias, ubicado en el campus Balzay de la Universidad de Cuenca, durante los meses de febrero-mayo del 2023. Dado que se trabajó con muestras de ADN comercial para el proceso de estandarización no fue necesario realizar un cálculo de tamaño muestral.

3.2. Diseño de los primers/cebadores

Para el diseño de los primers, se realizó una búsqueda en la base de datos National Center for Biotechnology Information para la selección del cebador ideal (Anexo B). Se consideraron varios factores, como la ubicación de la variante dentro del amplicón, el porcentaje de citosinas-guaninas del segmento, la baja autocomplementariedad de los cebadores y temperaturas de alineación similares para los primers F (forward) y R (reverse).

Tras un análisis exhaustivo, se optó por emplear los primers 5F y 5R, ya que demostraron una alta especificidad para la región del gen de la β globina (Tabla 1). Estos primers se consideran ideales para la amplificación del fragmento deseado debido a su adecuada ubicación y capacidad para producir resultados precisos y confiables en el proceso de PCR.

Tabla 1: Primers/cebadores diseñados para la amplificación del fragmento rs35532010.

Primer	Secuencia (5' to 3')	%C-G	Tm (1M)	Tm (50mM)	nmoles
2F	GGC TCA TGG CAA GAA AGT GC	55	85	63	38,6
2R	CAA GCC TCC CAT AGA CTC AC	55	80	58	43,3
5F	TCT CTG TCT CCA CAT GCC CAG	57	85°C	64°C	51,9
5R	CCA TGG TGC ATC TGA CTC CTG	57	86°C	64°C	48,3

Una vez seleccionados los primers ideales que cumplieron con las especificaciones antes mencionadas, se llevó a cabo un análisis computacional (análisis in silico) en la página web UCSC Genome Browser Home para comprobar que la pareja de primers/cebadores escogidos se uniera al sitio específico del segmento rs35532010 y no a otro segmento del genoma (Anexo C).

Finalmente, los cebadores fueron solicitados al fabricante para su síntesis. Una vez recibidos en el laboratorio, se sometieron a un proceso de centrifugación por 40 segundos a 2000 rpm

para su posterior reconstitución con 500µL de agua grado biología molecular (agua bidestilada) para cada cebador.

3.3. Cuantificación del ADN

Para estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permitiera la amplificación del fragmento rs35532010 del gen de la β globina, se utilizaron muestras de ADN comercial. Se estimó la concentración y pureza de ADN de once muestras utilizando el Fluorómetro Qubit 4 de la marca ThermoFisher Scientific (Anexo D) y un Nano Espectrofotómetro de microvolumen de la marca Jenway (Anexo E), midiendo la absorbancia de cada muestra.

3.4. Estandarización de la técnica de PCR

Las condiciones ideales para la estandarización del modelo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron: una temperatura de 64°C y 1µl de ADN con una concentración de 80ng/µl. Estos parámetros permitieron la amplificación del fragmento rs35532010 del gen de la β globina.

Previo a la estandarización, se realizó la preparación de las soluciones de trabajo de cada uno de los primers (Anexo F) y la dilución de las muestras de ADN, para lo cual se empleó ecuación 1 (Ver Anexo I).

3.4.1. Estandarización de la concentración de ADN

Para determinar la concentración óptima de ADN, se realizaron diluciones de las muestras de ADN comercial, variando la concentración en dos ocasiones. Se seleccionaron las cinco muestras con una mayor concentración de ADN (≥ 80 ng/µl) para su dilución, lo cual permitiría obtener bandas de amplificación óptimas.

Para el primer protocolo, se decidió diluir las muestras de ADN a una concentración de 80ng/µL (Anexo I).

Debido a la tenuidad de las bandas de amplificación del anterior ensayo, se decidió aumentar la concentración de las muestras de ADN en el segundo y tercer protocolo. Por esta razón, únicamente se utilizó la muestra b (185ng/µl), la cual fue diluida hasta una concentración de 100ng/µl, con un volumen final de 20µl (Anexo I).

3.4.2. Estandarización de la cantidad de ADN

Durante el primer protocolo de la PCR se preparó el “Master Mix PCR” con un volumen de reacción total de 25µl, el cual contenía 22,5µl del PCR SuperMix, 0,5µl de solución de trabajo F-Primer, 0,5µl de solución de trabajo R-Primer, 0,5µl de agua estéril y 1µl de ADN (Tabla 2). Para la amplificación se emplearon cinco muestras, las cuales se trabajaron por duplicado y con dos controles negativos.

En el segundo protocolo también se preparó el “Master Mix PCR” con un volumen de reacción de 25µl, el cual de la misma forma contenía 22,5µl de PCR SuperMix, 0,5µl de solución de trabajo F-Primer, 0,5µl de solución de trabajo R-Primer, exceptuando que la cantidad de ADN fue de 1,5µl y no se incluyó el agua estéril, esperando que la banda de amplificación se observe más marcada que en el primer protocolo (Tabla 2). Se trabajó con seis especímenes de la muestra e y dos controles negativos.

Se realizó un tercer protocolo en donde los 25µl del Master Mix PCR estaban constituidos por 22,5µl de Mix de PCR, 0,5µl de solución de trabajo F-Primer, 0,5µl de solución de trabajo R-Primer, 1µl de agua estéril y 0,5µl de ADN. Se amplificaron cuatro muestras de ADN y dos controles negativos (Tabla 2).

El Master Mix de PCR empleado para la detección del fragmento rs35532010 estaba constituido por Mg⁺⁺, dNTPs, Taq DNA polimerasa recombinante.

Tabla 2: Condiciones para determinar la cantidad óptima de solución de ADN.

Componentes	Cantidad					
	Protocolo 1		Protocolo 2		Protocolo 3	
	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control
Agua estéril	0,5 µl	0,5 µl	0 µl	0 µl	1 µl	1 µl
Solución de trabajo F-Primer	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Solución de trabajo R-Primer	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Master Mix de PCR	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl
ADN	1 µl	X	1,5 µl	X	0,5 µl	X
Volumen total de reacción	25 µl	24 µl	25 µl	23,5 µl	25 µl	24,5 µl

3.4.3. Estandarización de la temperatura de alineación

Una vez preparadas las muestras, se procedió a realizar la PCR para la detección de una banda de 160pb correspondiente al ADN del fragmento rs35532010 del gen de la beta globina. Se empleó el termociclador de punto final de Applied BioSystems, el cual fue programado con las siguientes condiciones de tiempo y temperatura: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de los procesos de desnaturalización (94°C por 30'), hibridación (61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C y 66°C por 30') y elongación (72°C por 45'). Luego se realizó una extensión final por 5 minutos a 72°C y finalmente se conservó de manera indefinida a 4°C (Figura 7).

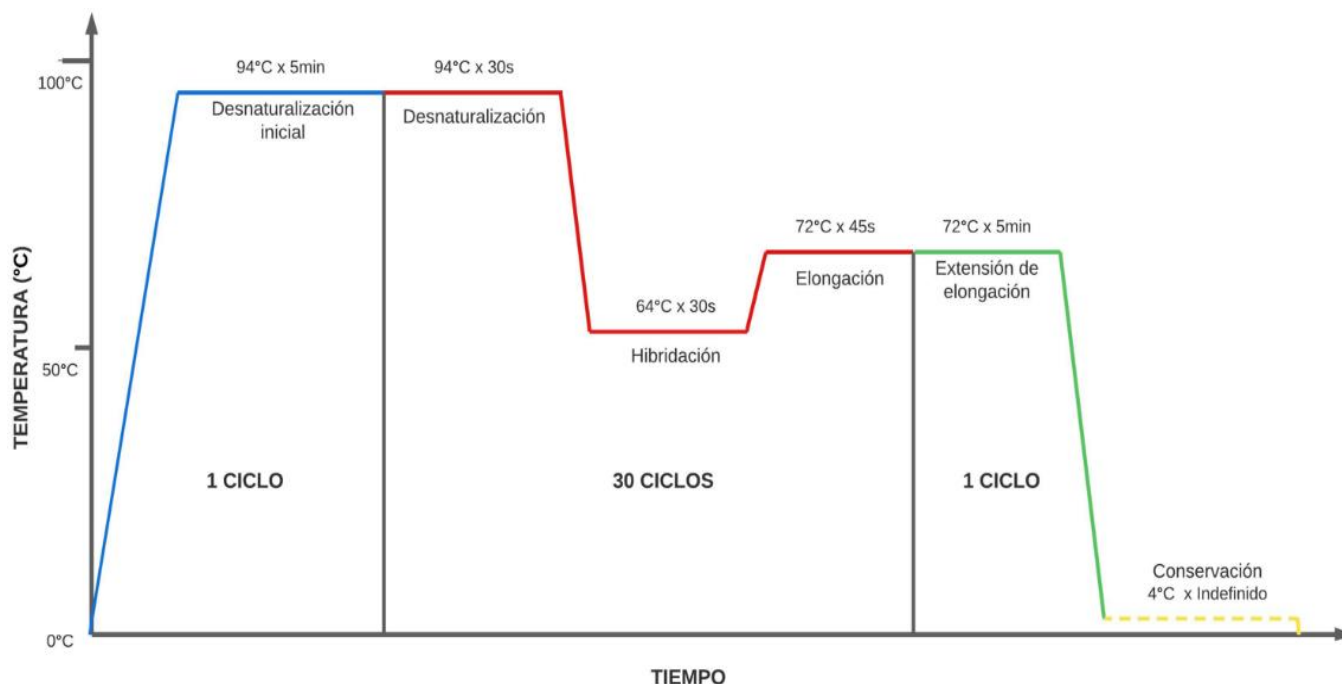


Figura 7: Programa de amplificación de PCR para el gen de la beta globina.

