

PEDECIBA
Area Biología
Sub-área Genética

Tesis de Doctorado

Magister Julio da Luz

**Análisis molecular del cluster de genes de la α y β -
globinas en la población uruguaya. Hemoglobinopatías,
desequilibrio de ligamiento e historia recombinacional.**

Orientadora: Dra. María de Fatima Sonati

Co-orientadora: Dra. Mónica Sans

Tribunal

Presidente: Dr. Gustavo Folle
Vocales: Dra. Adriana Mimbacas
Dr. Alfonso Cayota

7 de junio de 2013

Agradecimientos

- En primer lugar a todas las personas que formaron parte de la muestra estudiada, ya que sin ellos hubiera sido imposible realizar esta tesis.
- Al personal de laboratorio del Centro Hospitalario Pereira Rosell (CHPR), del Servicio Hemato-oncológico del CHPR y del Laboratorio del Hospital de Tacuarembó.
- A Carlitos y Nico con quienes compartimos y “perdimos” horas en busca de la “bocona” y a todos los compañeros del fútbol que mostraron su persistencia y dedicación.
- A todo el comité de camping y recreación del Departamento: Pablo Smircich, Pablo López, Ramiro, Victor, Analía, la Checha, etc.
- A todos los compañeros del Departamento de Genética, incluido la isla y citogenética.
- A Leda, Pepe, Bernardo y Faride que me apoyaron siempre y un agradecimiento especial a María Mirta.
- A los compañeros que compartimos horas en la “oficina” de Genética: Lucía, Ileana, Amalia, Santiago Chavez, “el trovador” y muchos más que pasaron por ese inolvidable lugar.
- A Ana que tuvo el coraje de confiar en mí.
- A la Dra. Mónica Sans, mi orientadora y a todo el apoyo recibido.
- A la Dra. Fatima Sonati, mi orientadora quien me recibió en su Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de Universidad Estadual de Campinas y a todos los integrantes del Laboratorio que me recibieron como un amigo.
- A mi familia “grande” que siempre me ha apoyado.

- A mis amigos, que por suerte son varios, y a quienes los aburri muchas veces con las hemoglobinas y demás.
- A Sonia, José y Rodney que me acompañan en esta aventura en el norte.
- Por último y más importante, a quienes me dan fuerzas todos los días:
Carla, Cristina y Micaela.

Resumen	9
Capítulo 1. Introducción general	12
1.1 Introducción	13
1.1.1 Organización y estructura de los genes de las globinas.	13
1.1.2 Mutaciones de los genes de las hemoglobinas.	15
1.1.2.1 Hemoglobina S	16
1.1.2.2 Alfa talasemias	17
1.1.2.3 Beta talasemias	20
1.1.3 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina	21
1.1.4 Población uruguaya	21
1.1.5 Objetivo general	21
1.1.6 Organización de la tesis	22
1.2 Bibliografía	24
Capítulo 2. Frecuencia y espectro de mutaciones de hemoglobinopatías en una población pediátrica uruguaya. Da Luz, J et al. Genetics and Molecular Biology Manuscript ID GMB-2012-0322, aceptado febrero 2013	26
Capítulo 3. Hemoglobina Southampton [β106(G8)Leu\rightarrowPRO, CTG\rightarrowCCG] en una mujer uruguaya. Da Luz et al., Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia ID: 2055, aceptado febrero 2013	49
Capítulo 4. Caracterización molecular de las mutaciones de β-talasemias y de los haplotipos de la β-globina en la población uruguaya.	58
4.1 Introducción	59
4.1.1 Haplotipos del cluster de genes de la β -globina	64
4.1.2 Características genéticas de la población uruguaya	65
4.1.3 Objetivo general	67

4.1.3.1	Objetivos específicos	67
4.2	Muestra y Método	68
4.2.1	Muestra	68
4.2.2	Métodos	68
4.2.2.1	Obtención de la muestra de sangre y extracción de ADN	68
4.2.2.2	Determinación de las mutaciones de β -talasemia	68
4.2.2.3	Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.	69
4.2.2.4	Análisis genético y estadístico	70
4.2.2.4.1	Cálculo de frecuencias alélicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	70
4.2.2.4.2	Determinación de los haplotipos	70
4.2.2.4.3	Variación intra-poblacional, inter-poblacional y comparación con otras poblaciones	71
4.3	Resultados	73
4.3.1	Determinación de las mutaciones de β -talasemia	73
4.3.2	Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.	77
4.3.3	Desequilibrio de ligamiento	79
4.3.4	Haplotipos	79
4.3.4.1	Haplotipos ligados a mutaciones de β -talasemias.	81
4.3.4.2	Comparación con otras poblaciones.	83
4.3.4.3	Haplotipos ligados a cromosomas sin mutación.	86
4.4	Discusión	90
4.4.1	Mutaciones de β -talasemia	90
4.4.1.1	Distancias genéticas y comparación con otras poblaciones	90
4.4.2	Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.	94
4.4.3	Equilibrio de ligamiento	94

4.4.4 Haplotipos _____	95
4.4.4.1 Comparación entre los métodos de construcción de los haplotipos _____	96
4.4.4.2 Haplotipos ligados a cromosomas con mutaciones de β -talasemia _____	97
4.4.4.3 Distancias genéticas _____	99
4.4.4.4 Haplotipos ligados a cromosomas sin mutaciones de β -talasemia _____	100
4.4.4.5 Distancias genéticas _____	101
4.5 Conclusiones _____	102
4.6 Perspectivas _____	102
4.7 Bibliografía _____	104
<i>Apéndice Capítulo 4. A new β^0 thalassemia frameshift mutation [Codon 48 (-T); CTG (Leu) \rightarrowCG] in a Uruguayan family. Da Luz et al., Int J Lab Hematol 2012 35: (1) 111-114 _____</i>	112
<i>Capítulo 5. Haplotipos de la β-globina asociados a la HbS _____</i>	122
5.1 Introducción _____	123
5.1.1 Mutaciones de los genes de las hemoglobinas. _____	123
5.1.2 Hemoglobina S _____	124
5.1.2.1 Poblaciones americanas _____	125
5.1.3 Haplotipos del cluster de genes de la β -globina _____	127
5.1.3.1 Haplotipos asociados a la HbS _____	129
5.1.3.1.1 Región R/T _____	130
5.1.3.1.2 Motivo (AT) \times Ny(AT) z en el HS2 LCR _____	131
5.1.3.1.3 Región AT \times Ty _____	132
5.1.3.2 Haplotipos ligados a la HbS en la población uruguaya _____	133
5.1.4 Objetivo general _____	135
5.1.4.1 Objetivo específicos _____	135

5.2 Muestra y Métodos	136
5.2.1 Muestra	136
5.2.2 Métodos	136
5.2.2.1 Obtención de la muestra de sangre y extracción de ADN	136
5.2.2.2 Confirmación molecular de las mutación de HbS	136
5.2.2.3 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.	138
5.2.2.3.1 Haplotipos 5' y 3'	138
5.2.2.3.2 Región R/T	138
5.2.2.3.3 HS2LCR	140
5.2.2.3.4 Región ATxTy	141
5.2.2.4 Análisis genético y estadístico	142
5.2.2.4.1 Cálculo de frecuencias alélicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	142
5.2.2.4.2 Determinación de los haplotipos	143
5.2.2.4.3 Análisis de secuencias	143
5.2.2.4.4 Variación intra-poblacional, inter-poblacional y comparación con otras poblaciones	143
5.3 Resultados	145
5.3.2 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.	145
5.3.3 Equilibrio de ligamiento	146
5.3.3 Haplotipos 5' y 3'	146
5.3.4 Región R/T	148
5.3.5 HS2LCR	149
5.3.6 Región ATxTy	150
5.3.7 Haplotipos atípicos	151
5.3.8 Comparación con otras poblaciones	152

5.3.8.1 Haplotipos asociados a la HbS _____	152
5.3.8.2 Haplotipos asociados a cromosomas sin la mutación de la HbS _____	157
5.4 Discusión _____	161
5.4.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg _____	161
5.4.2 Equilibrio de ligamiento _____	162
5.4.3 Haplotipos 5' y 3' _____	162
5.4.4 Región R/T _____	164
5.4.4 HS2 LCR _____	165
5.4.4 Región ATxTy _____	167
5.4.4 Haplotipos atípicos _____	167
5.4.4 Comparación con otras poblaciones _____	170
5.5 Conclusiones _____	173
5.6 Bibliografía _____	174
<i>Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas _____</i>	186
<i>Anexo 1. Cebadores de y condiciones de PCR utilizadas _____</i>	191
<i>Región HS2 LCR _____</i>	193
<i>Región ATxTy _____</i>	193
<i>Anexo 2. Secuencias de la región R/T _____</i>	195
<i>Anexo 3. Secuencias de la región AT_xT_y _____</i>	200
<i>Anexo 4. Beta-Globin Gene Cluster Haplotypes in Afro-Uruguayans from Two Geographical Regions (South and North). Da Luz et al., Am. J. Hum. Biol 2010 22:124-128 _____</i>	203

Resumen

Los genes de las globinas han sido ampliamente estudiados desde mediados del siglo XX debido a la gran variedad de mutaciones en sus genes, que son causantes de las enfermedades genéticas denominadas colectivamente como hemoglobinopatías. La mayoría de las mutaciones que producen hemoglobinopatías son raras, con la excepción de algunas variantes estructurales como las hemoglobinas S (Hb S), C (Hb C), D (Hb D), y E (Hb E), y las alfa y beta talasemias. Estas hemoglobinopatías alcanzan elevadas frecuencias en las zonas tropicales y subtropicales de Africa –donde las alfa talasemias alcanzan al 40% y es frecuente la Hb S - y Asia y en la región del mar Mediterráneo –donde predominan las beta talasemias - y su distribución se solapa con las áreas de paludismo endémico. Su elevada frecuencia se debe a que los individuos heterocigotas para estas mutaciones poseen ventaja selectiva sobre los homocigotos normales que otorga mayor resistencia a la infección por el *Plasmodium falciparum*, el agente productor de la malaria. Las poblaciones americanas, puesto que recibieron pobladores tanto de Africa como del Mediterráneo, presentan estas mutaciones, independientemente de la existencia de malaria. Es el caso de la población uruguaya, formada por el aporte mayoritario de poblaciones europeas del Mediterráneo, y en menor medida por poblaciones africanas y amerindias.

En esta tesis determinamos la frecuencia de mutaciones de hemoglobinopatías en nuestra población así como el espectro de mutaciones observadas. También analizamos los polimorfismos del cluster de genes de la β -globina para investigar las relaciones entre nuestra población y otras poblaciones así como el origen de estas mutaciones en el Uruguay.

En el presente estudio se determinó por primera vez en el Uruguay la incidencia de hemoglobinopatías en una muestra pediátrica de 397 individuos que se atienden en el Centro Hospitalario Pereira Rosell (CHPR). Se detectó que 0,76% eran portadores de HbS y 0,25% de beta talasemia; respecto a las alfa

talasemias observamos diferencias en las frecuencias de acuerdo a la ancestría: 1,2% y 6,5% en individuos de ancestría europea y africana respectivamente. En los individuos que presentaban microcitosis la frecuencia de alfa talasemia aumenta hasta 16,4% y si además presentaban ancestría africana la frecuencia sube hasta el 29,6%. También pudimos identificar una mutación rara que produce una hemoglobina inestable denominada Hb Southampton en una paciente adulta la cual estaba sin diagnóstico desde la niñez.

Además se determinó el espectro de mutaciones de beta talasemias en pacientes con diagnóstico bioquímico-clínico de estas enfermedades y se analizaron los polimorfismos en el cluster de genes de la β -globina en individuos con mutaciones de beta talasemia y HbS. El perfil de mutaciones observado muestra un origen claramente europeo mediterráneo determinado por la elevada frecuencia de las mutaciones Codón 39 (C→T) e IVS-I-110 (G→A) y similar al observado en Argentina, sur y sudeste del Brasil, regiones limítrofes del Uruguay, reflejando un aporte poblacional similar. Aunque el origen mediterráneo, particularmente de España e Italia está también apoyado por las distancias genéticas determinadas a partir de las mutaciones y de los haplotipos construidos con los polimorfismos analizados, no es posible descartar el aporte de otras poblaciones europeas como Portugal. Sin embargo, factores microevolutivos pueden haber moldeado la distribución de estas mutaciones y sus haplotipos en nuestra población como lo sugieren la baja frecuencia de las mutaciones IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-1 (G→A) frecuentes en España, Italia, Portugal, Argentina y Brasil así como la identificación de una nueva mutación de beta talasemia en nuestra población [β 48 (-T)], aunque posiblemente originaria de Italia.

El estudio de los haplotipos asociados a la HbS mostró una predominancia del haplotipo Bantú (64,7%), seguido por el Benín (23,5%) y en menor medida por haplotipos atípicos (11,8%). Estos resultados indican que el origen de los cromosomas con la mutación de la HbS es principalmente de la región Centro Sur de África donde el haplotipo Bantú predomina, seguido por

la región Centro Oeste de África donde predomina el haplotipo Benín. Esta situación a su vez fue confirmada por las distancias genéticas de los haplotipos asociados y no asociados a la mutación de la HbS. El análisis de polimorfismos adicionales mostró que el 50% de los cromosomas con haplotipos de tipo Benín en realidad presentaban un haplotipo atípico, llevando esta frecuencia al 23,5% similar a lo observado en un trabajo previo de nuestro grupo. Estos haplotipos atípicos posiblemente tengan un origen en las poblaciones ancestrales y no se hayan generado luego de ser introducidos en América y Uruguay ya que son observados en otras poblaciones africanas y americanas. Sin embargo, la elevada frecuencia de haplotipos atípicos no es observada en otras poblaciones indicando que procesos genéticos, históricos y/o demográficos ocurridos en nuestra población han permitido que estos haplotipos atípicos alcancen estas frecuencias.

En suma, el perfil de mutaciones de hemoglobinopatías observadas y sus haplotipos asociados es compatible con las poblaciones que han contribuido a la conformación de nuestra población, pero factores microevolutivos han moldeado la frecuencia y distribución de mutaciones y sus haplotipos. También hemos mostrado que la frecuencia de hemoglobinopatías en nuestra población no es despreciable y que es necesario que comiencen a ser consideradas como un problema de salud.

Capítulo 1. Introducción general

1.1 Introducción

La hemoglobina humana es un tetrámero de 64,5 kDa constituida por dos cadenas de α -globina y dos cadenas de β -globina. Cada una de las cadenas polipeptídicas se encuentra unida por enlaces covalentes a un grupo heme. Su fórmula general en humanos es X_2Y_2 , donde X se refiere a las cadenas de α -globinas e Y a las cadenas de β -globinas (Steinberg et al., 2001). A lo largo del desarrollo de un individuo desde el feto al adulto se expresan distintas hemoglobinas formados por cadenas distintas de α y β -globinas.