En el primer protocolo las muestras fueron sometidas a diferentes rampas de temperaturas: 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C y 66°C, con la finalidad de determinar aquellas que permitan una apropiada amplificación del ADN. Tanto las muestras, como sus duplicados y los controles negativos fueron dispuestos como se observa en la Figura 8 para la reacción de PCR.

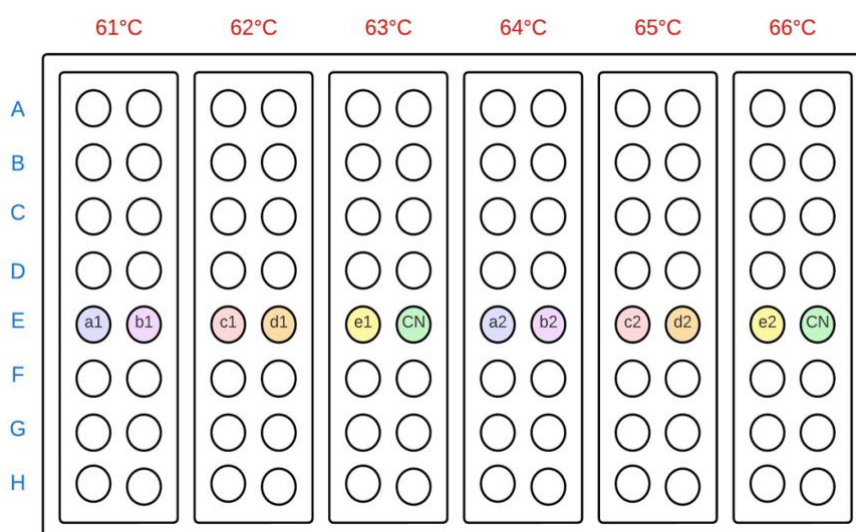


Figura 8: Disposición de las muestras en rampas de temperatura del primer protocolo.

Por otro lado, en el segundo protocolo de amplificación se sometieron las seis muestras y los dos controles negativos a cuatro rampas de temperatura: 62°C, 63°C, 64°C y 65°C, las cuales fueron distribuidas en el termociclador como se observa en la Figura 9.

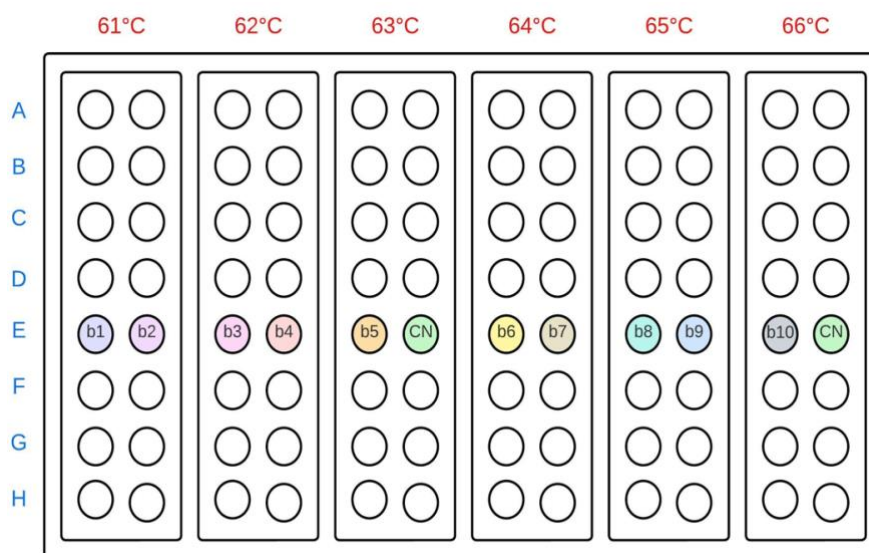


Figura 9: Disposición de las muestras en rampas de temperatura del segundo protocolo.

Por último, el tercer protocolo de amplificación se sometieron las cuatro muestras y dos controles negativos a temperaturas de 64°C, cada uno de estos productos fueron distribuidas en el termociclador como se observa en la Figura 10.

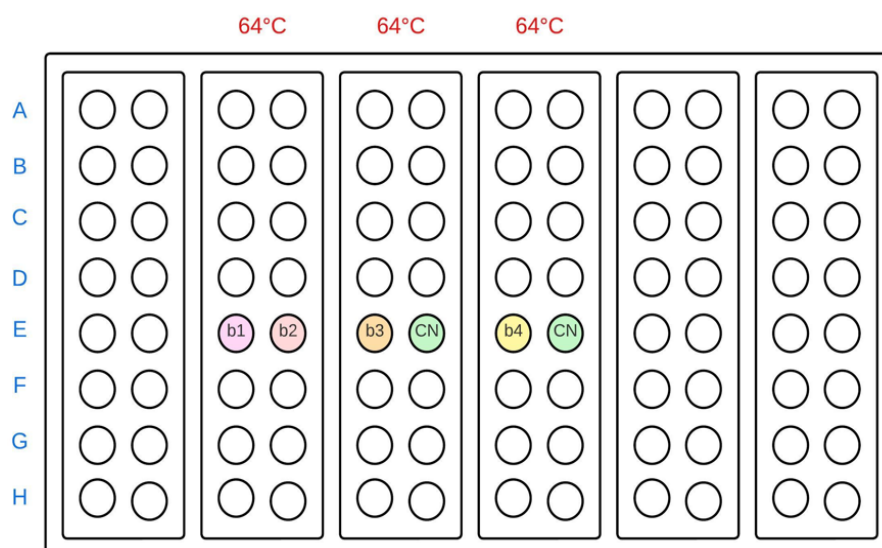


Figura 10: Disposición de las muestras en el termociclador durante el tercer protocolo.

3.5. Electroforesis

En el primer protocolo se preparó el gel de agarosa al 2% (p/v) (Anexo G), teñido con 5µl de bromuro de etidio y empleando como sustancia reguladora al TAE 1X (tampón tris acético). La separación del ADN se realizó en una cámara de electroforesis horizontal de la marca Enduro, empleando un voltaje constante de 90-105V durante una hora y posteriormente el gel fue colocado bajo luz ultravioleta para visualizar las bandas de amplificación. El tamaño estas bandas se estimó mediante la comparación con el marcador de peso molecular AccuLadder 100pb (BIONEER), el cual posee un rango de tamaño de 100 a 2000 pares de bases (Figura 11). Para el segundo protocolo, el gel fue preparado bajo las mismas condiciones anteriores, modificando únicamente la concentración de agarosa al 1,5% (Anexo H). Las bandas de amplificación fueron separadas en la cámara de electroforesis con un voltaje de entre 90-105V durante 55 minutos, para luego ser reveladas bajo la luz ultravioleta.

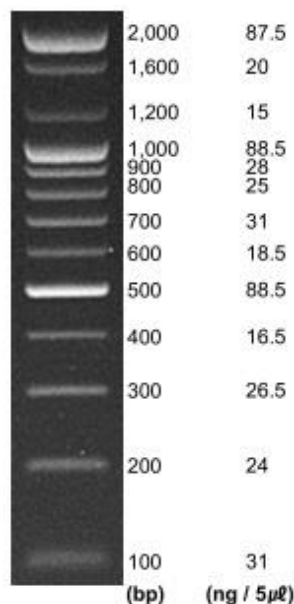


Figura 11: Bandas de amplificación del marcador de peso molecular 100pb BIONEER.

Resultados y discusión

4.1. Preparación de los primer/cebadores

Los primers/cebadores seleccionados fueron sometidos a un análisis in silico en la página web UCSC Genome Browser, en donde se confirmó su especificidad hacia el polimorfismo rs35532010, sin encontrar señales de alguna otra adherencia a otro segmento del ADN humano, como se observa en la Figura 12.

UCSC In-Silico PCR

```
>chr11:5226873+5227022 150bp CCACATGCCAGTTTCTATTGG CATGGTGCATCTGACTCCTG
CCACATGCCAGTTTCTATTGGtctccttaaacctgtcttgtaaccttga
taccacctgcccagggcctcaccaccaacttcatccacgttcaccttg
cccacagggcagtaacggcagacttctcctCAGGAGTCAGATGCACCATG
```

Figura 12: Análisis in silico de la secuencia correspondiente a la pareja de primers 5.

4.2. Cuantificación ADN

Se realizó la cuantificación de ADN de cada una de las muestras por los dos métodos: fluorometría y espectrofotometría. Una vez que se obtuvo los resultados se realizó una cuantificación aleatoria de las muestras para determinar la reproducibilidad de los datos.

4.2.1. Fluorometría

Tabla 3: Concentración de ADN determinado por fluorometría.

Muestra	Concentración ng/μL	Concentración ng/mL
1	0,848 ng/μl	21,2 ng/ml
2	0,652 ng/μl	16,3 ng/ml
3	1,94 ng/μl	48,5 ng/ml
4	4,32 ng/μl	108 ng/ml
5	17,6 ng/μl	439 ng/ml
6	3,30 ng/μl	82,6 ng/ml
7	1,87 ng/μl	46,7 ng/ml
8	6,88 ng/μl	172 ng/ml
9	6,48 ng/μl	162 ng/ml
10	5,08 ng/μl	127 ng/ml
11	3,37 ng/μl	84,3 ng/ml

4.2.2. Espectrofotometría

Tabla 4: Concentración de ADN determinado por espectrofotometría.