1.1.1 Organización y estructura de los genes de las globinas.

Los genes de las globinas humanas que forman la hemoglobina se encuentran en dos *clusters* separados de familias multigénicas relacionadas: el *cluster* de genes de las α -globinas localizado en el cromosoma 16p13.3 y el *cluster* de genes de las β -globinas localizado en el cromosoma 11p15.5. Los genes en los *clusters* se encuentran en la misma orientación transcripcional y localizados en el orden de su expresión durante el desarrollo ontogénico. Los genes del *cluster* de las α -globinas se encuentran en una región de aproximadamente 30Kb y contiene siete locus ordenados de la siguiente manera de 5' a 3': HBZ (ζ -globina fetal), HBZP1 (pseudogen zeta $\Psi\zeta$ -globin), HBM (μ -globina), HBAP1 (pseudogen alpha 1 $\Psi\alpha_1$), HBA2 (α_2 -globina: fetal y del adulto), HBA1 (α_1 -globina: fetal y del adulto) y HBQ (θ -globina). Los genes del *cluster* de las β -globinas se encuentran en una región de aproximadamente 45Kb y contiene seis locus ordenados de 5' a 3' de las siguiente manera: HBE (ϵ -globina embrionaria), HBG1 ($^G\gamma$ -globina fetal), HBG2 ($^A\gamma$ -globina fetal), HBBP1 (pseudogen beta $\Psi\beta$), HBD (δ -globina adulta), y HBB (β -globina adulta). En la Figura 1 se muestra un esquema del *cluster* de los genes de las α y β -globinas. La nomenclatura usada es basada en *HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute* (HGNC).

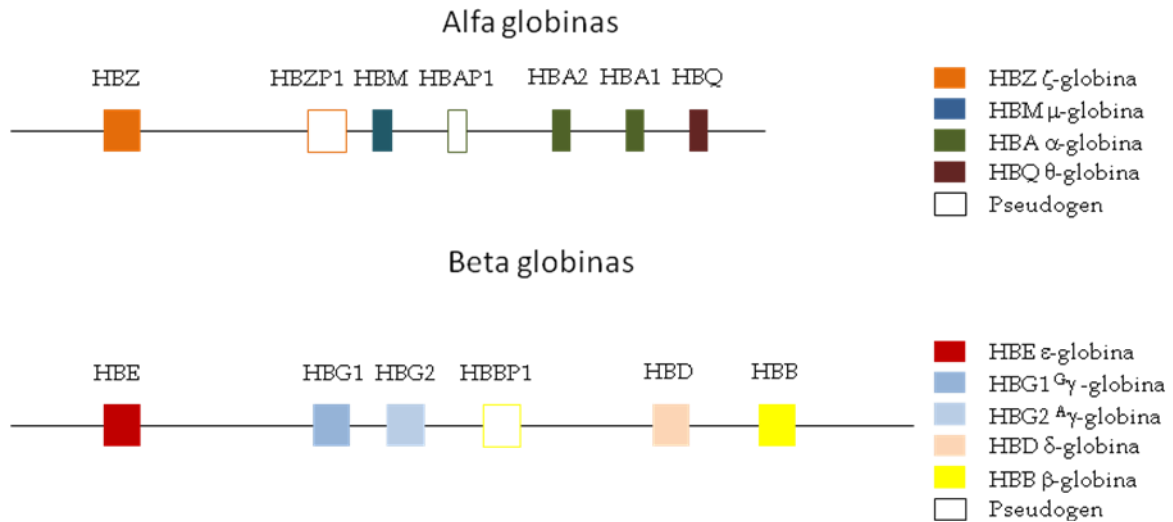


Figura 1. Representación física de los *clusters* de genes de las α y β -globinas. Los rectángulos en blanco representan pseudogenes.

Las primeras globinas en expresarse son las globinas fetales ζ y ϵ las cuales forman la hemoglobina embrionaria Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$). A la quinta semana de gestación la fracción de globinas alfa es principalmente de la forma α permitiendo la formación de la otra hemoglobina embrionaria Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$). Aproximadamente a la sexta semana de gestación hay un cambio en la expresión de la ϵ a la γ globina la cual forma la hemoglobina embrionaria Portland-1 ($\zeta_2\gamma_2$) y las hemoglobinas fetales (HbF) ($\alpha_2^G\gamma_2$ y $\alpha_2^A\gamma_2$) (Peschle et al., 1985). Estas dos últimas hemoglobinas continúan presentes en el individuo hasta aproximadamente el segundo año de vida post-gestacional. Aunque la globina β comienza a expresarse temprano en el desarrollo embrionario, su expresión se mantiene a bajos niveles hasta las semanas 30-35 de gestación cuando llega a aproximadamente a ser un 10% del total de cadenas β del feto. Alcanza su máxima expresión aproximadamente al segundo año de vida y se mantiene durante toda la vida del individuo, permitiendo la formación de la hemoglobina principal del adulto ($\alpha_2\beta_2$) denominada A (HbA), la cual es aproximadamente 95 a 98% de la hemoglobina total. En el adulto también se encuentran bajos niveles de HbF (1 a 2%) y de HbA2 (1 a 3%), esta última con la fórmula, $\alpha_2\delta_2$. En algunos individuos las hemoglobinas F (HbF) y A2 (HbA2) se encuentran a niveles mayores que los normales, lo cual tiene implicancias en la

heterogeneidad clínica de algunas hemoglobinopatías, donde se ve afectado el gen de la globina β (Steinberg et al., 2001; Wheaterall y Clegg, 2001c) Además de las globinas mencionadas anteriormente, en el cluster alfa se encuentran las globinas μ y θ . Aunque la expresión de los ARNm de estas globinas se encuentra regulada, no se han detectado sus proteínas correspondientes ni hemoglobinas con sus cadenas polipeptídicas (Goh et al., 2005).

1.1.2 Mutaciones de los genes de las hemoglobinas.

Actualmente se han identificado y caracterizado más de 1500 mutaciones en los genes de las globinas, las cuales son responsables de las talasemias (α y β) y de las variantes estructurales de la hemoglobina. Las variantes estructurales de la hemoglobina representan más de tres cuartos partes de las mutaciones descritas, al momento 1161 variantes de acuerdo al Globin Gene Server (<http://globin.cse.psu.edu/>, actualización a febrero 2013) (Hardison et al., 2002).

La mayoría de las variantes estructurales de la hemoglobina son raras con las excepciones de hemoglobinas S (Hb S), C (Hb C), D (Hb D), y E (Hb E). Estas variantes frecuentes se encuentran distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales de Africa y Asia y en la región del mar Mediterráneo: por ejemplo, las mutaciones que producen Hb S y C son originarias de Africa, Hb D (Punjab) de la India y la Hb E del Sudeste asiático. Esta distribución se solapa con las áreas de paludismo endémico. La elevada frecuencia de estas variantes se debe a que los individuos heterocigotas para estas mutaciones poseen una ventaja selectiva sobre los homocigotos normales y con la mutación de la enfermedad, debido a que presentan mayor resistencia a la infección por el *Plasmodium falciparum*, el agente productor de la malaria (Allison, 1954; Agarwal et al., 2000; Piel et al., 2010).

En total hay descritas 576 variantes en el gen HBB, 428 variantes en los genes HBA1 y HBA2 y 165 en los genes HBG1, HBG2 y HBD de acuerdo al Globin Gene Server (<http://globin.cse.psu.edu/> actualización a febrero 2013)

(Hardison et al., 2002). La mayoría de estas variantes no tienen efecto clínico en los individuos que la portan y son generalmente causadas por la sustitución de un único aminoácido.

Aunque la mayoría de estas variantes no tienen efecto clínico, algunas como las hemoglobinas inestables, las hemoglobinas con elevada afinidad por el oxígeno y las metahemoglobinas sí lo tienen. Estas variantes raras en general presentan un modo de herencia autosómico dominante y surgen por mutación *de novo*. Las más frecuentes dentro de este grupo son las hemoglobinas inestables de las cuales actualmente hay reportadas 143 variantes principalmente debido a mutaciones en el gen HBB (Steinberg et al., 2001; Hardison et al., 2002)

1.1.2.1 Hemoglobina S

La hemoglobina S (Hb S) está formada por dos cadenas α normales y dos cadenas β mutadas ($\alpha_2\beta S_2$). La variante βS posee valina en la sexta posición de la cadena aminoacídica, en lugar del ácido glutámico que se encuentra en las cadenas normales (β) que forman la hemoglobina A (HbA) del adulto. El cambio de ácido glutámico a valina se debe a una transversión de A a T en el codón 6 (GAG \rightarrow GTG). Los individuos homocigotas para el alelo βS del gen de la β -globina desarrollan la enfermedad denominada anemia falciforme o anemia drepanocítica cuyas características serán detalladas en el capítulo 5. (Steinberg et al., 2001) Además de los homocigotos para el alelo βS , los heterocigotos compuestos para este alelo y el alelo generador de la hemoglobina C ($\beta S/\beta C$) o con un alelo generador de talasemia β (HbS/ β^{tal}) generan un fenotipo de anemia falciforme aunque con menor gravedad clínica (Nagel et al., 2003). Los individuos heterocigotos para el alelo βS son asintomáticos y presentan aproximadamente 60% de HbA y 40% de HbS; salvo condiciones severas de hipoxia (Sears, 1978).

La hemoglobina S se encuentra principalmente en poblaciones de Africa ecuatorial donde la frecuencia de portadores en algunas poblaciones es de más del 30%. También se encuentra en algunas regiones del Medio Oriente y en la India aunque a menores frecuencias (Allison, 1954; Kulozik et al., 1986; Piel et al., 2010).

1.1.2.2 Alfa talasemias

Las alfa-talasemias son un grupo de hemoglobinopatías caracterizadas principalmente por alteraciones en los genes HBA2 y/o HBA1 que como mencionamos anteriormente resultan en la síntesis nula o disminuída de las cadenas de α -globinas y probablemente sean la alteración monogénica mas frecuente en el mundo (Wheaterall y Clegg, 2001a). La delección o inactivación por mutaciones de los dos genes alfa de un cromosoma produce α^0 -talasemia, debido a que no existe síntesis de cadenas de alfa globinas de ese cromosoma, siendo que el heterocigota se representa $--/\alpha\alpha$ y el homocigoto, $--/--$. Cuando la delección se da en solo un gen de un cromosoma, se dice que es una α^+ -talasemia debido a que existe una síntesis disminuida de esa cadena, y en este caso el genotipo del heterocigota se representa $-\alpha/\alpha\alpha$ y el del homocigota $-\alpha/-\alpha$. En suma α^0 y α^+ describen el haplotipo de las alfa-globinas, o sea, el estado de los dos genes de alfa globinas ligados (Foglietta et al., 1996).

Las α^0 talasemias se encuentran principalmente en el sudeste asiático con una frecuencia de portadores que alcanza el 4% en Tailandia y en algunas regiones del sudeste de China. En la región mediterránea se observan esporádicamente observándose una frecuencia de portadores del 1% en Grecia. En esta última región las más importantes son la $-\alpha^{\text{MED}}$ y la $-\alpha^{20,5}$ y algunas otras restringidas a poblaciones particulares como la $-\alpha^{\text{SPAN}}$ y $-\alpha^{\text{CANT}}$ observadas solamente en la población española (Villegas et al., 1998)

Las α^+ talasemias delecionales más frecuentes se denominan $\alpha^{3,7}$ y $\alpha^{4,2}$ de acuerdo al tamaño del fragmento deletado en cada una de ellas. Los dos genes α surgieron por duplicación y presentan una elevada homología de secuencia.

Se observan tres regiones homólogas denominadas X2, Y2, Z2 para el gen HBA2 y X1, Y1, Z1 para el gen HBA1 separados por regiones no-homólogas denominadas I, II y III (Hess et al. 1984). Las deleciones de las talasemias $\alpha^{3,7}$ y $\alpha^{4,2}$ se producen por recombinación homóloga desigual entre estas regiones. La recombinación entre los bloques Z2 y Z1 dentro de los cuales se encuentran los genes HBA2 y HBA1 ubicados a una distancia de 3,7Kb producen cromosomas con un solo gen híbrido HBA2-HBA1 el cual es el determinante de la talasemia $\alpha^{3,7}$. El producto recíproco es un cromosoma que presenta tres genes alfa: HBA2, HBA1-HBA2 y HBA1 denominado $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$. Aunque sería esperable encontrar la misma frecuencia de cromosomas con uno o con tres genes alfa, la presencia de cromosomas con tres genes alfa es rara lo cual sugiere un efecto selectivo negativo contra los individuos con este reordenamiento (Lam y Jeffreys, 2006; 2007). La recombinación entre los segmentos homólogos X2 y X1 que están a 4,2Kb entre sí, producen cromosomas solamente con el gen HBA1 y la pérdida del gen HBA2, generando la talasemia $-\alpha^{4,2}$. También producen cromosomas con tres genes alfa ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$) los cuales también son observados esporádicamente. En la Figura 2 se representa el mecanismo molecular involucrado en la generación de estas talasemias.

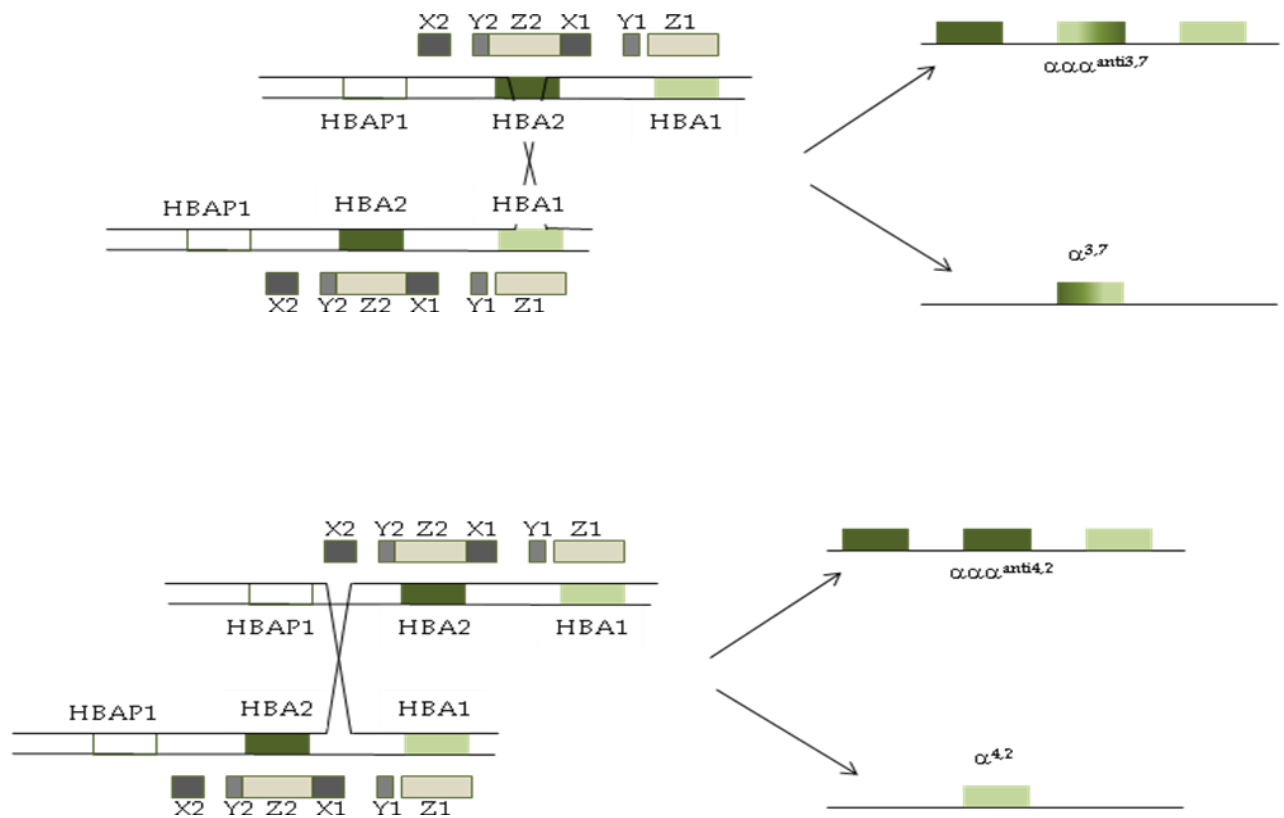


Figura 2. Mecanismo de generación de las talasemias $\alpha_{3,7}$ y $\alpha_{4,2}$. Los rectángulos indican los genes y pseudogenes alfa. Los rectángulos sobre los cromosomas indican las regiones de homología X, Y y Z. Las líneas cruzadas en los segmentos Z2-Z1 y X2-X1 muestran el sitio donde se genera la recombinación y las flechas de cada una de las figuras muestran los dos productos recíprocos de recombinación. Adaptado de Steinberg, 2001 (página 412).

Las α^+ talasemias, al igual que las variantes estructurales de la hemoglobina, se encuentran distribuidas en todas las regiones donde la malaria es o fue endémica, aunque alcanza las mayores frecuencias en África y en algunas regiones de Asia donde varían entre el 5% y el 40%. En Europa, en la región mediterránea la frecuencia de portadores varía de 2% en España hasta el 14% en Chipre con valores intermedios en Italia con una frecuencia global de 4,1% alcanzando el 12,6% en Cerdeña (Steinberg et al., 2001; Weatherall y Clegg, 2001a).

Aunque menos frecuentes, también las mutaciones puntuales o pequeñas deleciones son causas de alfa talasemias. Entre las más frecuentes en la región Mediterránea podemos destacar: a) la $\alpha^{\text{H}^{\text{PHI}}}$ talasemia, producida por la deleción de cinco nucleótidos (TGAGG) en el extremo 5' del intron 1 del gen α_1

y elimina un sitio de restricción para la enzima *Hpa*II, b) α^{NcoI} talasemia, que es producida por un cambio de nucleótido en el codón de iniciación del gen $\alpha 2$ (ATG-ACG) o del gen $\alpha 1$ (ATG-GTG), el cual en ambos casos elimina un sitio de restricción NcoI y c) un cambio de nucleótido en el sitio de poliadenilación del gen $\alpha 2$ (AATAAAA-AATAAG) el cual es relativamente frecuente en Arabia Saudita (Foglietta et al., 1996). En la Figura 3 se muestra un esquema de las principales alfa talasemias delecionales.

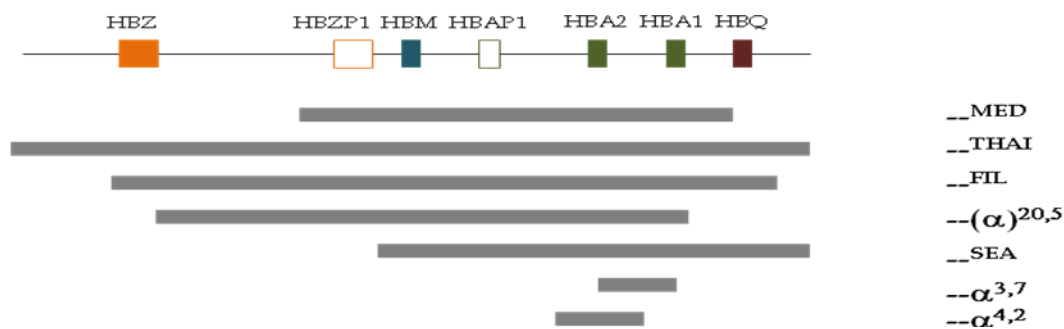


Figura 3. Esquema de la posición de las cinco deleciones más frecuentes que eliminan los dos genes alfa (α^0 talasemias) y de las dos deleciones más frecuentes que eliminan solo uno de ellos (α^+ talasemias) Adaptado de Steinbert et al., 2001.

1.1.2.3 Beta talasemias

Las β -talasemias son enfermedades genéticas caracterizadas por mutaciones que causan la ausencia (β^0) o reducción (β^+) en la síntesis de la o las cadenas de β -globina. Al igual que las alfa talasemias y muchas variantes estructurales de las hemoglobinas, las β -talasemias alcanzan frecuencias elevadas en las regiones donde la malaria es o fue endémica. Estas se encuentran principalmente en la región del Mediterráneo, norte de África, Medio Oriente, India, sur de China y en el sudeste de Asia. Aunque hay descritas más de 200 mutaciones de β -talasemias, solamente 20 de estas alcanzan elevadas frecuencia en algunas regiones. La frecuencia de portadores de estas mutaciones en las poblaciones europeas mediterráneas varía entre un

0,1% y 19% observándose las mayores frecuencias en las islas de Cerdeña y Chipre (15% a 19%) (Wheaterall y Clegg, 2001b)

1.1.3 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina

El análisis de los polimorfismos del cluster de genes de la β -globina ha sido ampliamente utilizado para estudiar la variabilidad genética y las relaciones entre poblaciones humanas desde un punto de vista evolutivo (Chen et al., 1990; Long et al., 1990). La variación en frecuencia de los haplotipos contruidos a partir de estos polimorfismos también ha permitido realizar estudios microevolutivos en poblaciones modernas (Castro De Guerra et al., 1997; Pante-De-Sousa et al., 1999; Mattevi et al., 2000; Vivenes De Lugo et al., 2003).

1.1.4 Población uruguaya

La población uruguaya presenta una conformación tri-híbrida con el aporte mayoritario de poblaciones de origen europeo mediterráneo (españoles, italianos, portugueses), y en menor medida de africanos y amerindios de acuerdo a datos históricos, demográficos y genéticos (Pi y Vidart, 1969; Hidalgo et al., 2005; I.N.E., 2011). Por otra parte, el aporte de estas poblaciones es heterogéneo en las distintas regiones del Uruguay. El aporte europeo, africano y amerindio fue estimado con marcadores genéticos en 92%, 7% y 1% respectivamente para la población de Montevideo mientras que en Tacuarembó este aporte fue de 65%, 15% y 20% respectivamente (Sans et al., 1997).

Teniendo en cuenta esta conformación poblacional es esperable que las hemoglobinopatías estén presentes en nuestra población. En la población afrodescendiente fue observada una frecuencia de heterocigotos HbS/HbA de 10% mientras que la incidencia de alfa talasemias observada en esta misma población fue de 15,4% (Da Luz et al., 2006).

1.1.5 Objetivo general

Determinar la frecuencia de mutaciones de hemoglobinopatías en nuestra población así como el espectro de mutaciones presentes. Analizar

también los polimorfismos del cluster de genes de la β -globina para investigar las relaciones entre nuestra población y otras poblaciones así como el origen de estas mutaciones en el Uruguay.

1.1.6 Organización de la tesis

Puesto que parte de los resultados de esta tesis ya han sido publicados o han sido aceptados para su publicación, hemos optado por organizar la misma por capítulos. A continuación se detallan los distintos capítulos en los que se ha dividido:

En el capítulo 2, *Frecuencia y espectro de mutaciones de hemoglobinopatías en una población pediátrica uruguaya* se presenta el primer estudio en una muestra relativamente grande de población uruguaya de la frecuencia de hemoglobinopatías. Este trabajo fue aceptado para su publicación en febrero de este año en la revista Genetics and Molecular Biology (ID GMB-2012-0322) con el título *Frequency and spectrum of hemoglobinopathy mutations in a Uruguayan pediatric population*.

En el capítulo 3, *Hemoglobina Southampton [β 106(G8)Leu \rightarrow PRO, CTG \rightarrow CCG] en una mujer uruguaya*, se presenta el primer caso de una hemoglobina inestable reportado en el Uruguay. Este trabajo fue aceptado para su publicación en febrero de este año en la Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ID: 2055) con el título *Hb Southampton [β 106(G8)Leu \rightarrow PRO, CTG \rightarrow CCG] in a Uruguayan woman*

En el capítulo 4, *Caracterización molecular de las mutaciones de β -talasemias y de los haplotipos de la β -globina en la población uruguaya*, se detalla el perfil de mutaciones de β -talasemias en pacientes con estas mutaciones así como se investiga el origen de estas mutaciones en el Uruguay. El estudio de las mutaciones de β -talasemias en nuestra población permitió la identificación de una nueva mutación que produce esta patología. Esta fue publicada en la revista International Journal of Hematology Laboratory y la hemos incluido como apéndice de este capítulo (Da Luz J, López P, Kimura

EM, Albuquerque DM, Costa FF, Sans M, Sonati MF. A new β^0 -thalassemia frameshift mutation [β 48 (-T)] in a Uruguayan family. Int J Lab Hematol 2012 35:(1) 111-114)

En el capítulo 5, *Haplotipos de la β -globina asociados a la HbS* se determinan los haplotipos asociados a la mutación de HbS usando los polimorfismos clásicamente utilizados mas una serie adicional de polimorfismos los cuales permitieron investigar la presencia y frecuencia de haplotipos atípicos previamente observada en nuestra población.

Por último, en el capítulo 6 se brinda una conclusión general, con perspectivas para el trabajo futuro.

1.2 Bibliografía

- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J.G., Coulibaly, D., Kone, A., Kayentao, K., Djimde, A., Plowe, C.V., Doumbo, O., Wellems, T.E. and Diallo, D. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* **96** (2000), pp. 2358-63.
- Allison, A.C. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **48** (1954), pp. 312-8.
- Castro De Guerra, D., Hutz, M.H., Bortolini, M.C. and Salzano, F.M. Beta-globin gene cluster haplotypes in an admixed Venezuelan population. *American Journal of Human Biology* **9** (1997), pp. 323-327.
- Chen, L.Z., Easteal, S., Board, P.G. and Kirk, R.L. Evolution of beta-globin haplotypes in human populations. *Mol Biol Evol* **7** (1990), pp. 423-37.
- Da Luz J, Sans M, Kimura EM, Martins D, Sonati MF and Costa FF(2006) alpha-thalassemia, HbS, and beta-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. *Genet Mol Biol* 29: 595-600.
- Foglietta, E., Deidda, G., Graziani, B., Modiano, G. and Bianco, I. Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* **81** (1996), pp. 387-96.
- Goh, S.H., Lee, Y.T., Bhanu, N.V., Cam, M.C., Desper, R., Martin, B.M., Moharram, R., Gherman, R.B. and Miller, J.L. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood* **106** (2005), pp. 1466-72.
- Hardison, R.C., Chui, D.H., Giardine, B., Riemer, C., Patrinos, G.P., Anagnou, N., Miller, W. and Wajcman, H. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* **19** (2002), pp. 225-33.
- Hidalgo, P.C., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A. and Alvarez, I. Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetics* **5** (2005), pp. 217-222.
- I.N.E.: Ascendencia etnico-racial. Instituto Nacional de Estadísticas (2011), pp. <http://www.ine.gub.uy/censos2011/resultadosfinales/pais%20poblacion.html>.
- Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178** (1956), pp. 792-4.
- Ingram, V.M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* **180** (1957), pp. 326-8.
- Kulozik, A.E., Wainscoat, J.S., Serjeant, G.R., Kar, B.C., Al-Awamy, B., Essan, G.J., Falusi, A.G., Haque, S.K., Hilali, A.M., Kate, S. and et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* **39** (1986), pp. 239-44.
- Lam, K.W. and Jeffreys, A.J. Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006), pp. 8921-7.
- Lam, K.W. and Jeffreys, A.J. Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007), pp. 10950-5.
- Long, J.C., Chakravarti, A., Boehm, C.D., Antonarakis, S. and Kazazian, H.H. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am J Phys Anthropol* **81** (1990), pp. 113-30.
- Mattevi, V.S., Fiegenbaum, M., Salzano, F.M., Weiss, K.M., Moore, J., Monsalve, M.V., Devine, D.V. and Hutz, M.H. Beta-globin gene cluster haplotypes in two North American indigenous populations. *Am J Phys Anthropol* **112** (2000), pp. 311-7.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E. and Steinberg, M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev* **17** (2003), pp. 167-78.

- Pante-De-Sousa, G., Mousinho-Ribeiro, R.C., Dos Santos, E.J. and Guerreiro, J.F. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Ann Hum Biol* **26** (1999), pp. 365-73.
- Pauling, L., Itano, H.A. and et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* **110** (1949), pp. 543-8.
- Peschle, C., Mavilio, F., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Russo, G., Mastroberardino, G. and Marinucci, M. Erythropoietic development and hemoglobin switching in human embryos: cellular and molecular aspects. *Prog Clin Biol Res* **191** (1985), pp. 383-96.
- Pi, R. and Vidart, D., El legado de los inmigrantes, I Nuestra Tierra, Montevideo (1969).
- Piel, F.B., Patil, A.P., Howes, R.E., Nyangiri, O.A., Gething, P.W., Williams, T.N., Weatherall, D.J. and Hay, S.I. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* **1** (2010), p. 104.
- Sans M, Salzano FM and Chakraborty R (1997) Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* 69:161-70.
- Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R. and Nagel, R.L., Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge University Press (2001).
- Villegas, A., Porres, A., Sanchez, J., Gonzalez, F.A., Perez-Clausell, C., Martinez, M., Murga, M.J., Cacha, J., Lozano, M., Fernandez-Fuertes, I., Del Arco, A., Arrizabalaga, B., Perez de Mendiguren, B., San Juan, I., Saavedra, R., Ricart, P., Sainz, C., Guerra, J.L., Munoz, J.A., Lago, C. and Anso, V.M. Red blood cell phenotypes in alpha-thalasseмии in the Spanish population. *Haematologica* **83** (1998), pp. 99-103.
- Vivenes De Lugo, M., Rodriguez-Larralde, A. and Castro De Guerra, D. Beta-globin gene cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the northeastern coast of Venezuela. *Am J Hum Biol* **15** (2003), pp. 29-37.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* **79** (2001a), pp. 704-712.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J.B.: The Thalassaemia Syndromes. Wiley-Blackwell (2001b).