Muestra	Concentración ng/μL	Absorbancia
1	80,87 ng/μl	0,081nm
2	21,78 ng/μl	0,022nm
3	17,95 ng/μl	0,018nm
4	52,95 ng/μl	0,053nm
5	185,0 ng/μl	0,185nm
6	39,54 ng/μl	0,040nm
7	23,27 ng/μl	0,023nm
8	87,56 ng/μl	0,088nm
9	74,21 ng/μl	0,074nm
10	82,12 ng/μl	0,082nm
11	103,1 ng/μl	0,103nm

4.3. Estandarización de la técnica de PCR

Durante el primer protocolo de amplificación, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con cinco muestras, sus respectivos duplicados y dos controles negativos. Para la preparación de las muestras se decidió utilizar 1μl de ADN previamente diluido hasta una concentración de 80ng/μl, y se sometieron a la amplificación a diferentes rampas de temperatura: 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C y 66°C, y para verificar la presencia del amplicón se realizó la electroforesis en el gel de agarosa 2%, como se observa en la Figura 13. Se puede evidenciar las bandas de amplificación de cada una de las cinco muestras, sin embargo, estas se encuentran amplificando por debajo de las 100pb, por esta razón y la tenuidad de las bandas se decidió modificar ciertos parámetros que permitan la obtención de bandas más claras, de buena intensidad y que correspondan al peso de 160pb comparado con el marcador de peso molecular.

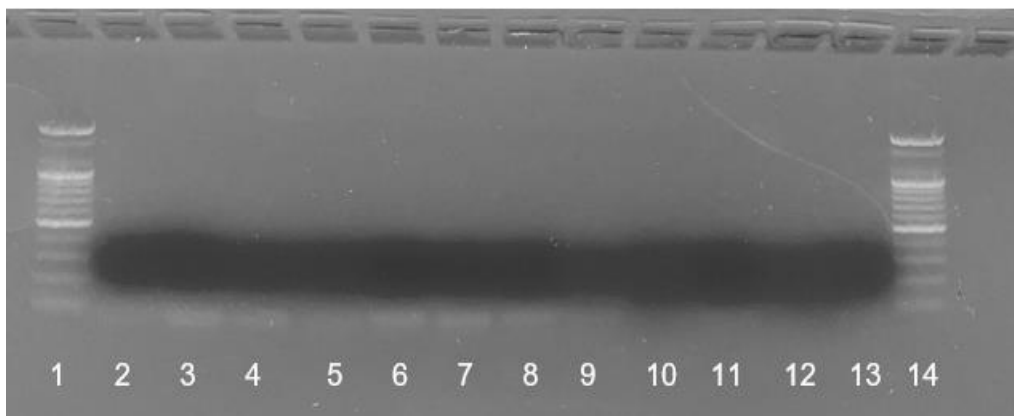


Figura 13: Gel de electroforesis de ADN del primer protocolo (agarosa al 2% (p/v) en tampón TAE 1X). Carril 2: muestra a¹. Carril 3: muestra a². Carril 4: muestra b¹. Carril 5: muestra b². Carril 6: muestra c¹. Carril 7: muestra c². Carril 8: muestra d¹. Carril 9: muestra d². Carril 11: muestra e¹. Carril 12: muestra e². Carril 10 y 13: controles negativos. Carril 1 y 14: marcadores de peso moleculares de 100pb.

En el segundo protocolo, se realizó el ensayo únicamente con cinco muestras del espécimen b, sus respectivos duplicados y dos controles negativos. En este ensayo las rampas de temperaturas de temperatura fueron las mismas (61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C y 66°C), se decidió preparar las muestras con 1,5µl de ADN previamente diluido a hasta 100ng/µl y se verificó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, como se observa en la Figura 14. En esta ocasión no se evidenció con claridad la amplificación del segmento rs35532010, por lo que se decidió modificar la cantidad de ADN en el “Master Mix PCR”.

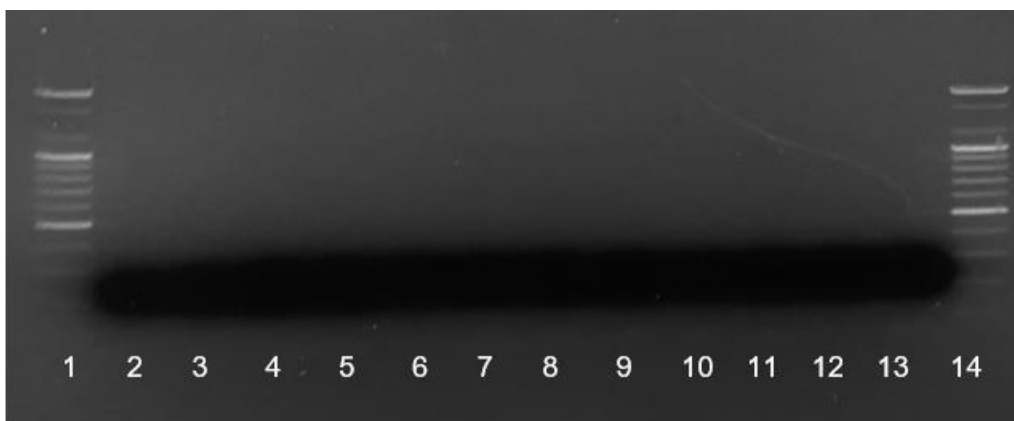


Figura 14: Gel de electroforesis de ADN del segundo protocolo (agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TAE 1X). Carril 2: muestra b¹. Carril 3: muestra b². Carril 4: muestra b³. Carril 5: muestra b⁴. Carril 6: muestra b⁵. Carril 8: muestra b⁶. Carril 9: muestra b⁷. Carril 10: muestra b⁸. Carril 11: muestra b⁹. Carril 12: muestra b¹⁰. Carril 7 y 13: Controles negativos. Carril 1 y 14: marcadores de peso moleculares de 100pb.

En el tercer protocolo se analizaron dos muestras con sus respectivos duplicados y dos controles negativos. Ya que en el anterior protocolo con el aumento de la concentración de ADN no hubo la presencia del amplicón, se decidió experimentar con la disminución de la concentración a 0,5µl para la preparación del “Master Mix PCR”, las condiciones de temperatura se mantuvieron intactas, al igual que la concentración de ADN (100ng/µl). Una vez realizada la amplificación se procede con la electroforesis en gel de agarosa al 2%, sin embargo, no se evidenció la amplificación de ninguna de las muestras testeadas (Figura 15).

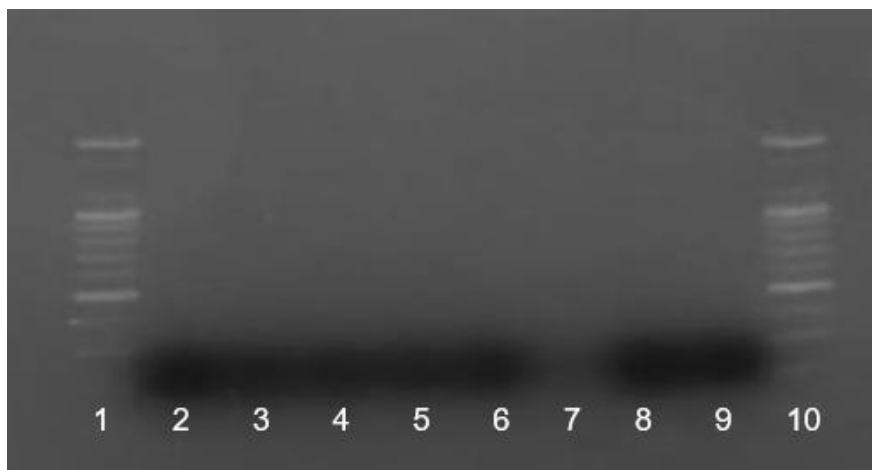


Figura 15: Gel de electroforesis de ADN del tercer protocolo (agarosa al 2% (p/v) en tampón TAE 1X). Carril 2: muestra b¹. Carril 3: muestra b¹. Carril 4: muestra b³. Carril 5: muestra b⁴. Carril 6: muestra b⁵. Carril 9: muestra b⁶. Carril 7 y 8: Controles negativos. Carril 1 y 10: marcadores de peso molecular de 100pb.

Se determinó que los primers tienen la capacidad de unirse de manera correcta al fragmento rs35532010 en cualquiera de las temperaturas probadas, como se observa en la electroforesis del primer protocolo. Finalmente, se decidió optar por la amplificación a una temperatura de 64°C, ya que es la temperatura intermedia y demuestra presentar una banda identificable. Además, en el primer protocolo se dio la amplificación cuando se preparó el “Master Mix PCR” con 1µl de ADN a una concentración de 80ng/µl, sin embargo, cuando se experimentó con 0,5µl y 1,5µl ya no se evidenciaron bandas de amplificación claras. Por esta razón se decidió que las condiciones ideales para la amplificación del polimorfismo rs35532010 sea una cantidad de 1µl de ADN previamente diluido a 80ng/µl y sometidos a una temperatura de 64°C.