Capítulo 2. Frecuencia y espectro de mutaciones de hemoglobinopatías en una población pediátrica uruguaya. Da Luz, J et al. Genetics and Molecular Biology Manuscript ID GMB-2012-0322, aceptado febrero 2013

Frequency and spectrum of hemoglobinopathy mutations in a Uruguayan pediatric population

Running head: *Hemoglobinopathies in Uruguay*

Keywords: Hemoglobinopathies, Uruguayan population, beta-globin, alpha-globin

Julio Da Luz¹ jdal@fmed.edu.uy

Amalia Avila¹ amaliavila@yahoo.com

Sandra Icasuriaga² sanicasu@adinet.com.uy

Maria Gongóra³ mariagongora@gmail.com

Luis Castillo³ lcast@adinet.com.uy

Alejandra Serrón¹ a_serron@hotmail.com

Elza Miyuki Kimura⁴ kimura@fcm.unicamp.br

Fernando Ferreira Costa⁵ ferreira@unicamp.br

Mónica Sans⁶ msans@fhuce.edu.uy

Maria de Fatima Sonati⁴ sonati@fcm.unicamp.br

Keywords: Hemoglobinopathies, Thalassemias, HbS, Uruguayan population

¹Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Departamento de Laboratorio Clínico. Centro Hospitalario Pereira Rosell. Montevideo, Uruguay.

³ Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica. Centro Hospitalario Pereira Rosell. Montevideo, Uruguay.

⁴Departamento de Patología Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

⁵Hemocentro, Faculdade de Ciências Médicas, Universidad Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

⁶Departamento de Antropología Biológica, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República,

Corresponding author: Maria de Fatima Sonati

Abstract

Hemoglobinopathies are the most common recessive diseases worldwide, but their prevalence has not been investigated in Uruguay. In this study, 397 unrelated outpatient children from the Pereira Rosell Hospital Center (CHPR) as well as 31 selected patients with microcytic anemia and 28 β -thalassemia carriers were analyzed for hemoglobinopathies presence by biochemical and molecular biology methods. Hematological indices were compared by parametric and non-parametric methods between groups of genotypes. Of the 397 patients in the first group, approximately 1% (0.76% HbS and 0.25% β -thalassemia) had a mutation on the *HBB* gene and 3.3% had α -thalassemia. These mutations had a heterogeneous distribution that varied according to individual ancestry. The HbS was found exclusively in individuals with declared African ancestry and had a carrier frequency of 2.2%. α -thalassemia carrier frequency in outpatients of European and African ancestry was 1.2% and 6.5% respectively. Carrier frequency of α -thalassemia in the patients with microcytic anemia was 25.8%, significantly higher ($p < 0.01$) than that observed in the larger sample as a whole and in the Afro-descendants and Euro-descendants. Significant differences were observed in hematological parameters between individuals with thalassemia genotypes and those with a normal genotype. These results indicate that hemoglobinopathies are a non-negligible health problem in Uruguay.

Introduction

Hemoglobinopathies are the most common recessive diseases worldwide, possibly because of a selective advantage in the presence of malaria tropica (Steinberg et al., 2001). They fall into two main categories: those resulting from structural hemoglobin (Hb) variants and thalassemias. Among the structural Hb variants, the most frequent are HbS and HbC, which are present in high frequencies in Sub-Saharan Africa. HbS is also present in high frequencies in India and Saudi Arabia (Allison 1956; Steinberg et al., 2001). Hemoglobinopathies resulting from these structural variants are an important health problem in the Americas, where they are a result of the contribution of individuals of African descent.

Thalassemias are characterized by a decrease in or absence of synthesis of one or more globin chains resulting in a reduced rate of synthesis or absent of hemoglobin or hemoglobins (Weatherall and Clegg 2001; Weatherall 2004). α -thalassemias are caused by a reduction in (α^+) or complete suppression (α^0) of α -globin chain synthesis, caused mainly by deletions of one (- α) or both (- -) *HBA* genes, although non-deletional α -thalassemia caused by small deletions or point mutations contributes to the spectrum of α -thalassemia mutations (Foglietta et al., 1996; Steinberg et al., 2001)

Thalassemias are present in high frequencies in tropical and sub-tropical regions of Africa, the Mediterranean basin and Southeast Asia, where malaria is or has been endemic. However, as a result of population migration and the African slave trade these diseases have spread across the world and now constitute an important health problem in the Americas (Weatherall and Clegg 2001). One frequent determinant of α -thalassemia is a 3.7 Kb ($-\alpha^{3.7}$) deletion, which affects the two *HBA* genes and results in one unique hybrid gene (HBA2-HBA1). This deletion is common in all areas with a high

prevalence of thalassemia but reaches the highest frequencies in Africa and in some populations in Asia. The hematological alterations observed in individuals with this deletion can be very mild or silent in many cases. Another frequent determinant of α -thalassemia is the 4.2 Kb deletion ($-\alpha^{4.2}$ deletion), which eliminates the *HBA2* globin gene completely. This deletion is found more frequently in Asian populations but is also found in Mediterranean regions in lower frequencies. In the Mediterranean region, the $-\alpha^{\text{MED}}$ and $-(\alpha)^{20.5}$ deletions are the most frequent causes of α^0 -thalassemias, while the deletion of a pentanucleotide (TGAGG) located at the 5' end of the IVS-I of the *HBA2* gene, denominated α^{HphI} , and a single point mutation at the initiation codon (ATG-ACG) of the *HBA2* gene as well as a single point mutation (ATG-GTG) of the *HBA1* gene are the most common non-deletional determinants of α -thalassemias in this region (Higgs et al., 1989; Foglietta et al., 1996; Kattamis et al., 1996; Steinberg et al., 2001).

β -thalassemias, which to date are known to be caused by more than 190 different mutations, are frequent in the Mediterranean region and Southeastern Asia. Although most of these mutations are single base substitutions or small deletions or insertions within or flanking the *HBB* gene, large deletions or insertions can also be observed. Generally, in any given population there will be a group of a few common mutations and a large number of rare ones (Huisman et al., 1996; Hardison et al., 1998).

The Uruguayan population is originated mainly from European populations (Spanish, Italian and others), Subsaharan African populations and native American populations, but unlike other South American countries there are no isolated Afro-Uruguayan or native American communities. The contribution of these parent populations to the Uruguayan genetic pool is geographically heterogeneous and non-negligible, as

reflected in genetic data showing contributions of 92%, 7% and 1% from European, African and Native Americans, respectively, in Montevideo, southern Uruguay, and corresponding figures of 65%, 15% and 20% in Tacuarembó, in northeastern Uruguay (Sans et al., 1997). According to a Continuous Household Survey based on self-identification (I.N.E., 1997), the Uruguayan population is classified as 93.3% European, 5.9% black or mulatto, 0.4% native and 0.4% Asian. Recent data based on self-declared ancestry indicate that 87.4% of the population have exclusively European ancestry, 9.1% African ancestry, 2.9% native American ancestry and 0.6% other ancestries (Buchelli and Cabella, 2006).

Because of the ethnic origin of Uruguayan populations, it is possible that hemoglobinopathies may be present in high frequencies. An earlier study in Uruguay showed that 10% of individuals with African-ancestry were HbS/HbA carriers, a frequency similar to that observed in other countries in the Americas (Da Luz et al., 2006). However, there are no data on the frequency and spectrum of mutations that cause hemoglobinopathies in the Uruguayan population apart from the study mentioned above. Moreover, there are no population data on β -thalassemias although most of the Uruguayan population came from the Mediterranean region. It has been reported that 19.1% of preschool Uruguayan children have anemia, (WHO 2008), but the causes of the disease are not always clear. The aim of this study was to contribute to the epidemiology of hemoglobinopathies in the Uruguayan population by investigating, in what is the first study of its kind in the country, the frequencies of both structural and mutation-associated thalasseмии and their impact on the prevalence of anemia in the country.

Subjects and Methods

A total of 428 unrelated children between 2 and 15 years of age were analyzed. The main sample consisted of 397 outpatients randomly recruited at the Pereira Rosell Hospital Centre (CHPR) in 2006 who presented with different health problems unrelated to hemoglobinopathies. The children were grouped according to the origin of their ancestors as of either European (259) or African (138) descent. To be classified as Afro-descendants the children had to have at least one grandparent of African origin. When their ancestry was unknown, children were classified according to their parents' self-identification, as reported in the 1996-1997 Continuous Household Survey (I.N.E. 1997). The remaining 31 blood samples belonged to children referred to the Pediatric Hematology and Oncology Service (PHOS) at the CHPR to be investigated for microcytosis and hypochromia without iron deficiency and with normal levels of HbA2. The study was approved by the CHPR Ethics Committee, and the children's parents gave written informed consent for them to participate in the study.

Red blood cell (RBC) indices were determined electronically with an automated cell counter (Cell Dyn 3700, USA). The presence of β -thalassemias and the most common Hb structural mutations (HbS, HbC) were investigated by electrophoresis on cellulose acetate strips at pH 8.5 (Cellogel 200 μ , Cellogel Electrophoresis Co, Italy.).

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by saline extraction (Miller et al, 1988). Patients were screened for deletional and non-deletional α -thalassemias using polymerase chain reaction (PCR) based methods. Most common α -globin deletions ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $-\text{SEA}$, $-\text{FIL}$, $-\text{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, and $-\text{THAI}$) were identified by

multiplex PCR while non-deletional forms were identified by restriction fragment length polymorphism (RFLP) from products amplified by PCR. ($\alpha^{\text{Hph}}\alpha$, $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ and $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$) (Hall et al., 1993; Tan et al., 2001). The *HBB* gene was amplified and sequenced to confirm and identify β -globin mutations (Miranda et al., 1997). In samples with the HbS mutation, five polymorphic sites in the β -globin gene cluster were analyzed: 1) *HincII* 5' ϵ ; 2) *HindIII* $\text{C}\gamma$; 3) *HindIII* $\text{A}\gamma$; 4) *HincII* 5' $\psi\beta$; and 5) *HincII* 3' $\psi\beta$. Fragments containing each of these sites were amplified by PCR using primers and conditions previously described (Sutton et al., 1989; Guerreiro et al., 1992). Haplotypes were constructed assuming that the presence of two common haplotypes was more probable than the combination of one common and one rare haplotype or of two rare haplotypes (Kulozik et al., 1986; Long et al., 1990; Castro de Guerra et al., 1997; Vivenes De Lugo et al., 2003).

The genotypic and allelic frequencies were estimated by gene counting. The former was compared between the groups using Fisher's exact test with the Arlequin software package v.2.000 (Schneider et al., 2000).

Hb values, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and RBC values were corrected for age and sex. Distribution of these values and the red blood cell distribution width (RDW) were compared between the individuals with different genotypes in the main sample and 28 carrier children previously diagnosed with β -thalassemia at the CHPR. Hb and RBC were compared by Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) test for pairwise multiple comparisons between groups. The Mann-Whitney test was used to compare MCV, MCH and RDW to account for non-normality. The tests were carried out using SPSS v12.0 with $p < 0.05$ as level of significance.

Results

We identified three HbS carriers (HbS/HbA) (0.75%) in the main, randomly recruited CHPR sample, all of whom had been classified as Afro-descendants. The frequency of the β^S mutation was 0.38% but increased to 1.1% for individuals of African origin (Table 1). In two individuals the HbS mutation is probably associated with the Bantu haplotype whereas the other is associated with the Benin haplotype.

Although only one sample (an individual of European ancestry) had increased HbA₂, after sequencing the *HBB* gene in 15 samples with an MCV of less than 75 fL and an RBC value of over 5 million/ μ L, the only β -thalassemia mutation found—the β^0 codon 39 mutation (C>T) was identified in this individual. Results for α -thalassemias for the random sample are summarized in Table 2. The only α -thalassemia mutation observed in the sample was the $-\alpha^{3.7}$ mutation, accounting for 3.3% of the mutations, which were present in a heterozygous state ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$: 3%) in twelve individuals and in a homozygous state ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$: 0.3%) in one. Of the 259 Euro-descendants, 3 (1.2%) were heterozygous $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, while 10 of the 138 Afro-descendants (7.2%) had the mutation, 9 (6.5%) of which were heterozygous ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) and 1 of which (0.7%) was homozygous ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). Microcytosis was detected in 27 Afro-descendants and 28 Euro-descendants; nine (33.3%) of the former and only one (3.6%) of the latter had α -thalassemia. Genotypic frequencies found differed significantly between Afro- and Euro-descendants ($p < 0.001$), between individuals with or without microcytosis ($p < 0.001$) and between Afro- and Euro-descendants with microcytosis ($p = 0.0047$).

Of the 31 PHOS pediatric patients who presented with microcytosis and hypochromia, 10 (32.3%) were found to have α -thalassemia: 8 (25.8%) were heterozygous for the $-\alpha^{3.7}$ deletion, 1 (3.2%) was homozygous for the same deletion ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) and 1 (3.2%) was heterozygous ($\alpha\alpha/-\alpha^{20.5}$), this being the first reported case of the $-\alpha^{20.5}$ deletion in Uruguay. These frequencies do not differ significantly from those observed in individuals with microcytosis in the random sample.

RBC indices in individuals with α -thalassemia genotypes, β -thalassemia trait and normal α - and β -globin genotypes are shown in Table 3. MANOVA revealed significant differences in Hb values and RBC indices between the genotypes (Pillai's trace for comparison among genotypes: $F:55.02$; $p<0.001$). Univariate analysis of Hb revealed significant differences in Hb values between the group with normal genotypes and the other groups of genotypes and between the group with the $-\alpha^{3.7}$ deletion and the other groups of genotypes, whereas there were significant differences in RBC values between individuals with β -thalassemia trait and the other groups except for $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ individuals. Significant differences were also found for MCV and MCH indices using the Mann-Whitney test between individuals with normal genotypes and all the other groups, and between individuals with β -thalassemia trait and the $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ genotype.

Discussion

Although the Uruguayan population originated from populations in which hemoglobinopathies are an important health problem, this is the first study of the frequency of hemoglobinopathies in Uruguay, with the exception of a previous study carried out with a small sample from the Afro-Uruguayan population (Da Luz et al., 2006).

Although the allelic frequency observed for the β^S mutation (0.38%) cannot be extrapolated for the Uruguayan population as a whole because the samples consisted mostly of individuals from the city of Montevideo attending the CHPR, a public hospital, it is similar to that estimated for the Uruguayan population (0.3%) using the carrier and allelic frequencies found for HbS (10% and 5% respectively) in Afro-Uruguayans and reported in a previous study (Da Luz et al., 2006). The frequency of HbS carriers observed in the total sample is slightly lower than that observed in the South of Brazil, a region that shares borders with Uruguay and where a carrier frequency of 1.2% was observed in newborns (Daudt et al., 2002). However, there is a greater difference between the frequency in the Uruguayan population in the present study and the frequency in populations from the Northeast of Brazil, where there is a greater contribution from African populations and the frequency of HbS carriers ranges from 5.1% to 11.4% (Azevedo et al., 1980; Bandeira et al., 1999; Adorno et al., 2005).

The frequency of the β^S mutation in the sample of African origin in the present study (1.1%) is lower than that observed previously (5%); it can also be seen from Table 1 that the genotypic frequencies differed significantly between the two studies. This difference can be explained by the greater African contribution in the latter study, whose population came mainly from Afro-Uruguayan social organizations and was

selected based on ancestry and phenotypic traits, whereas in the present study the existence of one Afro-descendant grandparent was sufficient for an individual to be classified as Afro-Uruguayan.

The presence of Bantu and Benin haplotypes (frequencies not given because of the small number of cases) is also in agreement with data from the previous study carried out in Uruguay, which showed a predominance of the Bantu haplotype over the Benin one. These findings are compatible with historical and demographic data on the origin of African slaves, which indicate a major contribution from individuals from Bantu-speaking groups (Isola, 1975). The predominance of the Bantu haplotype was also observed in many countries and regions of South America (Muniz et al., 1995; Pante de Sousa., 1999; Moreno et al., 2002). In the Americas, the Benin haplotype is most frequent in the north of South America, the Caribbean region and North America (Antonarakis et al., 1984; Arends et al., 2000; Vivenes de Lugo et al., 2003; Galiza Neto et al., 2004; Adorno et al., 2005) whereas the Senegal haplotype is found in high frequencies in isolated Amazonian Afro-Brazilian communities (Pante de Sousa et al., 1999).

Interestingly, we found only one carrier of β -thalassemia. This child has the β^0 codon 39 (C>T) mutation, the most frequent β -thalassemia mutation found in the neighboring countries of Brazil and Argentina (Martins et al., 1993; Roldan et al., 1997; Rossetti et al., 2004). As expected, because this individual belongs to the sample without African ancestry, the frequency of β -thalassemia alleles in this group (0.41%) is similar to the global frequency observed in Spain (0.41%) and in some regions of northern Italy (0.5%), a part of the country where the lowest frequencies of β -thalassemia are found (Villegas et al., 1992; Villegas et al., 2001; Weatherall and Clegg 2001; Calvo-Villas et al., 2006).

The $\alpha^{-3.7}$ thalassemia carrier frequency (3%) in the total CHPR sample is similar to that found in Spaniards (4.4%), Portuguese (3.5%) and Italians (4.1%) (Fei et al., 1989; Villegas et al., 1992; Peres et al., 1995; Weatherall and Clegg 2001). When we analyzed the sub-sample with African ancestry, the $\alpha^{-3.7}$ mutation carrier frequency increased and was 6.5% higher than that for the whole sample but, as expected from the admixture, was lower than that observed in parental African populations, where the frequency of α -thalassemia carriers ranges from 11% to 50% (Weatherall and Clegg 2001). The $\alpha^{-3.7}$ mutation carrier frequency in the sub-sample with African ancestry was also lower than that observed in Afro-Brazilian populations, where the carrier frequency ranges from 7% to 21% (Sonati et al., 2001; Adorno et al., 2005; Souza et al., 2009; Wagner et al., 2010), possibly because of a higher non-African admixture in this Afro-Uruguayan population. The α -thalassemia frequencies for Afro-descendants with microcytosis (33.3%) and the group of children with microcytosis and hypochromia (32.3%) are both similar to the frequency observed in a similar sample from Rio Grande do Sul, Brazil, (31.7%) (Wagner et al., 2010) and lower than that observed for a population in the Southeast of Brazil in which α -thalassemia explained about 50% of microcytosis cases (Borges et al., 2001).

The sample of 31 patients admitted to the PHOS exhibited the $-(\alpha)^{20.5}$ deletion, a mutation that can be related to European or Asian ancestry (Huisman et al., 1996; Hardison et al., 1998). The presence of this deletion in a homozygous state or associated with other α -thalassemia mutations produces hydrops fetalis or HbH disease, a severe hemoglobinopathy not described to date in Uruguay.

Finally, the data presented here are the first on the frequency of hemoglobinopathies in a relatively large Uruguayan sample and show that these diseases have non-negligible

frequencies. Although the sample analyzed is not fully representative of the Uruguayan population, about a sixth of births in the whole country occur in the CHPR. The frequencies of hemoglobinopathies found in the present study underline the need for strategies to prevent further health complications. In light of this, Afro-Uruguayan associations have been pressing for hemoglobinopathies to be included in the universal screening of neonates (see Queiruga et al., 2010, for screening data). Furthermore, data on RBC parameters in individuals with normal and thalassemia genotypes can help to detect α -thalassemia in patients suspected of having the disease. Our findings encourage us to investigate the distribution of hemoglobinopathies in a more comprehensive sample with greater African and/or European genetic contributions and to evaluate the benefits of including tests to detect hemoglobinopathies in the universal screening of neonates in Uruguay

Acknowledgements

This work was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, UdelaR, Uruguay) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Brazil (grant no. 2008/57441-0).

Bibliography

- Adorno EV, Couto F, Moura Neto JP, Menezes JF., Rego, Dos Reis MG and Goncalves MS (2005) Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública* 21: 292-98.
- Allison AC (1956) The sickle cell and hemoglobin C genes in some populations. *Ann. Hum. Genet.* 21: 67-89.
- Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ and Kazazian HH Jr (1984) Origin of the β S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:853-856
- Azevêdo ES, Alves AFP, Silva MCBO, Souza MGF, Lima AMVMD and Azevêdo WC (1980) Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. *Am J Phys Anthropol* 53:509-12.
- Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM and Marques NM (1999) Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. *J Pediatr (Rio J)* 75:167-71.
- Borges E, Wenning E, Kimura EM, Gervasio SA, Costa FF and Sonati MF (2001) High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz. Med. Biol. Res* 34: 759-62.
- Bucheli M and Cabella W(2006) Perfil demográfico y socioeconómico de la población uruguaya según su ascendencia racial. Informe Temático, Encuesta Nacional de Hogares Ampliada 2006, Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.gub.uy/enha2006/Informe%20final%20raza.pdf>
- Calvo-Villas JM, Zapata MF, Cuesta J, De la Iglesia S, Ropero P, Carreter E and Sicilia F (2006) Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *An. Med. Interna.* 23: 206-12
- Castro de Guerra D, Hutz M, Bortolini MC and Salzano FM(1997) Beta-globin gene cluster haplotypes in an admixed Venezuelan population. *Am. J. Hum. Biol* 9: 323-27.
- Da Luz J, Sans M, Kimura EM, Martins D, Sonati MF and Costa FF(2006) alpha-thalassemia, HbS, and beta-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. *Genet Mol Biol* 29: 595-600.
- Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Camargo Neto E, Silla LMR and Giugliani R (2002) Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública* 18:833-41.

- Fei YJ, Kutlar H, Harris H, Wilson MM, Milana A, Sciacca P, Schiliro G, Masala B, Manca L and Altav C (1989) A search for anomalies in the zeta, alpha, beta, and gamma globin gene arrangements in normal black, Italian, Turkish, and Spanish newborns. *Hemoglobin* 13: 45-65.
- Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G and Bianco I(1996) Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* 81:387-96
- Galiza Neto GC, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira ML, and Chaves FDAB(2005) Analysis of β^S globin haplotypes in Ceará, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 41: 315-21.
- Guerreiro JF, Figueredo S, Santos SE and Zago MA (1992) Beta-globin gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. *Hum. Genet* 89: 629-31.
- Hall GW, Thein S, Newland A, Chisholm M, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kattamis C and Higgs DR (1993) A base substitution (T-->C) in codon 29 of the alpha 2-globin gene causes alpha thalassemia. *Br J Haematol* 85: 546-52.
- Hardison R, Chui D, Riemer C, Miller W, Carver M, Molchanova T, Efremov G and Huisman THJ (1998) Acces to "A Syllabus of Human Hemoglobin Variants (1996)" via the World Wide Web. *Hemoglobin*, 22:113-27.
- Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman APand Weatherall DJ (1989) A review of the molecular genetics of the human α -globin cluster. *Blood*. 73: 1081-104.
- Huisman THJ, Carver MF and Efremov GD (1996) A Syllabus of Human Hemoglobin Variants. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, GA, USA. <http://globin.cse.psu.edu/html/.../variants/>
- I.N.E. (1997) Encuesta continua de hogares. Módulo de raza. http://www.ine.gub.uy/biblioteca/raza/MODULO_RAZA.pdf.
- Isola E (1975) La esclavitud en el Uruguay desde sus comienzos hasta su extinción (1743-1852) Comision Nacional De Homenaje Del Sesquicentenario De Los Hechos Históricos De 1825., eds., Montevideo: Talleres Gráficos Monteverde y Cía.
- Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S and Fortina P (1996) Human α -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol* 53: 81-91.
- Kulozik AE, Wainscoat G, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJF, Falusi,AG, Haque SQ, Hilali AM, Kate S, Ranashinge WAEP and Weatherall DJ(1986). Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 39: 239-44.

- Long JC, Chakravarti C, Bohem C, Antonarakis S and Kazazian HH (1990) Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am J Phys Anthropol* 81: 113-130.
- Martins CS, Ramalho A, Sonati MF, Goncalvez MS and Costa FF (1993) Molecular characterisation of beta thalassemia heterozygotes in Brazil. *J Med Genet* 30: 797-98
- Masmas TN, Garly ML, Lisse IM, Rodrigues A, Petersen PT and Birgen H (2006) Inherited hemoglobin disorders in Guinea-Bissau, West Africa: A population study. *Hemoglobin*30:355-364.
- Migot-Nabias F, Pelleau S, Watier L, Guitard J, Toly C, De Araujo C, Ngom MI, Chevillard C, Gaye O and Garcia A (2006) Red blood cell polymorphisms in relation to *Plasmodium falciparum* asymptomatic parasite densities and morbidity in Senegal. *Microbes Infect* 8:2352-2358.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 16:1215-1216.
- Miranda SRP, Fonseca S, Figueredo M and Yamamoto M. (1997) Hb Köln [α 2 β 298(FG5) val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Genet* 20(4).
- Moreno N, Martínez JA, Blanco Z, Osorio Land Hackshaw (2002) Beta-globin gene cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the State of Aragua. *Gen Mol Biol* 25:21-24
- Pante de Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Melo dos Santos EJ and Guerreiro JF (1999) b-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from three Amazon region: evidence for a signature gene flow from Atlantic West Africa. *Ann. Hum. Biol* 26:365-373
- Peres MJ, Romão L, Carreiro H, Picanço I, Batalha L, Magalhães HA, Martins MC, Lavinha J. (1995) Molecular basis of alpha thalassemia in Portugal. *Hemoglobin* 19:343-352
- Queiruga G, Lemes A, Ferola C, Machado M, Quejo C, Garlo P and Parallada G (2010) Pesquisa neonatal: lo que puede prevenir una gota de sangre. Jornada actualidad y nuevas metas en la implementación del Sistema Nacional de Pesquisa Neonatal (SNPN) Montevideo: BPS: Centro de Estudios en Seguridad Social, Salud y Administración.
<http://portal.campusvirtualsp.org/virtualcampus/uruguay/drupal/index.php?q=node/17>
- Ramalho AS, Jorge RN, Oliveira JA and Pedreira DA (1976) Hemoglobina S em recém-nascidos brasileiros. *J Pediatr* 41:9-10.

- Roldán A, Gutierrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G and Torres AF (1997) Molecular characterization of beta-thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* 54:179-82.
- Rossetti L, Targovnik H and Varela V (2004) The molecular basis of beta-thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin. *Haematologica* 88: 746-47
- Sans M, Salzano FM and Chakraborty R (1997) Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* 69:161-70.
- Schneider S, Roessli D and Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual version 2.000.
- Souza AE, Cardoso GL, Takanashi SY and Guerreiro JF (2009) Alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State. *Genet Mol Res* 8:477-481.
- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR and Nagel RL (2001) Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, Cambridge
- Sutton M, Bouhassira EE and Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 32: 66-9.
- Tan AS, Quah T, Low P and Chong SS (2001) A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 98: 250-51.
- Villegas A, Sanchez J and Sal Del Rio E (1992) Alpha-globin genotypes in a Spanish population. *Hemoglobin* 16: 427-429.
- Villegas A, Ropero P, González F, Anguita E and Espinós E (2001) The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 25: 273-83.
- Vívenes De Lugo M, Rodríguez-Larralde A and Castro de Guerra D (2003) Beta-globin gene cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the northeastern coast of Venezuela. *Am J Hum Biol* 15: 29-37.
- Wagner SC, de Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Filippon L, Zaleski CF, Azevedo LA, Amorin B, Callegari-Jacques SM and Hutz M (2010) Prevalence of common α -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genet Mol Biol* 33: 641-645
- Weatherall DJ and Clegg JB (2001) Public Health Reviews Inherited haemoglobin disorders : an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 79: 704-12
- Weatherall D (2004) The Thalassemias: The role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Am J Hum Genet* 74:385–392

WHO (2008) Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO global database on anaemia. Eds: de Benoist B, McLean E, Egli I, Cogswell M. World Health Organization.

Table 1. Frequency of HbS in the main sample and in Afro-descendants.

	Genotypic frequencies				Allelic frequencies	
	N	$\beta^A/\text{non } \beta^S$	β^A/β^S	β^S/β^S	β^A	β^S
All ¹	397	394 (99.24)	3 (0.76)	0	0.9960	0.0038
Afro-descendants ¹	138	135(97.78)	3(2.22)	0	0.9890	0.0110
Afro-descendants ²	40	36 (90)	4 (10)	0	0.9500	0.0500
P*		0.0458 ± 0.0018				

¹Present study, ²Da Luz et al, 2006. Percentage in parentheses. * Afro-descendants 1 and 2 compared.

Table 2. Frequency of α -thalassemia in the main sample and in individuals grouped according to ancestry and the presence or absence of microcytosis.

Subjects	Genotypic frequencies				N	Allelic frequencies	
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	$-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3.7}$	$\alpha\alpha$
All	384(96.7)	12(3.0)	1(0.3)		397	0.018	0.982
Afro-descendants	128(92.8)	9(6.5)	1(0.7)		138	0.040	0.960
Euro-descendants	256(98.8)	3(1.2)			259	0.006	0.994
P		<0.001				<0.01	
Microcytic	45(81.8)	9(16.4)	1(1.8)		55	0.100	0.900
Non-microcytic	339(99.1)	3(0.9)			342	0.004	0.996
P		<0.001				<0.001	
Afro and microcytic	18(66.7)	8(29.6)	1(3.7)		27	0.815	0.185
Euro and microcytic	27(96.4)	1(3.6)			28	0.982	0.018
P		<0.01				<0.01	
Selected patients	21(67.8)	8(25.8)	1(3.22)	1(3.22)	31	0.823	0.161
p*		<0.01				<0.01	

Percentages in parentheses * Compared with Afro- and Euro-descendants. N. Number of individuals

Table 3. Red blood cell indices in normal patients, in patients with α -thalassemia genotypes and in β -thalassemia carriers.