4.4. Discusión final

Según Taher, Musallam y Capellini (2021) la β-talasemia es uno de los trastornos hereditarios más comunes en varias partes del mundo, siendo los países del Medio Oriente y del sudeste

asiático los más afectados por dicha enfermedad, sin embargo, debido al alto índice de migración, la población europea y americana se ha visto perjudicada. En Latinoamérica la prevalencia al nacimiento de talasemia es de 0,10/1000, y en Colombia, específicamente en ciudades como Cali, Cartagena, San Andrés, Buenaventura y Providencia se han realizado diversas investigaciones de estas hemoglobinopatías que se encuentran afectando a población afrodescendiente (Carvajal, 2019). El presente estudio es uno de los primeros realizados en el Ecuador que pretende mediante sus resultados ser un referente a futuro para el diseño de pruebas diagnósticas prenatales, con la finalidad de llevar un control en la propagación de la β -talasemia como consecuencia de las actividades migratorias del continente asiático.

En este estudio para identificar la mutación “27/28 +C” productora de β -talasemia por el polimorfismo rs35532010 se realizó la técnica de PCR, utilizando como condiciones de trabajo 0,5 μ l de agua estéril, 0,5 μ l del primer forward (TCT CTG TCT CCA CAT GCC CAG), 0,5 μ l del primer reverse (CCA TGG TGC ATC TGA CTC CTG), 22,5 μ l del Mix de PCR y 1 μ l de ADN con una concentración de 80ng/ml. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador de punto final, cuyo protocolo de amplificación fue programado para que se dé una desnaturalización inicial a 94°C por cinco minutos y luego de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, seguido de una hibridación de 30 segundos a distintas temperaturas de alineación, con una elongación final por 45 segundos a una temperatura de 72°C y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La selección de los primers se basó en las mejores condiciones de especificidad con el polimorfismo rs35532010 en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* con el fin de escoger aquellos que tuvieran el mejor perfil para la finalidad del trabajo. Se comprobó que estos cebadores/primers efectivamente se unen al sitio específico del segmento rs35532010 mediante un análisis computacional in silico. Se eligieron los primers 5F y 5R, con una secuencia de nucleótidos de TCT CTG TCT CCA CAT GCC CAG y CCA TGG TGC ATC TGA CTC CTG respectivamente. En un estudio chino publicado por Cai y Kan (1990), se realizó una estandarización de PCR para la detección de 12 distintitos tipos de β -talasemia sobre la base de movilidad de los homoduplex y heteroduplex en la población china. En dicho estudio se seleccionaron 4 cebadores para la amplificar regiones de la globina β que contienen estas mutaciones (Cai & Kan, 1990). La secuencia de oligonucleótidos usadas se detalla en la Tabla 6. Cai y colaboradores (1991) en su estudio se refiere a una nueva mutación encontrada en la hija de una familia de origen chino, la cual consiste en la inserción

de un nucleótido de citosina en el codón 27/28 que origina un cambio en el marco de lectura provocando la B-talasemia. Para la amplificación de la PCR usaron dos cebadores cuya secuencia de nucleótidos consistía en: 5'-TCC TAA GCC AGT GCC AGA AG-3' y 5'-GAC CTC CCA CAT TCC CTT TT-3' (Cai et al., 1991).

Tabla 5: Secuencia de cebadores de oligonucleotidos.

Fragment	Position	5'-Secuence-3'
I	-123 → -104 +33 → +14	[GC]-CTGTCATCACTTAGACCTCA GCTAGTGAACACAGTTGTGT
II	exon I codón 3 → 9 IVSI-70 → IVSI-51	CTGACTCCTGAGGAGAAGTC [GC]-GTCTTCTCTGTCTCCACATG
III	IVSI-101 → IVSI-120 exon II codón 97 → 89	[GC]-CTGCCTATTGGTCTATTTTC TGCAGCTTGTACAGTGCAGCTCACT
IV	IVSII-588 → IVSII-607 exon III codón 132 → 125	ATGATACAATGTATCATGCC [GC]-TCTGATAGGCAGCCTGCACT

[GC] = GC clamp sequence: GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCG CGG CGG GGC

Estas condiciones difieren de lo publicado por Lin y colaboradores en el año 2013, estudio que buscó documentar la prevalencia y caracterización de las hemoglobinopatías más conocidas en la población Hakka, región Meizhou del sur de China, donde se amplificaron cinco mutaciones y deleciones de α -talasemia y 16 mutaciones de β -talasemia, entre las cuales se encuentra la 27/28 +C. Para ello emplearon un sistema optimizado con un volumen total de 50 μ l, en donde se incluyó 100ng de ADN genómico, 25 μ mol de cada uno de los primers, 1mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP y 2,5 unidades de Taq polimerasa; la amplificación del gen de la globina β se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C por tres minutos, 35 ciclos de PCR (95°C por 30s, 57°C por 30s y 72°C durante un minuto), lo cual les permitió descubrir tres casos de la mutación 27/28 +C entre las 1743 muestras de Meizhou. Por otro lado, en el estudio realizado por Liu y sus colaboradores (2011) se detectaron diferentes trastornos del gen de la hemoglobina (α y β) en población taiwanesa, entre ellos dos casos de pacientes con β -talasemia con el genotipo del codón 27/28 +C. Para identificar estas variantes de Hb se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, donde la amplificación se dio con una reacción de 100 μ l que contenía ADN genómico de 100-500ng, 100ng de cada pareja de cebadores, 50 μ M de cada dNTP, 1x PCR buffer y 2,5 unidades de Taq polimerasa; la reacción se efectuó mediante una desnaturalización de 35 ciclos a una temperatura de 94°C por dos minutos, luego una hibridación por dos minutos a 58°C, seguida de una extensión a 72°C por 3 minutos y por último, una elongación final de 5 minutos a 72°C; los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Durante la electroforesis en gel de agarosa, las bandas de amplificación del polimorfismo rs35532010 se encontraban aisladas de manera difusas o tenues, y a menos de 100 pares de base, peso al cual no corresponde dicho polimorfismo (160pb). De acuerdo con el estudio de Barril y Nates realizado en el 2012, los geles de agarosa permiten la separación de fragmentos de ADN de 200 a 50.000pb, dependiendo de la concentración utilizada. A pesar de presentar un amplio rango de separación, poseen un poder de resolución bajo, debido al tamaño de sus poros que impide evidenciar de manera adecuada la separación y claridad de las bandas de amplificación (Mesapogu, Jillepalli, & Arora, 2013). Para la separación de fragmentos de ADN pequeños, como el caso del polimorfismo rs35532010, se debe optar por la realización de electroforesis con gel de poliacrilamida, ya que presenta varias ventajas con respecto al gel de agarosa. Este tipo de gel posee un mejor poder de resolución, permitiendo observar bandas claras y limpias. Además, presentan un tamaño de poro más pequeño que posibilitará la correcta migración de las muestras de bajo peso molecular, como el caso de nuestro fragmento de interés (Barril & Nates, 2012).

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

El objetivo general de este estudio fue estandarizar un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permita la amplificación del polimorfismo rs35532010 del gen de la hemoglobina β , para ello se realizaron tres distintos ensayos, en los cuales se testearon distintas temperaturas de alineación, cantidades y concentraciones de ADN.

Para la técnica de PCR se seleccionó la pareja de primers/cebadores 5 que resultaron ser altamente específicos para la detección del polimorfismo rs35532010, ya que en el análisis in silico se logró evidenciar la unión de estos a nuestro fragmento de interés y no a otro segmento del genoma humano o entre ellos (primers autocomplementarios).

En cuanto a la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de los tres protocolos realizados, fue el primer protocolo el que permitió la amplificación de nuestro polimorfismo, donde para la reacción se empleó 1 μ l de ADN con una concentración de 80ng/ml sometida a diferentes temperaturas de alineación. Lo cual fue comprobado por la ausencia del amplicón en los siguientes protocolos al modificar cada uno de estos parámetros. La verificación de la amplificación se realizó mediante electroforesis, donde a pesar de su positividad y la ausencia de amplicones inespecíficos, las bandas reflejadas se encontraban difusas y separadas por debajo de las 100pb (tamaño que no corresponde al fragmento rs35532010 de 160pb), debido a los grandes poros del gel de agarosa que impiden la correcta migración de los fragmentos pequeños.

5.2. Recomendaciones

- Aumentar la concentración de agarosa en la electroforesis, ya que tiene una relación inversamente proporcional. Si el objetivo es separar fragmentos pequeños de ADN, se debe utilizar mayores concentraciones de agarosa; para aislar fragmentos de entre 100 a 1000 pares de base se recomienda emplear una concentración de agarosa al 3%.
- Los geles de poliacrilamida resultan más efectivos para la separación de fragmentos de ADN de menor tamaño, debido a su mayor capacidad de resolución y versatilidad comparados con los geles de agarosa.
- Con el protocolo de estandarización finalizado, es posible realizar una secuenciación Sanger del polimorfismo rs35532010, el cual será de gran utilidad para determinar el estado de cigosidad de los pacientes que padecen de β -talasemia y subsecuentemente implementar estrategias para controlar la propagación de la enfermedad.