Blood index	Subjects				<i>p</i>
	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	β -thalassemia	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	
Hb (g/dL)*	12.5 ± 1.79 ^{a, b}	12.1 ± 0.43 ^a	11.4 ± 0.88 ^a	13.7 ± 1.31 ^b	< 0.05
RBC (x10 ¹² /L)*	5.16 ± 0.40 ^a	5.69 ± 0.21 ^{a, b}	5.64 ± 0.50 ^b	5.01 ± 0.49 ^a	< 0.05
MCV (fL)*	74.7 ± 6.29 ^a	63.7 ± 0.17 ^{a, b}	64.6 ± 4.07 ^b	83.1 ± 4.86 ^c	< 0.05
MCH (pg)*	23.8 ± 2.94 ^a	20.7 ± 0.21 ^{a, b}	19.7 ± 1.05 ^b	27.5 ± 1.67 ^c	< 0.05
RDW (%)	15.7 ± 2.43 ^{a, b}	17.1 ± 0.49 ^{b, c}	18.2 ± 1.21 ^c	14.9 ± 1.70 ^a	< 0.05

Values are means ± SD. Hb: hemoglobin; RBC: red blood cells; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red cell distribution width. Values identified by the same letters do not differ significantly. Hb and RBC were compared with the SNK test, and MCV, MCH and RDW by the Mann-Whitney test to account for non-normality. * Analyses using values corrected for age and sex.

Capítulo 3. Hemoglobina Southampton [β 106(G8)Leu→PRO, CTG→CCG] en una mujer uruguaya. Da Luz et al, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia ID: 2055, aceptado febrero 2013

Hb Southampton [β 106(G8)Leu \rightarrow PRO, CTG \rightarrow CCG] in a Uruguayan woman

Running head: *Hb Southampton in Uruguay*

Key words: hemoglobinopathies, hemolytic anemia, Uruguayan population

Julio Da Luz¹ jdal@fmed.edu.uy

Pablo López¹ plopez@fmed.edu.uy

Fernando Ferreira Costa² ferreira@unicamp.br

Maria de Fatima Sonati³ sonati@fcm.unicamp.br

Mónica Sans⁴ msans@fhuce.edu.uy

¹Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Hemocentro, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴Departamento de Antropología Biológica, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Abstract

Hb Southampton (also known as Hb Casper) is a rare hemoglobin structural variant resultant of a substitution of a leucine residue for a proline at the position 106 of the β -globin chain [β 106(G8)Leu-->Pro, CTG-->CCG]. It is very unstable and associated with severe hemolytic anemia. We detected this mutation in a 37-year-old Uruguayan woman with a history of severe chronic hemolytic anemia since her childhood. Hematological data showed that the original microcytosis changed to macrocytosis as a possible consequence of B12 vitamin and folic acid deficiency. It is the first time that this variant is found in the Uruguayan population.

Resumo

A Hb Southampton (também conhecida como Hb casper) é uma variante estrutural rara da hemoglobina resultante da substituição de um resíduo de leucina por prolina na posição 106 da globina beta [β 106(G8)Leu-->Pro, CTG-->CCG]. É muito instável e associada com anemia hemolítica grave. Nós detectamos essa mutação em uma mulher uruguaia com 37 anos de idade e história de anemia hemolítica crônica grave desde a infância. Os dados hematológicos revelaram que a microcitose original foi substituída por macrocitose provavelmente devido à deficiência de vitamina B12 e ácido fólico. É a primeira vez que essa mutação é encontrada na população uruguaia.

INTRODUCTION

The unstable hemoglobin's are structural variants characterized mainly by single amino-acid replacements in the globin chain, but occasionally may be due to amino-acids insertions or deletions and truncated or extended globin chains. These hemoglobin's commonly have an autosomal-dominant hereditary hemolytic anemia produced by the formation of inclusions of precipitated denatured hemoglobin called Heinz bodies in the red cell. The most common causes of instability are disruptions of alpha helix of globin chains, alterations in the steric configuration of heme pocket and alterations in the tertiary structure of globin chains.

Here, we report a case of Hb Southampton (also known as Hb Casper) (β 106 Leu-Pro, CTG-CCG) in a women who was diagnosed for the first time at age 37 and referred to our laboratory with a history of severe chronic hemolytic anemia. This amino acid replacement (β 106 Leu-Pro) alters the tertiary structure of the β -chain in a region where there is a direct contact with the heme group (1). This hemoglobin was first reported by Hyde et al. (1972) (2), and then was reported in seven patients including two patients in Argentine (3-8), all of them produced by *de novo* mutation.

CASE REPORT

Here, we report a case of Hb Southampton (also known as Hb Casper) (β 106 Leu-Pro, CTG-CCG) in a women who was diagnosed for the first time at age 37 and referred to our laboratory with a history of severe chronic hemolytic anemia.

A 37 years-old-woman from the city of Montevideo, Uruguay, referred to our laboratory with a history of undiagnosed chronic hemolytic anemia since her childhood. The patient was born at term after a normal pregnancy and delivery. At four months of age she was prescribed iron due to anemia. At eleven months of age, she had a respiratory

tract infection with anemia and jaundice. She was given her first transfusion at twenty-one months of age, when she had a new episode of respiratory tract infection with anemia and fever. The splenomegaly was detected at the time and she was misdiagnosed as beta thalassemia major based in her clinical data. The patient was continuously receiving blood transfusions until she was 16 years old (in 1990), when splenectomy was performed.

This study was conducted accordance with the Helsinki declaration as revised in 2008. The patient gave a written informed consent to participate in this study. Physical examination revealed prominent skull, inferior maxillas and malar eminences as well as palpebral fissures oriented up and back, with jaundice. This phenotype was previously described in an Argentine boy with Hb Southampton (7).

Red blood cell indices were electronically determined with an automated cell counter (Cell Dyn 3700). The screening for the most common structural hemoglobinopathies (HbS, HbC) and the determination of the HbA2 and HbF levels were carried out by the Variant Hbs HPLC systems (BioRad).

DNA was extracted from peripheral blood sample by standard methods. The seven most common deletional α -thalassemias ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $-\text{SEA}$, $-\text{FIL}$, $-\text{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, and $-\text{THAI}$) were checked by a multiplex PCR (9). The non-deletional mutations ($\alpha^{\text{Hph}\alpha}$, $\alpha^{\text{NcoI}\alpha}$ and $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$) were investigated by PCR and digestion with the restriction enzymes *HphI* and *NcoI* respectively (10). The β -globin gene was amplified by PCR in two segments and sequenced in a ABI 3130 (Applied Biosystems) genetic analyzer according to conditions already described (11). The hematological data of the patient are shown in Table I (1980-2007). The original microcytosis changed to a macrocytosis possibly due to the deficit of folic acid and B12 vitamin caused by the continuous regenerative

activity of the bone marrow tissue. According to this, the levels of folic acid and B12 vitamin were undetectable.

No abnormal Hbs were detected by the Variant Hbs HPLC systems and no α -thalassemia mutations were found. However, the sequencing of the β -gene showed a base substitution (T→C) in the second position of the 106th codon, leading to a Leu→Pro replacement in the β -globin chain, corresponding to Hb Southampton.

DISCUSSION

Hb Southampton (β 106 Leu-Pro, CTG-CCG) is the result of the substitution of leucine (located in the position G8) by proline, in the β -chain. This substitution disrupts the alpha helix of β -chain and alters the tertiary structure of the hemoglobin molecule resulting in the loss of hem group. This produce denaturation and precipitation of the hemoglobin molecule generating Heinz bodies which are associated with the red cell membrane and lead to premature cell destruction and as consequence a chronic hemolytic anemia (12).

It is unclear if the microcytosis originally observed in the patient is a characteristic of the carriers of Hb Southampton. The patient reported by Eandi et al. (2006) (7) presented microcytosis and hypochromia but not the patients reported by Avalos et al. (2012) (8) the two patients reported by Koler et al. (1973) (3) and the patient reported by Heintz et al. (1989). Therefore, the microcytosis originally observed may have been due to other conditions such as iron deficiency.

Although we do not have any samples from her parents to analyze, we can infer that this is a de novo mutation as previously reported (2-8), because her parents did not present the clinical characteristics compatible with the presence of Hb Southampton. This

variant can be detected by isoelectric focusing (IEF) but it is electrophoretically silent in conventional Hb electrophoresis, the method most commonly used in Uruguay. Also, the presence of unstable hemoglobin's including Hb Southampton can be suspect when screening test as isopropanol and the heat tests are positive as well as the presence of inclusion bodies by brilliant cresyl blue technique (13). These are inexpensive test and easy to implement in any hematological laboratory.

CONCLUSION

Despite the widespread knowledge about the incidence and molecular basis of hemoglobinopathies, these diseases have not been considered as a health problem until recently in Uruguay.

This report shows the necessity to update the methods for detection of hemoglobinopathies in Uruguay as well as to start considering these diseases as a health problem in our country in order to avoid unnecessary medical interventions.

References

1. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 1970; 228(273):726–739.
2. Hyde RD, Hall MD, Wiltshire BG, Lehmann H. Haemoglobin Southampton, $\beta 106(\text{G8})\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}$: an unstable variant producing severe haemolysis. *Lancet* 1972; 2(7788):1170–1172.
3. Koler RD, Jones RT, Bigley RH, Litt M, Lovrien E, Brooks R, Lahey ME, Fowler R. Hemoglobin Casper: $\beta 106(\text{G8})\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}$; a contemporary mutation. *Am J Med* 1973; 55(3): 549–558.
4. Didkowskii NA, Idel'son LI, Filippova AV, Lemann G. A new case of the unstable Hemoglobin Southampton-Casper ($\beta 106(\text{G8})\text{leucine}\rightarrow\text{proline}$). *Probl Gematol Pereliv Krovi* 1976; 21(6):48–50.
5. Wajcman H, Gacon G, Labie D, Koler RD, Jones RT, et al. Isolation and functional characterization of hemoglobin Casper: $\beta 106(\text{G8})\text{Leu}$ replaced by Pro. *Biochemistry* 1975;14(22): 5017-20.

6. Heintz NH, Howard PL. Hemoglobin Southampton (Casper): characterization of the base mutation. *Am J Hematol* 1989; 30(1): 1-3.
7. Eandi SE, Noguera NI, Sciuccati G, Bonduel M, Díaz L, Staciuk R, Feliú-Torres A. Hb Southampton [b106(G8)Leu→Pro, CTG→CCG] in an Argentinean boy. *Hemoglobin* 2006; 30 (3): 401-403
8. Avalos V, Eandi S, Pepe C, Sciuccati G, García N, Cervioa C, Díaz L, Candás A, Bonduela M, Piazza G, Chaves D, Feliú-Torres A. Severe hemolytic anemia due to hemoglobin Southampton. Case report. *Arch Argent Pediatr* 2012; 110 (5): e91-e94
9. Tan AS, Quah T, Low P and Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001; 98: 250-51.
10. Hall GW, Thein S, Newland A, Chisholm M, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kattamis C and Higgs DR. A base substitution (T→C) in codon 29 of the alpha 2-globin gene causes alpha thalassaemia. *Br J Haematol* 1993 85: 546-52.
11. Miranda SRP, Fonseca S, Figueredo M and Yamamoto M. Hb Köln [α 2 β 298(FG5) val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. 1997 *Braz J Genet* 20(4).
12. Williamson D. The unstable haemoglobins. 1993. *Blood Rev* 7(3):146-63.
13. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*, 8th edn. New York: Churchill Livingstone, 1995.

Table I. Hematological data of the Hb Southampton carrier

	1980	1990	2002	2007
Hb (g/dL)	7,5	6,4	9,2	8,5
PCV (%)	20	20	29,3	28,9
RBC ($10^{12}/L$)	2,9	2,16	2,77	2,44
MCV (fL)	68	93	105,7	118,3
MCH (pg)	25	29,6	33,1	34,8
RDW (%)			23,4	22,8
HbA2 (%)		3,5		4
HbF (%)		1,5		

Capítulo 4. Caracterización molecular de las mutaciones de β -talasemias y de los haplotipos de la β -globina en la población uruguaya.

4.1 Introducción

Las β -talasemias son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas de herencia autosómica recesiva y caracterizadas por mutaciones que causan la ausencia (β^0) o reducción (β^+) en la síntesis de la o las cadenas de β -globina. Al igual que las alfa talasemias y algunas variantes estructurales de las hemoglobinas, las β -talasemias alcanzan frecuencias elevadas en las regiones donde la malaria es, o fue, endémica. Hasta el momento hay descritas más de 200 mutaciones de β -talasemias a nivel mundial aunque solamente 20 de estas alcanzan elevadas frecuencia en algunas regiones o poblaciones. En general cada población presenta un espectro único de mutaciones consistiendo de unas pocas muy frecuentes y de un número variable de mutaciones menos frecuentes (Steinberg et al., 2001; Hardison et al., 2002). La mayoría de las mutaciones (> 95%) de β -talasemias son debidas a mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o inserciones mientras que mutaciones debidas a deleciones de mayor tamaño son raras (Wheaterall y Clegg, 2001c; Hardison et al., 2002)

Las mutaciones que producen β -talasemias originalmente se encontraban distribuidas en las poblaciones de la región del Mediterráneo, norte de África, Medio Oriente, India, sur de China y en el sudeste de Asia. Sin embargo las migraciones ocurridas especialmente en los últimos siglos las han distribuido por todo el mundo. Aunque en menor medida debido a su menor frecuencia en poblaciones Africanas Sub-saharianas, el tráfico de esclavos entre los siglos XVII y XIX contribuyó a la dispersión de mutaciones de β -talasemias características de estas poblaciones (Wheaterall y Clegg, 2001b; Colah et al., 2010).

El conocimiento de la distribución y frecuencia de los alelos de β -talasemia que afectan a una población facilita la detección molecular y el correcto asesoramiento genético a las familias, en especial, la distribución de alelos β^0 y β^+ debido a que los alelos β^0 en homocigosis, en general presentan un fenotipo clínico más severo. Adicionalmente la distribución y frecuencia de los

distintos alelos de β -talasemia nos permite inferir el origen geográfico de esta mutación, y así, el de la población.

La frecuencia de portadores de estas mutaciones en las poblaciones europeas mediterráneas varía entre un 0,1% y 19% observándose las mayores frecuencias en las islas de Cerdeña y Chipre (15% a 19%) (Wheaterall and Clegg, 2001b) . En España la frecuencia de portadores es un poco menor a la observada en otros países mediterráneos y varía entre 0,1% y 5,6%, con una frecuencia global de 0,4%. La distribución es heterogénea siendo casi ausente en el País Vasco y alcanza las mayores frecuencias en poblaciones gitanas y en la isla de Mallorca (5,6% y 5% respectivamente) (Villegas et al., 2001; Calvo-Villas et al., 2006). En Italia se ha reportado una frecuencia de portadores de β -talasemias a nivel global del 5%. Sin embargo, se observa un gradiente de sur a norte observándose las mayores frecuencias en el sur y en las islas de Sicilia y Cerdeña (5 a 19%), frecuencias intermedias en el centro de Italia y las menores frecuencia son observadas en el norte de Italia (0,5%) (Angastiniotis et al., 1995; Wheelerall y Clegg, 2001b). En Portugal la frecuencia de portadores a nivel global es de 0,45% observándose las mayores frecuencias en el sur alcanzando al 1,57% y menores frecuencias en el norte (0 a 0,2%) (Martins et al., 1993b).