Referencias

- Ahmed, M., Ghatge, M., & Safo, M. (2020). Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem*, 94, 345-382.
- Ali, S., Mumtaz, S., Shakir, H., Khan, M., Tahir, H., Mumtaz, S., . . . Khan, M. (2021). Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 9(12), 1-14.
- Angulo, G., Koss, R., & Monge, J. (2020). Generalidades y tratamientos emergentes en la Beta-talasemia. *Revista Médica Sinergia*, 5(12), 1-16.
- Armas, A., García, I., Morales, E., Alonso, V., González, I., Martínez-Casado, J., . . . González, Y. (2006). Validación del termociclador TEMPER en ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa. *Bioteología Aplicada*, 23(4), 305-310.
- Asadov, C., Alimirzoeva, Z., Mammadova, T., Aliyeva, G., & Gafarova, S. (2018). β -Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. *International Journal of Hematology*, 108(1), 5-21.
- Baird, D., Batten, S., & Sparks, S. (2022). Alpha- and Beta-thalassemia: Rapid Evidence Review. *American Family Physician*, 105(3), 272-280.
- Barrera-Saldaña, H., Ortíz-López, R., Rojas-Martínez, A., & Reséndez-Pérez, D. (1993). Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva Época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*, 18(108), 50-60.
- Barril, P., & Nates, S. (2012). Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivity. En S. Magdeldin, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (págs. 3-14). InTech.
- Bashir, S., Ehsan, Y., & Jafri, H. (2017). Prevalence of Beta Thalassemia and Other Hemoglobinopathies - Carriers Status of Students in Educational Institutes of Central Punjab. *Journal of Fatima Jinnah Medical University*, 11(4), 9-14.
- Bellis, G., & Parant, A. (2022). Beta-thalassemia in Mediterranean countries. Findings and outlook. *Investigaciones Geográficas*(77), 129-138.
- Boulad, F., Mansilla-Soto, J., Cabriolu, A., Riviére, I., & Sadelain, M. (2018). Gene Therapy and Genome Editing. *Hematology and Oncology Clinic North American*, 32(2), 329-342.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., & Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*, 25(16), 3235-3241.

- Cai, S., & Kan, Y. (1990). Identification of the multiple beta-thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(2), 550-553.
- Cai, S., Chui, D., Ng, J., Poon, A., Freedman, M., & Olivieri, N. (1991). A New Frameshift Po-Thalassemia Mutation (Codons 27-28+C) Found in a Chinese Family. *American Journal of Hematology*, 37(1), 6-8.
- Cao, A., & Galanello, M. (2010). Beta-Thalassemia. *Genetics in Medicine*, 12(2), 61-76.
- Carvajal, M. (2019). Beta-Talasemia: Un mundo de complicaciones con nuevas alternativas de tratamiento. *Archivos de Medicina en Colombia*, 19(1), 148-159.
- Chiappe, G. (2017). Talasemias: Aspectos clínicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 51(3), 281-289.
- De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud*, 2(2), 70-78.
- De Sanctis, V., Kattamis, C., Canatán, D., Soliman, A., Elsedey, H., Karimi, M., . . . Angastiniotis, M. (2017). β -thalassemia distribution in the Old World: an ancient disease seen from a historical standpoint. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 9(1), 1-14.
- Dong, A., & Rivella. (2017). Gene Addition Strategies for β -Thalassemia and Sickle Cell Anemia. *Advances Experimental in Medicine and Biology*, 1013(1), 155-176.
- Eandi, S., Pepe, C., Aguirre, F., Milanesio, B., Fernández, D., Mansini, A., & Feliú, A. (2015). Beta talasemia intermedia: características clínicas y estudio molecular. Serie de casos clínicos. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 113(5), 294-298.
- Erramouspe, B., & Eandi, S. (2017). Técnicas convencionales aplicadas al diagnóstico de las hemoglobinopatías. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 51(3), 325-332.
- Fitzhugh, C., Abraham, A., & Hsieh, M. (2017). Alternative Donor/Unrelated Donor Transplants for the β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Advances Experimental in Medicine and Biology*, 1013(1), 123-153.
- Galanello, R., & Origa, R. (2010). Review Beta-thalassemia. *Journal of Rare Diseases*, 5(11), 1-11.
- Ghosh, K., Gosh, K., Agrawal, R., & Nadkarni, A. (2019). Recent advances in screening and diagnosis of haemoglobinopathy. *Expert Review of hematology*, 13(1), 13-21.
- Giardine, B., Borg, J., Higgs, D., Peterson, K., Maglott, D., Basak, N., . . . Miller, W. (2011). Systematic documentation and analysis of human genetic variation using the microattribution approach. *Nature Genetics*, 43(4), 1-8.
- Giardine, B., Borg, J., Viennas, E., Pavlidis, C., Moradkhani, K., Joly, P., . . . Patrinos, G.

- (2014). Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Research*, 42. Obtenido de Nucleic Acids Res.
- Goñi, M., Galindo, C., & Goñi, A. (2008). Actualización en Medicina de Familia. Talasemias. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 34(3), 138-142.
- Grech, L., Borg, K., & Borg, J. (2021). Novel therapies in β -thalassaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(6), 2509-2524.
- Hashmi, G. Q., Fernández, K., & Seul, M. (2020). Enabling routine β -thalassemia Prevention and Patient Management by scalable, combined Thalassemia and Hemochromatosis Mutation Analysis. *BMC Medical Genetics*, 21(108), 1-9.
- He, L., Chen, W., Yang, Y., Xie, J., Xiong, Z., Chen, D., . . . X. (2019). Elevated Prevalence of Abnormal Glucose Metabolism and Other Endocrine Disorders in Patients with β -Thalassemia Major: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2019(1), 1-14. (<https://doi.org/10.1155/2019/6573497> de 2019).
- Hoffbrand, A., & Steensma, P. (2019). *Essential Hematology*. Philadelphia: Wiley Blackwell.
- Hoffman, R., Benz, E., Silberstein, L., Heslop, H., Weitz, J., & Anastasi, J. (2018). *Hematology*. Philadelphia : Elsevier.
- Islam, M., Sultana, N., Kumar, S., Hossain, T., Tasnim, S., Al Mahmud, M., . . . Mannoor, K. (2021). Association of diverse population of red blood cells with different disease manifestations in patients with beta-thalassemia. *Meta Gene*, 27, 1-7.
- Kattamis, A., Forni, G., Aydinok, Y., & Viprakasit, V. (2020). Changing patterns in the epidemiology of β -thalassemia. *European Journal of Haematology*, 105(6), 692-703.
- Kattamis, A., Kwiatkowski, J., & Aydinok, Y. (2022). Thalassaemia. *The Lancet*, 399(10343), 2310-2324.
- Korula, A., Devasia, A., Lakshmi, K., Abraham, A., & Sindhuvi, E. (2018). Second Hematopoietic Stem Cell Transplant for Thalassemia Major: Improved Clinical Outcomes with a Treosul- fan-Based Conditioning Regimen. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 24(1), 103-108.
- Kountouris, P., Lederer, C., Fanis, P., Feleki, X., Old, J., & Kleanthous, M. (2014). IthaGenes: An Interactive Database for Haemoglobin Variations and Epidemiology. *PLoS One*, 9(7), 2-10.
- Lazarte, S., Leri, M., Jiménez, C., Haro, A., Burgos, M., & Issé, B. (2012). Resistencia osmótica eritrocitaria en el diagnóstico de anemias hereditarias en Tucumán, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(4), 645-653.

- Lei, M., Sun, L., Luo, X., Yang, X., Yu, F., Chen, X., & Wang, Z. (2019). Distinguishing iron deficiency anemia from thalassemia by the red blood cell lifespan with a simple CO breath test: A pilot study. *Journal of Breath Research*, 2(1), 4-6.
- Li, X., Sun, X., Chen, J., Qin, M., Luan, Z., & Zhu, Y. (2018). Hematopoietic stem cell transplantation for children with β -thalassemia major: multicenter experience in China. *World Journal Pediatric*, 14(1), 92-99.
- Lin, W., Wen, Y., Wu, J., Wang, Q., Zheng, L., Liu, G., & Yang, L. (2013). Hemoglobinopathy: Molecular Epidemiological Characteristics and Health Effects on Hakka People in the Meizhou Region, Southern China. *PLoS One*, 8(2).
- Liu, S., Peng, C., Lin, T., Wang, S., Shih, M., Chang, C., . . . Lin, C. (may de 2011). Molecular lesion frequency of hemoglobin gene disorders in Taiwan. *Hemoglobin*, 35(3), 228-236.
- Magrin, E., Miccio, A., & Cavazzana, M. (2019). Lentiviral and genome-editing strategies for the treatment of β -hemoglobinopathies. *Blood*, 134(15), 1203-1213.
- Manzaba, C. (2019). *Estandarización de una técnica molecular de PCR para identificación de especies de Leishmania*. Loja: Universidad Nacional de Loja.
- Martin, A., & Thompson, A. (2013). Thalassemias. *Pediatric Clinics North American*, 60(6), 1383-1391.
- Martínez, P., Angastiniotis, M., Eleftheriou, A., Gulbis, B., Mañú, M., Petrova-Benedict, R., & Vives, J. (2014). Haemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(97), 1-7.
- Merida, F., & Moreno, E. (2015). *Manual para Técnico Superior de Laboratorio Clínico y Biomédico*. España: Panamericana.
- Mesapogu, S., Jillepalli, C., & Arora, D. (2013). *Agarose Gel Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Methods and Principles*. Berlin: Springer Protocols Handbooks.
- Ministerio de Salud Pública. (2012). *Política Nacional de Genética en Salud Humana 2013 – 2023*. Quito: Dirección Nacional de Normatización.
- Modell, B., & Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), 480-487.
- Mondal, S., & Mandal, S. (2016). Prevalence of thalassemia and hemoglobinopathy in eastern India: A 10-year high-performance liquid chromatography study of 119,336 cases. *Asian Journal of Transfusion Science*, 10(1), 105-110.
- Motta, I., Bou-Fakhredin, R., Taher, A., & Capellini, M. (2020). Beta Thalassemia: New Therapeutic Options Beyond Transfusion and Iron Chelation. *Drugs*, 80(11), 1053-

1063.