Hasta hace algunas décadas, 8 mutaciones explicaban más del 90% de los casos de β -talasemia en la región del Mediterráneo: codón 39 (C→T), IVS-I-110 (G→A), IVS-I-6 (T→C), IVS-I-1 (G→A), IVS-II-745 (C→G), IVS-II-1 (G→A), -87 (C→G) y codón 6 (-A) aunque los últimos años ha aumentado la diversidad en los países europeos del Mediterráneo por la inmigración asiática y africana (Cao et al., 1997; Cabeda et al., 1999; Villegas et al., 2001; Pereira et al., 2009) (Figura 1 y Tabla 1).

Figura 1. Ubicación en el gen de la β -globina de las mutaciones de β -talasemias más frecuentes en la región del Mediterráneo. Los rectángulos rojos representan las regiones 5' y 3' no traducidas.

Tabla 1. Distribución y frecuencia de las mutaciones de β -talasemia en poblaciones del Mediterráneo.

	España ¹	Italia ²	Portugal ^{3,4}	Grecia ²	Egipto ²	Túnez ²	Argelia ²	Marruecos ⁵	Líbano ⁶	Israel ²
1. Transcripción										
-88 β^+ (C→T)									0,6	
-87 β^+ (C→G)		1,04		1,12				8,1		
2. Procesamiento del ARN.										
<u>Sitios de splicing</u>										
IVS-I-1 β^0 (G→A)	29,5	4	22	10,1	16,1	1,5	14,7	13,9	15	2,7
IVS-II-1 β^0 (G→A)	0,3	1,5	0,17	1,2	3,4			1,2	8,6	7,1
<u>Sitios consenso</u>										
IVS-I-6 β^+ (T→C)	8,4	7,5	17	7,1	23	10,3	3,1	15,1	14,4	26,2
<u>Sitios críticos (intrones y exones)</u>										
IVS-I-110 β^+ (G→A)	8,1	11,2	10	58,3	39,1	7,4	25,6	2,3	34,2	12
IVS-II-745 β^+ (C→G)	1,7	2,8	0,17	4,7	9,2	7,3		1,2	1,1	0,05
3. Traducción del ARN.										
<u>Mutaciones sin sentido</u>										
Codón 39 β^0 (C→T)	31,2	66,8	33	12,6	1,2	19,1	26,4	16,3	0,2	8,2
<u>Cambio del marco de lectura</u>										
Codón 5 β^0 (-CT)	2,7	0,03		0,35	2,3				5	
Codón 6 β^0 (-A)	0,3	1,9	8	1,71	1,2	16,2	17,8	10,5		
Codón 8 β^0 (-AA)	0,3	0,05		0,65				16,3	2,5	
Codones 8/9 β^0 (+G)	9,4			0,06	1,2				0,2	
Codón 44 β^0 (-C)		0,11							1,5	13,7
Otros	8,1	3,07	12,8	5,29	3,3	38,2	12,5	15,1	16,7	30,0
Cromosomas	308	5940	280	1694	87	68	129	86	520	183

Los superíndices indican las referencias. (1) Villegas y cols, 2001; (2) <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html>; (3) Cabeda y cols, 1999; (4) Faustino et al, 1999 (5) Lemsaddek y cols, 2003; (6) Makhoul y cols, 2004.

En poblaciones de la India, Sudeste Asiático, China y Japon el espectro de mutaciones de β -talasemias es diferente al observado en la región del Mediterráneo. En estas poblaciones, con excepción de Japón, nueve mutaciones explican aproximadamente el 80% de los casos. Estas son: -28 (A→G), codones 8/9 +G, codón 17 (A→T), codón 19 (A→G), IVS-I-1 (G→T), IVS-I-5 (G→C), codones 41/42 (-TTCT), IVS-II-645 (C→T) y la delección de 619pb (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución y frecuencia de las mutaciones de β -talasemia en poblaciones asiáticas.

	India	Pakistán	Tailandia	Malasia	Singapur	Indonesia	China	Japón
1. Transcripción								
-31 β^+ (A→G)								17,2
-28 β^+ (A→G)			6,8	6,4			12,3	0,4
2. Procesamiento del ARN								
<u>Sitios de <i>splicing</i></u>								
IVS-I-1 β^+ (G→T)	12,9	5,4	2,8	5,9	0,6	10,2	1,6	
IVS-II-1 β^0 (G→A)	0,2	0,8						11,1
<u>Sitios consenso</u>								
IVS-I-5 β^+ (G→C)	34,9	37,7	8,7	26,9	9	54,2	0,1	
<u>Sitios crípticos (intrones y exones)</u>								
Codón 19 β^+ (A→G)			6,6	7,6	0,6		0,4	
IVS-II-654 β^+ (C→T)	0,3		5,1	10,5	25,6	11,2	21,4	14,6
3. Traducción del ARN								
<u>Mutaciones sin sentido</u>								
Codón 17 β^0 (A→T)			18,6	5,3	9	1,7	14,1	0,4
Codon 90 β^0 (G→T)								16,9
<u>Cambio del marco de lectura</u>								
Codones 8/9 β^0 (+G)	15,3	26,2			0,6			0,8
Codón 41/42 β^0 (-TTCT)	9,9	6,8	37,2	26,3	37,6	1,7	41,8	7,3
4. Deleciones								
Delección 619pb β^0	19,9	7,1						
Otros	6	16	14,2	11,1	17	21	8,3	31,3
Cromosomas	1107	1203	819	171	133	59	674	261

Datos obtenidos de <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html>;

En la Tabla 3 se presenta la distribución y frecuencia de mutaciones de β -talasemia en varias poblaciones de América observándose un claro aporte de mutaciones de origen mediterráneo.

Tabla 3. Distribución y frecuencia de las mutaciones de β -talasemia en poblaciones americanas.

	Brasil			Argentina		Venezuela ⁷	Cuba ⁸	Guadalupe ⁹	México ¹⁰	
	Sur ¹	Sudeste ²	Noreste ³	Norte ⁴	Argentina ⁵					Argentina ⁶
1. Transcripción										
-88 β^+ (C→T)						6	2,5	3,1		
-87 β^+ (C→G)					0,7	2,3				
-86 β^+ (C→G)						2,2				
-29 β^+ (C→G)	0,9					5,2	13,4	39,5		
+20 β^+ (C→T)	1,7									
2. Procesamiento del ARN										
<u>Sitios de <i>splicing</i></u>										
IVS-I-1 β^0 (G→A)	12,9	5,7	15,1	38,5	10,7	9,4	11,1	4,9	14,5	
IVS-I(-1) β^0 (G→C)	0,9		1,1		0,7			1,2		
IVS-II-1 β^0 (G→A)					2,5	3,5	3	8,5	14,7	
<u>Sitios consenso</u>										
IVS-I-5 β^0 (G→A)	1,7						3,7	1,2	9,3	
IVS-I-5 β^+ (G→C)			9,3	2,6	0,7			11,6	2,4	
IVS-I-6 β^+ (T→C)	9,5	7,1	62,8	53,8	7,9	5,9	6,6	3,7		
IVS-II-849 (A→G)							6,6	1,2		
<u>Sitios crípticos (intrones y exones)</u>										
IVS-I-110 β^+ (G→A)	18,1	20	8,2	5,1	23,2	22,3	6,6	8,5	14,5	
IVS-II-745 β^+ (C→G)					0,7	2,3	0,7		1,2	
3. Traducción del ARN										
Mutaciones sin sentido										
Codón 15 β^0 (G→A)	2,6						1,2			
Codón 39 β^0 (C→T)	50,9	64,3	3,5		45,7	47	34,1	30,5	31,4	
<u>Cambio del marco de lectura</u>										
Codón 6 β^0 (-A)					2,1	1,2			2,4	
Otros	0,8	2,9			5,1	6,1	14,2	23,2	21,8	
Cromosomas	116	70	86	39	280	85	135	82	129	83

¹ (Reichert et al., 2008), ² (Martins et al., 1993a), ³ (Araujo et al., 2003), ⁴ (da Silveira et al., 2011), ⁵ (Rossetti et al., 2004), ⁶ (Roldan et al., 1997), ⁷ (Bravo-Urquiola et al., 2012), ⁸ (Muniz et al., 2000),

Las diferencias observadas entre las distintas poblaciones pueden deberse a la contribución diferencial de distintas poblaciones mediterráneas a las actuales

poblaciones americanas, el aporte de mutaciones de origen africano y asiático y factores como la deriva génica y/o efectos fundadores. Por ejemplo, en Brasil observamos que la mutación más frecuente en el sur y sudeste es la denominada codón 39 (C→T), la cual también es una de las más frecuentes en España, Italia y Portugal mientras que en el norte y noreste la mutación más frecuente es la denominada IVS-I-6 (T→C) característica de poblaciones del norte de África y de Portugal. Sin embargo en ninguna de estas poblaciones del Viejo Mundo alcanza la frecuencia observada en el norte y noreste de Brasil indicando que las elevadas frecuencias se deben no solo al origen de estas poblaciones sino a posibles efectos micro-evolutivos. El aporte africano se observa en las poblaciones de Venezuela y Guadalupe por medio de la presencia de la mutación -29 (A→G) característica de poblaciones africanas.

4.1.1 Haplotipos del cluster de genes de la β -globina

Los haplotipos del *cluster* de genes de la β -globina se definen a partir de una serie de polimorfismos cuyos loci se agrupan en dos regiones: dentro de un *cluster* de aproximadamente 34Kb 5' del gen de la β -globina (haplotipo 5') y un *cluster* de aproximadamente 19Kb que incluye el gen de la β -globina y la región 3' de este gen (*haplotipo 3' o framework*) (Antonarakis et al., 1985). Los sitios polimórficos que definen cada uno de estos haplotipos se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento pero no se observa desequilibrio entre los dos *cluster* (5' y 3') posiblemente debido a la presencia de un *hot-spot* de recombinación ubicado entre el extremo 5' del gen de la β -globina y el *cluster* 3' (Chakravarti et al., 1984; Schneider et al., 2002).

Los haplotipos 5' se determinan a partir de seis sitios polimórficos de restricción. Ordenados de 5' a 3', estos son: un sitio *HincII* 5' del gen de la globina ϵ , dos sitios *HindIII*, uno en el intrón 2 (IVS-2) del gen de la globina $\epsilon\gamma$ y el otro en el intrón 2 de la globina $\Delta\gamma$, dos sitios *HincII*, uno dentro del pseudogén de la globina β ($\beta\psi$) y el otro en su extremo 3', y un sitio *Hinfl* en el extremo 5' del gen de la β -globina. Aunque originalmente el sitio *Hinfl* ubicado

en el extremo 5' del gen de la β -globina se usaba para determinar el haplotipo 5', este se usa solamente para definir el haplotipo en los cromosomas portando el alelo β^S . El haplotipo 3' está definido también por seis sitios polimórficos, cinco dentro del gen de la β -globina (uno la posición 3 del codón 2 (C/T), y cuatro en el intrón 2 (IVS-2) en las posiciones 16 (C/G), 74 (G/T), 81 (C/T) y 666 (T/C) y uno hacia 3' del gen de la β -globina que determina la presencia-ausencia de un sitio de restricción para la enzima *Hinfl*. Estos polimorfismos del cluster 3' o framework forman cuatro haplotipos diferentes: haplotipo I o A (C C G C T +), haplotipo II o B (C C T C T -), haplotipo III-asiático o C (T G T C C +) y el haplotipo III o D (T G T T C +). Con los sitios polimórficos de restricción para las enzimas *AvaII* (posición 16 C/G) y *Hinfl*, se pueden diferenciar tres haplotipos: el haplotipo I está determinado por la presencia del sitio de corte de las dos enzimas, el haplotipo II no tiene el sitio de corte para *AvaII* pero si para *Hinfl* mientras que podemos diferenciar los haplotipos III y III-asiático del I y el II por la ausencia de corte con la enzima *AvaII* en los dos primeros pero no se puede diferenciar éstos entre sí.

Las mutaciones de β -talasemias son muy heterogéneas pero cada una se encuentra generalmente asociada a un único o a unos pocos haplotipos mostrando el origen cromosómico del cual proceden estas mutaciones. Sin embargo, algunas mutaciones se han observado en varios haplotipos lo cual puede ser explicado por eventos de recombinación, recurrencia de las mutaciones y por el efecto de los dos fenómenos (Antonarakis et al., 1982; Pirastu et al., 1987; Villalobos-Arambula et al., 1997; Piras et al., 2005).

4.1.2 Características genéticas de la población uruguaya

La población uruguaya está formada por el aporte mayoritario de poblaciones de origen europeo y en menor medida, indígenas y africanas. Datos del censo de 2011 indican que aproximadamente el 94% de la población uruguaya reconoce poseer ancestría "blanca" o europea, el 8,1% ancestría africana, el 5,1% ancestría indígena y el 0,5% ancestría asiática. Estos valores

suman más de 100% ya que cada individuo puede tener más de una ancestría. Sin embargo estos porcentajes no son uniformes, observándose los mayores porcentajes de personas que dicen tener ancestría africana en el norte y noreste del país. Por ejemplo, en Artigas y Rivera un 17% de las personas declaran tener ascendencia africana mientras que en Tacuarembó y Salto, el 8% y el 6% de las personas dicen tener ascendencia indígena respectivamente (I.N.E., 2011). Sin embargo, estos datos no necesariamente reflejan la ancestría genética.

A nivel genético, se estimó para la población de Montevideo, un aporte europeo de 92%, africano de 7% e indígena de 1%. En cambio, si se considera la población de Tacuarembó estos aportes son de 65%, 15% y 20% respectivamente (Sans et al., 1997). Otro estudio a nivel de la población general mostró un aporte europeo de 84,1%, africano de 5,36% e indígena de 10,4% (Hidalgo et al., 2005). Los resultados de datos censales como las estimaciones de los aportes poblacionales a nivel genético indican una conformación tri-híbrida de la población uruguaya con un aporte mayoritario de poblaciones de origen europeo y uno minoritario de poblaciones de origen africano e indígena.

La población europea es mayoritariamente proveniente de España, Italia y Portugal de acuerdo a datos históricos y demográficos. La colonización comienza en el siglo XVII con la fundación de Colonia del Sacramento por los Portugueses y en el siglo XVIII continúa fundamentalmente con el aporte de poblaciones españolas. Entre los siglos XIX y principios del siglo XX se da una serie de grandes oleadas inmigratorias de Europa con el aporte de poblaciones españolas, italianas, francesas (vascas) mientras que hay aporte luso-brasileño por la frontera norte del Uruguay (Pi and Vidart, 1969). Datos del censo de 1908 indican que la población de Uruguay era de 861.464 habitantes de los cuales 181.222 eran extranjeros. De estos últimos 62.337 eran italianos, 54.885 españoles, 27789 brasileños, 8341 franceses y 27.850 de otras nacionalidades (Sans, 1994).