- Musallam, K., Bou-Fakhredin, R., Capellini, M., & Taher, A. (2021). 2021 update on clinical trials in β -thalassemia. *American Journal of Hematology*, 96(11), 1518-1531.
- Musallam, K., Taher, A., & Rachmilewitz. (2012). β -Thalassemia Intermedia: A Clinical Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), 1-15.
- Needs, T., González-Mosquera, L., & Lynch, D. (1 de Enero de 2023). *Beta Thalassemia*. Obtenido de National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531481>
- Nelson, D., & Cox, M. (2019). *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Ediciones Omega S.A.
- Oikonomidou, P., & Rivella, S. (2018). What can we learn from ineffective erythropoiesis in thalassemia. *Blood Reviews*, 32(2), 130-143.
- Origa, R. (4 de febrero de 2000). Beta-Thalassemia. En *GeneReviews*. Seattle: University of Washington. Obtenido de GeneReviews: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20301599/>
- Origa, R. (2017). β -Thalassemia. *Genetics in Medicine*, 19(6), 609-619.
- Park, B., Kim, H., Kim, S., Lee, J., Park, Y., Jang, P., . . . Cho, B. (2018). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies with myeloablative conditioning and rabbit anti-thymocyte globulin. *Blood Research*, 53(2), 145-151.
- Pedrosa, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2), 1-10.
- Pomp, D., & Medrano, J. (1991). Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 10(1), 58-59.
- Rodríguez, I., & Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas antes de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3), 323-335.
- Ropero, P., González, F., Martínez, J., Torres, W., & Benavente, C. (2021). β -Talasemia intermedia: Triplicación de genes α/β talasemia heterocigota en España. *Anales RANM*, 138(1), 60-71.
- Rund, D., & Rachmilewitz, E. (2005). β -Thalassemia. *The New England Journal of Medicine*, 353(11), 1135-1146.
- Sabath, D. (2023). The role of molecular diagnostic testing for hemoglobinopathies and thalassemias. *International Journal of Laboratory Hematology*, 45(2), 71-78.
- Sáenz-Renaud, G., & Rodríguez-Romero, W. (2006). Síndromes talamésicos. Nuevos conceptos y estado actual del conocimiento en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 48(4), 172-176.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., . . . Erlich, H. (1988).

- Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sayani, F., & Kwiatkowski, J. (2015). Increasing prevalence of thalassemia in America: Implications for primary care. *Annals of Medicine*, 47(7), 592-604.
- Scheps, K., Francipane, L., Nash, A., Cerrone, S., Copelli, S., & Varela, V. (2015). Bases moleculares de alfa-talasemia en la Argentina. *Medicina*, 75(2), 81-86.
- Stauder, R., Valent, P., & Theurl, I. (2018). Anemia at older age: Etiologies, clinical implications, and management. *Blood Journal of American Society and Hematology*, 131(5), 505-514.
- Taewtrakul, N., Jetsrisuparb, A., Pongudom, S., Sirijerachai, C., Chansung, K., Wanitpongpun, C., & Fucharoen, S. (2018). Epidemiologic study of major complications in adolescent and adult patients with thalassemia in Northeastern Thailand: the E-SAAN study phase I. *Hematology*, 23(1), 55-60.
- Taher, A., & Capellini, M. (2018). How I manage medical complications of β -thalassemia in adults. *Blood*, 132(17), 1781-1791.
- Taher, A., Isma'eel, H., & Capellini, M. (2006). Thalassemia intermedia: Revisited. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 37(1), 12-20.
- Taher, A., Karakas, Z., Cassinerio, E., Siritanaratkul, N., Kattamis, A., Maggio, A., . . . Aydinok, Y. (2018). Efficacy and safety of ruxolitinib in regularly transfused patients with thalassemia: results from a phase 2a study. *Blood*, 131(2), 263-265.
- Taher, A., Musallam, K., & Cappellini, M. (2021). β -Thalassemias. *The New England Journal of Medicine*, 384(8), 727-743. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmra2021838>
- Tari, K., Ardalan, P., Abbaszadehdibavar, M., Atashi, A., Jalili, A., & Gheidishahrn, M. (2018). Thalassemia an update: molecular basis, clinical features and treatment. *International Journal of BioMedicina and Public Health*, 1(1), 48-58.
- Teli, A., Deori, R., & Protim, S. (2016). Haemoglobinopathies and β -Thalassaemia among the Tribals Working in the Tea Gardens of Assam, India. *Journal of Clinic & Diagnostic Research*, 10(12), 19-22.
- Thaer, A., Weatherall, D., & Capellini, D. (2018). Thlassaemia. *The Lancet*, 391(1), 155-167.
- Thein, S. (2013). The Molecular Basis of β -Thalassemia. *Cold Spring Hrbor Perspectives in Medicine*, 3(5), 1-25.
- Vargas, C. (2011). β - Talasemia. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 67(598), 355-357.
- Villegas, V., Sánchez, M., & Chuaire, L. (2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colombia Médica*, 40(3), 347-352.

- Vitrano, A., Calvaruso, G., Lai, E., Colletta, G., Quota, A., Gerardi, C., . . . Di Maggio, R. (2017). The era of comparable life expectancy between thalassaemia major and intermedia: Is it time to revisit the major-intermedia dichotomy? *British Journal of Haematology*, 176(1), 124-130.
- Weatherall, D., & Clegg, J. (2001). *The Thalassaemia Syndromes*. Oxford: Blackwell Science.
- Wienert, B., Martyn, G., Funnell, A., Quinlan, K., & Crossley, M. (2018). Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. *Trends in Genetics*, 34(12), 927-940.
- Zhang, X., Hao, W., Xu, T., Liu, S., & Jiang, H. (2017). Diagnosis and treatment of neoplastic post-transplant lymphoproliferative disorder following hematopoietic stem cell transplant in β -thalassemia: A pediatric case report. *Medicine (Baltimore)*, 96(52).

Anexos

Anexo A: Materiales, reactivos y equipos empleados para la estandarización del fragmento rs35532010

Materiales

Los materiales utilizados para los distintos procedimientos de análisis fueron tubos Eppendorf, gradillas de tubo Eppendorf, matraz Erlenmeyer de 250ml, espátulas, probeta de 100ml, puntas para pipetas de 10, 20, 100, 200 μ l.

Reactivos

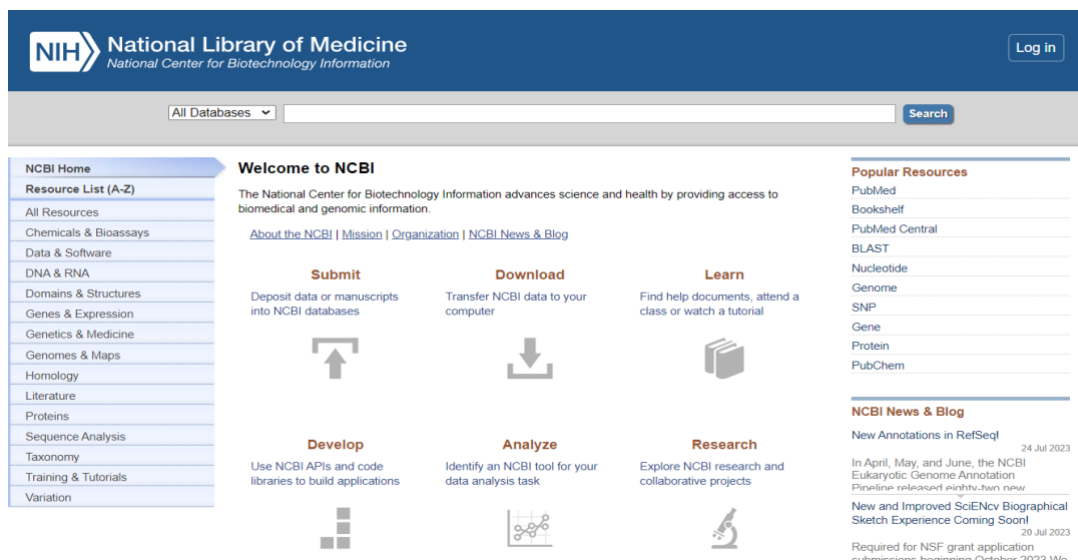
- ADN comercial
- Agarosa
- Agua bidestilada
- Azul de bromurofenol
- Bromuro de etidio
- Biomarcador de peso molecular de 100pb BIONEER
- Solución de trabajo R-Primer
- Solución de trabajo F-Primer
- PCR Master Mix
- TAE 1X

Equipos

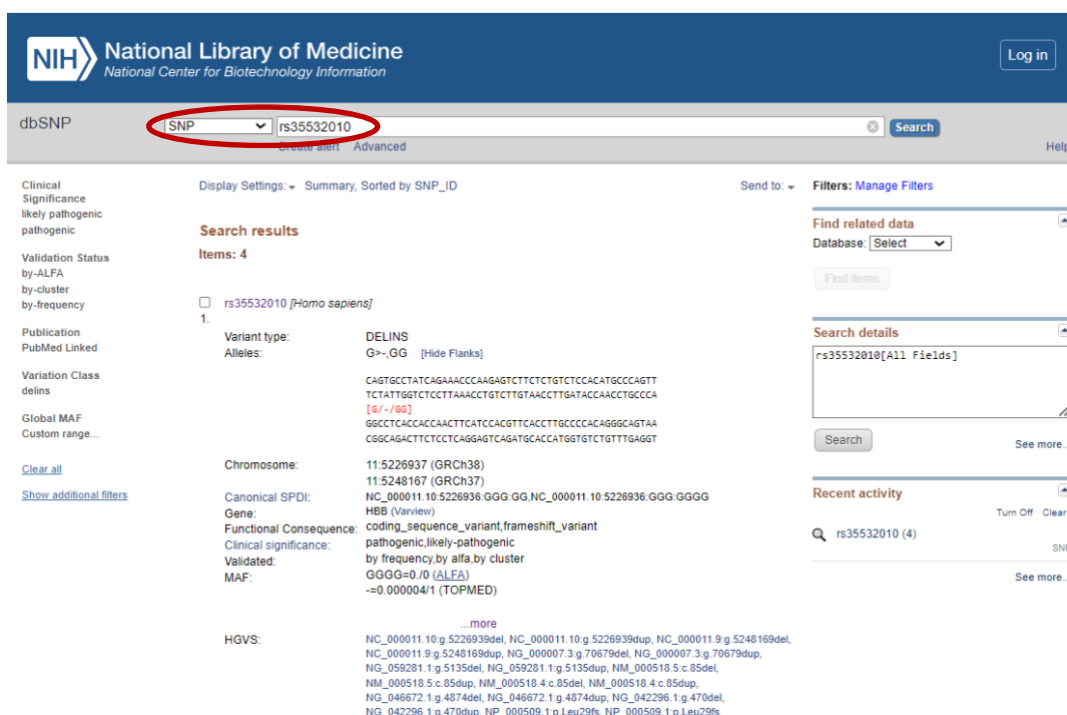
- Pipetas automáticas (marca Labnet)
- Fluorómetro Qubit (marca ThermoFisher Scientific, USA)
- Espectofotómetro Genova NANO (marca Jenway 83070-02, USA)
- Agitador Vórtex (marca ThermoFisher Scientific, USA)
- Balanza analítica de precisión (marca Sartorius modelo ED224S Extend, Alemania)
- Microondas
- Centrifuga (marca Neuation)
- Cámara de electroforesis (marca Enduro, USA)
- Termociclador PCR Punto final (marca Applied Biosystems, USA)
- Lámpara UV

Anexo B: Selección del primer/cebador

- a) La elección del primer cebador para la amplificación polimorfismo rs35532010 se realiza en la página *National Center for Biotechnology Medicine*.



- b) En la parte superior izquierda, cambiar “All Databases” y seleccionar la opción “SNP” (*Singer Nucleotide Polymorphisms*).
- c) Escribir el nombre del polimorfismo “rs35532010” para empezar la búsqueda.



d) Ingresar en el primer resultado de búsquedas y seleccionar la opción “Flanks”.

rs35532010

Current Build 156
Released September 21, 2022

Organism	Homo sapiens	Clinical Significance	Reported in ClinVar
Position	chr11:5226937-5226939 (GRCh38.p14)	Gene : Consequence	HBB : Frameshift Variant
Alleles	delG / dupG	Publications	6 citations 34
Variation Type	Indel Insertion and Deletion	Genomic View	See rs on genome
Frequency	dupG=0.000004 (1/264690, TOPMED) dupG=0.00000 (0/14050, ALFA)		

Frequency

Variant Details

Clinical Significance

HGVS

Submissions

History

Publications

Flanks

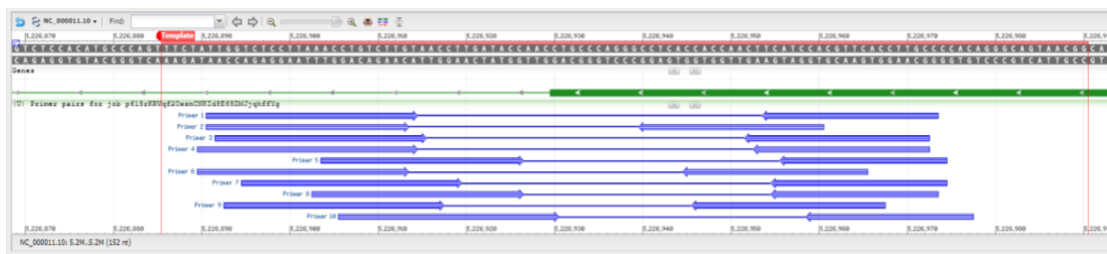
e) En este apartado se puede visualizar las regiones flanqueares donde se encuentra el polimorfismo rs35532010, realizar un “Zoom out” para establecer un segmento de entre 150 a 200pb al cual se va a unir el primer.

f) Seleccionar la opción “Tools”, luego “BLAST and Primer Search” y por último “Primer BLAST” para que imprima el rango visualizado.

g) Se observarán los parámetros de los primers para que sean autocomplementarios. Seleccionar la opción “Get Primers”.

The screenshot shows the Primer3 web interface. The 'PCR Template' section has 'NC_000011.10' entered. The 'Primer Parameters' section shows a PCR product size of 114 bp and a primer melting temperature (T_m) of 57.0. The 'Exon/intron selection' section shows 'No preference' for exon junction span. The 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section has 'Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template' checked, and 'Search mode' set to 'Automatic'. The 'Database' is 'Refseq mRNA'. The 'Organism' is 'Homo sapiens'. The 'Primer specificity stringency' section shows 'Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end'. The 'Max target amplicon size' is 4000. The 'Get Primers' button is visible at the bottom.

h) Se realiza un análisis visual de cada pareja potencial de primers y se selecciona aquellos que se encuentren lo más centrado al polimorfismo rs35532010, en este caso la pareja 2 y 5.



i) Se verifica que cumplan con cada uno de los parámetros de especificidad: ubicación de la variante dentro del amplicón, bajo porcentaje de citosinas-guaninas, baja autocomplementariedad de los cebadores y temperaturas de alineación similares.

Primer pair 2

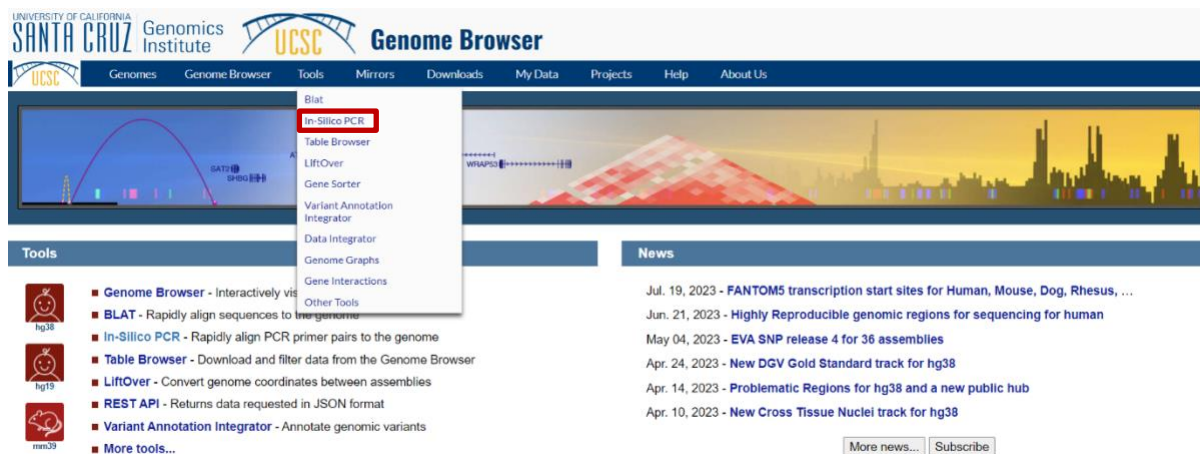
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	T _m	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAACCTTGATACCAACCTGCC	Plus	22	5226914	5226935	60.03	50.00	6.00	0.00
Reverse primer	GCAACCTCAACAGACACCA	Minus	20	5227040	5227021	58.61	50.00	2.00	0.00
Product length	127								

Primer pair 5

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	T _m	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACATGCCAGTTTCTATTGG	Plus	22	5226873	5226894	59.57	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	CATGGTCATCTGACTCCTG	Minus	20	5227022	5227003	58.34	55.00	4.00	2.00
Product length	150								

Anexo C: Análisis in silico de los primers/cebadores

- a) Una vez seleccionado la pareja de primers ideal, realizar un análisis in silico en la página *UCSC Genome Browser Home*.
- b) Seleccionar la opción “Tools” y luego “In-Silico PCR”.



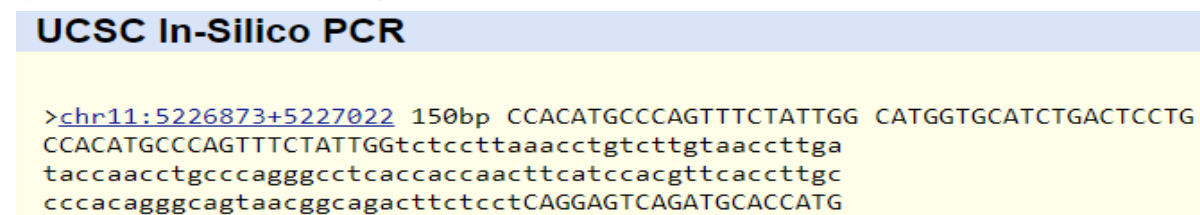
- c) Copiar la secuencia de cada primer reverse y forward y elegir la opción “submit” para empezar el análisis computacional

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: Append to existing PCR result:

- d) Observar que la pareja de primers no se unan a otro segmento del genoma humano
- e) Mandar a sintetizar los primers/cebadores al fabricante autorizado.



Anexo D: Cuantificación de ADN por Fluorometría

- a) Preparar dos tubos Eppendorf para los dos tipos de estándares (bajo y alto) y un tubo para cada una de las muestras que se dispongan.
- b) La preparación del reactivo de trabajo de Qubit consiste en la dilución del buffer con el reactivo en una proporción 1:200. Se requiere 200 μ l de reactivo de trabajo para cada tubo de muestra y estándares.
- c) La preparación de los especímenes de muestras y estándares se debe realizar bajo una campana de flujo laminar.
- d) Para las soluciones estándares, colocar 190 μ l de reactivo de trabajo y 10 μ l de cada uno de los dos estándares, en los tubos correspondientes.
- e) Por otro lado, para la preparación de las soluciones muestras, agregar 195 μ l de reactivo de trabajo y 5 μ l de cada una de las muestras.
- f) Cada uno de los tubos Eppendorf se homogenizan con ayuda del Vórtex por 2 a 3 segundos y se incuban por un tiempo de dos minutos a temperatura ambiente.
- g) Configurar el Fluorómetro Qubit para la cuantificación de ADN de doble cadena (dsDNA) de alta sensibilidad.
- h) En el Qubit, leer el estándar bajo y luego el estándar alto, estableciendo límites para la obtención de la gráfica.
- i) Posterior a ello, cuantificar del ADN de cada una de las muestras.
- j) Por último, cuantificar nuevamente las muestras para comprobar la concordancia entre ambas lecturas obtenidas.

Anexo E: Cuantificación de ADN por Espectrofotometría

- a) Previo a la cuantificación encerrar el espectrofotómetro “Genova NANO” mediante el uso de un blanco de agua purificada, para corregir posibles errores derivados de la turbidez o el color. Para ello se dispensa 2µl del blanco en la superficie del lector.
- b) Entre lecturas, realizar una limpieza simple y rápida del lector con un paño, para eliminar cualquier rastro de muestra y agilizar el trabajo.
- c) Una vez limpio, colocar 2µl de cada una de las muestras en la superficie del lector.
- d) Leer la concentración de ADN de cada una de las muestras.
- e) Al finalizar la medición de las muestras, realizar lecturas aleatorias para comprobar la concordancia entre estas.

Anexo F: Preparación de las “Soluciones de trabajo”

- a) Para ello, se debe determinar el volumen a utilizar de cada Primer Stock, el cual se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Donde:

V_1 : Volumen a tomar de la muestra

C_1 : Concentración inicial

V_2 : Volumen final

C_2 : Concentración deseada

- b) R-Primer 5:

Cálculo de la concentración del primer en 1 μ l de agua:

$$\begin{array}{cc} 500\mu\text{l} & 48,3 \text{ nmol} \\ 1\mu\text{l} & x = ? \end{array}$$

$$x = \frac{1\mu\text{l} \cdot 48,3\text{nmol}}{500\mu\text{l}} = 0,0966\text{nmol} \cdot 1000 = \mathbf{96,6\rho\text{mol}}$$

Cálculo del volumen a tomar del primer:

$$V_1 = \frac{100\mu\text{l} \cdot 10\rho\text{mol}}{96,6\rho\text{mol}} = \mathbf{10,4\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{89,6\mu\text{l}} \text{ de } H_2O$$

- c) F-Primer 5:

Cálculo de la concentración del primer en 1 μ l de agua:

$$\begin{array}{cc} 500\mu\text{l} & 51,9 \text{ nmol} \\ 1\mu\text{l} & x = ? \end{array}$$

$$x = \frac{1\mu\text{l} \cdot 51,9\text{nmol}}{500\mu\text{l}} = 0,1038\text{nmol} \cdot 1000 = \mathbf{103,8\rho\text{mol}}$$

Cálculo del volumen a tomar del primer:

$$V_1 = \frac{100\mu\text{l} \cdot 10\rho\text{mol}}{96,6\rho\text{mol}} = \mathbf{10,4\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{89,6\mu\text{l}} \text{ de } H_2O$$

Anexo G: Electroforesis en gel de agarosa al 2%

- a) Preparar el gel de agarosa para que sea disuelta en 90mL de TAE 1X:

100ml	2,0g
90ml	x = 1,8g de agarosa

- b) Pesar 1,8g de agarosa en la balanza analítica y colocarlos en un matraz de Erlenmeyer.
- c) Agregar 90ml de TAE 1X.
- d) Calentar la mezcla hasta su completa disolución.
- e) Dejar reposar la solución hasta que la temperatura de esta pueda ser tolerada por la palma de la mano.
- f) Una vez fría, agregar 5µl del colorante bromuro de etidio.
- g) La solución es trasvasada al molde y se coloca el peine para la formación de los pocillos una vez se haya solidificado.
- h) Retirar el peine.
- i) En 14 tubos eppendorf colocar 8µl del buffer de carga o bromuro-fenol.
- j) En 12 de los 14 tubos eppendorf agregar 10µl de los productos post-PCR.
- k) En los últimos dos tubos agregar 5µl del biomarcador de peso molecular de 100pb (BIONEER)
- l) Llenar la cámara de electroforesis con el TAE 1X hasta que cubra el gel de agarosa.
- m) Con ayuda de una pipeta agregar estas soluciones en cada uno de los pocillos del gel de agarosa.
- n) Tapar y conectar la cámara para empezar a correr la electroforesis entre 90 a 105 voltios por una hora.
- o) Una vez pasada la hora, colocar el gel bajo la lámpara UV y observar la presencia o ausencia de las bandas de amplificación del ADN.

Anexo H: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

- a) Preparar el gel de agarosa para que sea disuelta en 90mL de TAE 1X:

100ml	1,5g
90ml	x = 1,35g de agarosa

- b) Pesar 1,35g de agarosa en la balanza analítica y colocarlos en un matraz de Erlenmeyer.
- c) Agregar 90ml de TAE 1X.
- d) Calentar la mezcla hasta su completa disolución.
- e) Dejar reposar la solución hasta que la temperatura de esta pueda ser tolerada por la palma de la mano.
- f) Una vez fría, agregar 5µl del colorante bromuro de etidio.
- g) La solución es trasvasada al molde y se coloca el peine para la formación de los pocillos una vez se haya solidificado.
- h) Retirar el peine.
- i) En 14 tubos eppendorf colocar 8µl del buffer de carga o bromuro-fenol.
- j) En 12 de los 14 tubos eppendorf agregar 10µl de los productos post-PCR.
- k) En los últimos dos tubos agregar 5µl del biomarcador de peso molecular de 100pb (BIONEER)
- l) Llenar la cámara de electroforesis con el TAE 1X hasta que cubra el gel de agarosa.
- m) Con ayuda de una pipeta agregar estas soluciones en cada uno de los pocillos del gel de agarosa.
- n) Tapar y conectar la cámara para empezar a correr la electroforesis entre 90 a 105 voltios por una hora.
- o) Una vez pasada la hora, colocar el gel bajo la lámpara UV y observar la presencia o ausencia de las bandas de amplificación del ADN.

Anexo I: Ecuaciones y cálculos

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Ecuación 1: Cálculo de volúmenes y concentraciones de las diluciones

Donde:

V_1 : Volumen a tomar de la muestra

C_1 : Concentración inicial

V_2 : Volumen final

C_2 : Concentración deseada

Cálculo de volúmenes y concentraciones de las diluciones

- Muestra a:

$$V_1 = \frac{80 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 50\mu\text{l}}{81,65 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \mathbf{49\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{1\mu\text{l}} \text{ de H}_2\text{O}$$

- Muestra b:

$$V_1 = \frac{80 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 50\mu\text{l}}{185 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \mathbf{22\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{28\mu\text{l}} \text{ de H}_2\text{O}$$

- Muestra c:

$$V_1 = \frac{80 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 50\mu\text{l}}{87,56 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \mathbf{46\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{4\mu\text{l}} \text{ de H}_2\text{O}$$

- Muestra d:

$$V_1 = \frac{80 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 50\mu\text{l}}{82,12 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \mathbf{49\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{1\mu\text{l}} \text{ de H}_2\text{O}$$

- Muestra e:

$$V_1 = \frac{80 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 50\mu\text{l}}{103,1 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \mathbf{39\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{11\mu\text{l}} \text{ de H}_2\text{O}$$

Cálculo de aumento de concentración de muestra b para mejorar resolución de bandas

- Muestra b:

$$V_1 = \frac{100 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 20\mu\text{l}}{185 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \mathbf{11\mu\text{l}} \text{ en } \mathbf{9\mu\text{l}} \text{ de H}_2\text{O}$$