Teniendo en cuenta el aporte mayoritario de la población europea al Uruguay y su origen básicamente mediterráneo (España, Italia, Portugal) las β -talasemias podrían alcanzar frecuencias elevadas en nuestro país. Por esta misma razón es esperable que el espectro de mutaciones también sea similar al de los países mencionados, aunque no se puede descartar la presencia de mutaciones de otras regiones de Europa así como de otras poblaciones mediterráneas no-europeas (Líbano, Siria, Israel, Turquía, etc), como tampoco de origen africano sub-sahariano. Mecanismos como la deriva génica, efectos fundadores y/o endogamia también pueden influenciar la distribución y frecuencia de alelos de β -talasemia.

Los únicos datos de Uruguay provienen de nuestro estudio previo realizado con Afro-descendientes. En este caso, se observó que de seis cromosomas con alelos talasémicos, cuatro presentaban la mutación Codón 39 β^0 (C→T), 1 la IVS-I-110 (G→A) y 1 la IVS-I-6 (T→C) que son las más frecuentes en España, Italia y Portugal (Cabeda et al., 1999; Faustino et al., 1999; Villegas et al., 2001; Hardison et al., 2002).

4.1.3 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de las mutaciones de β -talasemias en la población uruguaya, su vinculación con el origen de la misma y con el origen de estas mutaciones.

4.1.3.1 Objetivos específicos

- Determinar a nivel molecular el espectro y las frecuencias de las mutaciones de β -talasemias en la población uruguaya.
- Investigar el origen de estas mutaciones a partir de su frecuencia y de sus haplotipos asociados.
- Comparar la distribución y frecuencias de mutaciones de β -talasemias de nuestra población con otras poblaciones mundiales.

4.2 Muestra y Método

4.2.1 Muestra

Se obtuvo un total de 77 muestras de sangre de individuos con distintas formas de β -talasemia: 72 con β -talasemia menor, 1 con β -talasemia mayor y 4 con HbS/ β -talasemia mayor. De estas muestras 55 corresponden a individuos no relacionados por lo que analizamos 56 cromosomas con mutaciones de β -talasemia y 54 cromosomas sin mutación de β -talasemia. Los cromosomas analizados corresponden a: 52 individuos heterocigotas $\beta^{\text{Tal}}/\beta^{\text{A}}$ (β -talasemia menor), 2 individuos heterocigotos HbS/ β^{Tal} y un individuo homocigoto $\beta^{\text{Tal}}/\beta^{\text{Tal}}$ (β -talasemia mayor).

Las muestras fueron obtenidas de pacientes que se atienden o se atendieron en el Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica del Centro Hospitalario Pereira Rosell, en el Hospital de Clínicas, en el Hospital Regional de Tacuarembó y otros derivados directamente por sus médicos tratantes con el propósito de realizar el diagnóstico molecular. Todos los individuos participantes en este estudio firmaron un consentimiento informado donde se les explicó el alcance de este estudio y acordaron participar en el mismo.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Obtención de la muestra de sangre y extracción de ADN

A todos los individuos que participaron en este estudio se les extrajo 5ml de sangre periférica por punción venosa. A partir de la misma se obtuvo el ADN utilizando protocolos estandarizados de extracción salina y precipitación con etanol absoluto (Sambrook et al., 1989).

4.2.2.2 Determinación de las mutaciones de β -talasemia

Se amplificaron dos segmentos del gen de la β -globina por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores P1, P5, P6 y P7 de acuerdo

a condiciones descritas previamente (Miranda et al., 1997; Kimura et al., 2003). El primer segmento que abarca los exones 1 y 2 más el intrón 1 y la porción 5' del intrón 2 fue amplificado con los cebadores P1 y P5 mientras que el exón 3, la porción 3' del intrón 2 y la porción 5' del 3' UTR fueron amplificados con los cebadores P6 y P7 (ver Figura 2)



Figura 2. Representación del gen de la β -globina y posición de los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.

Los productos de PCR se purificaron con métodos comerciales (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) y luego fueron secuenciados con los mismos cebadores utilizados para la PCR. La secuencia de los cebadores y las condiciones de la PCR se muestran en el anexo 1.

4.2.2.3 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.

Los seis sitios polimórficos que determinan el haplotipo 5' fueron determinados por PCR-RFLP de acuerdo a condiciones descritas previamente (Bevilaqua et al., 1995). Estos son: a) *HincII*, 5' del gen ϵ ; b) *HindIII*, en el intrón dos del gen $\epsilon\gamma$; c) *HindIII*, en el intrón dos del gen $A\gamma$; d) *HincII*, en el pseudogén $\Psi\beta$; e) *HincII*, en la región 3' del pseudogén $\Psi\beta$ y f) *Hinfl* en la región 5' del gen β . Los polimorfismos que determinan el haplotipo 3' fueron determinados a partir de la lectura de los datos de secuenciación del gen de la β -globina. Los polimorfismos analizados fueron: a) codón 2 (C/T), b) IVS-II-16 (C→G), c) IVS-II-74 (G→T) y d) IVS-II-81 (C→T). Los polimorfismos IVS-II-666 (T→C) y el sitio *Hinfl* 3' del gen de la β -globina se encuentra fuera de los dos segmentos amplificados para la secuenciación por lo que no fueron determinados. Sin embargo con los cuatro polimorfismos identificados por la secuenciación podemos determinar los cuatro haplotipos descritos en la mayoría de las

poblaciones: haplotipo I o A (C C G C T +), haplotipo II o B (C C T C T -), haplotipo III-asiático o C (T G T C C +) y el haplotipo III o D (T G T T C +).

4.2.2.4 Análisis genético y estadístico

4.2.2.4.1 Cálculo de frecuencias alélicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Las frecuencias alélicas se calcularon por el método de conteo directo y para testar el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el procedimiento descrito por Guo y Thompson (1992) implementado en el software Arlequín 2005 v.3.1. El desequilibrio de ligamiento se analizó a partir de los datos genotípicos por medio del estadístico S que es el logaritmo del cociente de probabilidades asumiendo que hay equilibrio de ligamiento y que no lo hay. En ambos casos se usó el software Arlequín 2005 v.3.1 (Excoffier et al., 2005).

4.2.2.4.2 Determinación de los haplotipos

Se construyeron haplotipos basados en nueve polimorfismos: los cinco polimorfismos del haplotipo 5' y los cuatro del haplotipo 3'. La asignación de los haplotipos a cada uno de los individuos fue realizada por dos métodos: a) usando el software Arlequín 2005 v.3.1 (Excoffier et al., 2005), el cual estima la fase gamética a partir de una estrategia de muestreo de Gibbs con el algoritmo ELB y b) por un proceso no computarizado asumiendo que las mutaciones de β -talasemias presentes en nuestra muestra se encuentran vinculadas a los mismos haplotipos observados en las poblaciones originales (cuando hay datos) o que la mutación se encuentra vinculada a haplotipos ya descritos con alta frecuencia en las poblaciones fundadoras de la población uruguaya y, en último caso, a haplotipos raros o recombinantes. Cuando se dispuso de datos de familiares de los pacientes y ellos presentaban polimorfismos informativos, éstos fueron usados para la construcción de los haplotipos. Estas estrategias ya fueron usadas previamente (Mattevi et al., 2000; Vivenes De Lugo et al., 2003; Piras et al., 2005). La nomenclatura usada es la de Shimizu et al. (2001), de tal manera que por ejemplo el haplotipo 2 es + - - - - B o + - - - - + - y de la misma manera para los demás.

4.2.2.4.3 Variación intra-poblacional, inter-poblacional y comparación con otras poblaciones

A partir de los datos haplotípicos se calcularon las distancias genéticas F_{ST} en nuestra muestra y en muestras de otras poblaciones usando el software Arlequín 2005 v3.1 (Excoffier et al., 2005). La significancia de los valores de F_{ST} fue estimada por 10000 permutaciones. La relación entre las poblaciones analizadas fue representada en dos dimensiones por medio del análisis de Escalamiento Multidimensional (MDS) incluido en el software SPSS v.15.0. En la Tabla 4 se muestran las poblaciones usadas en las comparaciones.

Tabla 4. Poblaciones con las cuales se comparó la población uruguaya.

Poblaciones	N	Referencias
<u>Mutaciones de β-talasemia</u>		
America		
Brasil Sureste	37	(Martins et al., 1993a)
Brasil Noreste	86	(Araujo et al., 2003)
Brasil Sur	116	(Reichert et al., 2008)
Brasil Norte	39	(da Silveira et al., 2011)
Argentina	268	(Rossetti et al., 2004)
Argentina	81	(Roldan et al., 1997)
México	83	(Perea et al., 2004)
Venezuela*	81	(Bravo-Urquiola et al., 2012)
Cuba	82	(Muniz et al., 2000)
Europa		
España-Alta Extremadura	69	(Pereira et al., 2009)
España-Andalucía Oriental	45	(Pereira et al., 2009)
España-Centro-Sur	133	(Pereira et al., 2009)
Huelva	18	(Pereira et al., 2009)
Barcelona	58	(Pereira et al., 2009)
Mallorca	98	(Pereira et al., 2009)
Valencia	43	(Pereira et al., 2009)
Delta del Ebro	34	(Pereira et al., 2009)
Portugal Norte	172	(Cabeda et al., 1999; Faustino et al., 1999)
Portugal Centro	221	(Faustino et al., 1999)
Portugal Sur	168	(Pereira et al., 2009)
Cerdeña	3000	http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html
Sicilia	1299	http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html
Italia Sur	873	http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html
Italia Centro	52	http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html
Italia Norte	138	http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html
<u>Haplotipos β-talasemias</u>		
América		
México	20	(Villalobos-Arambula et al., 1997)
Europa y Medio Oriente		
Cerdeña**	100	(Pirastu et al., 1987)
Cerdeña**	42	(Piras et al., 2005)
España	58	(Amselem et al., 1988)
Portugal	33	(Gomes et al., 1988)
Calabria	100	(Piras et al., 2005)
Apulia	100	(Piras et al., 2005)
Delta del Po	100	(Piras et al., 2005)
Sicilia	99	(Piras et al., 2005)
Sicilia Este	110	(Piras et al., 2005)
Campania	80	(Piras et al., 2005)
Grecia	424	(Piras et al., 2005)
Corcega**	38	(Falchi et al., 2005)
Bulgaria**	100	(Kalaydjieva et al., 1989)

Chipre**	20	(Old et al., 1984)
Libano	50	(Piras et al., 2005)
<u>Haplotipos β^A</u>		
América		
Afro-Uruguay Norte	40	(Da Luz et al., 2010)
Afro-Uruguay Sur	38	(Da Luz et al., 2010)
Amerindios Colombianos	146	(Shimizu et al., 2001)
Europa y Norte de África		
Sicilia	46	(Shimizu et al., 2001)
Argelia	65	(Shimizu et al., 2001)
Asia		
Camboya	65	(Shimizu et al., 2001)
Tailandia	65	(Shimizu et al., 2001)
Sur de China	211	(Shimizu et al., 2001)
Corea	122	(Shimizu et al., 2001)
Japón	158	(Shimizu et al., 2001)

N. Número de cromosomas. *La misma población fue usada para comparar mutaciones de β -talasemias y de haplotipos ligados a estas mutaciones. **Estas poblaciones fueron usadas para los haplotipos ligados a mutaciones de β -talasemias y ligados al cromosoma normal (β^A)

4.3 Resultados

4.3.1 Determinación de las mutaciones de β -talasemia

En la Tabla 5 se presentan las mutaciones determinadas en los 55 individuos no relacionados correspondientes a 56 cromosomas con mutaciones de β -talasemias.

Se encontraron 9 mutaciones diferentes siendo las más frecuentes la denominada codón 39 (C-T) seguida por la mutación IVS-I-110 (G-A) las cuales explican más del 80% del total. Cinco mutaciones son del tipo β^0 [codón 39 (C-T), codón 6 (-A), codón 48 (-T), IVS-II-1 (G-A) y IVS-I-1 (G-A)] y representan el 73,3% de las mutaciones, mientras que las restantes cuatro son β^+ [IVS-I-110 (G-A), IVS-I-5 (G-A), IVS-I-6 (T-C) y +20 (C-T)].

Tabla 5. Mutaciones de β -talasemia en la muestra de pacientes.

	Codón 39 (C-T)	IVS-I- 110 (G-A)	IVS-I- 5 (G-A)	IVS-I-6 (T-C)	Codón 6 (-A)	+20 (C-T)	IVS- II-1 (G-A)	IVS-I- 1 (G-A)	Codón 48 (-T)	N
$\beta^{\text{Tal}}/\beta^{\text{A}}$	33	10	1	1	1	2	2	1	1	52
HbS/ β^{Tal}	1	1								2
$\beta^{\text{Tal}}/\beta^{\text{Tal}}$	2									2
Total	36	11	1	1	1	2	2	1	1	56
	64,3%	19,6%	1,8%	1,8%	1,8%	3,6%	3,6%	1,8%	1,8%	

N. Número de cromosomas con mutaciones de β -talasemia.

Para comparar el perfil mutacional observado en nuestra muestra calculamos las distancias genéticas de Uruguay con otras poblaciones Latinoamericanas y de Europa Mediterránea a partir de las frecuencias de mutaciones de β -talasemia. En la Tabla 6 se muestran las distancias genéticas F_{ST} y en la Figura 3 se las representa en un espacio bidimensional por un proceso de escalamiento multidimensional (MDS).

Tabla 6. Distancias genéticas F_{ST} (x1000) a partir de las frecuencias de mutaciones de β -talasemias.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1	0																										
2	-14	0																									
3	401	380	0																								
4	16	3,8	288	0																							
5	417	399	44	281	0																						
6	20	10	281	-0,4	280	0																					
7	11	3,2	305	-3,6	301	-6,6	0																				
8	84	83	261	42	232	43	37	0																			
9	70	66	235	28	214	38	32	9,2	0																		
10	103	106	260	70	249	72	65	20	12	0																	
11	305	294	339	190	226	189	203	136	152	198	0																
12	97	82	237	29	202	22	24	9,4	25	46	106	0															
13	145	130	189	67	134	75	76	25	29	55	66	13	0														
14	255	240	300	131	193	147	155	102	95	151	3,6	84	29	0													
15	14	1,7	332	16	353	32	27	89	56	100	294	102	121	215	0												
16	43	48	340	41	343	29	26	49	59	73	247	57	109	212	61	0											
17	69	61	246	31	243	40	40	48	26	59	212	58	61	131	24	34	0										
18	614	655	594	502	645	470	518	442	438	443	589	516	435	692	595	510	515	0									
19	126	123	227	75	201	72	73	49	52	77	141	48	54	109	107	45	22	428	0								
20	136	114	120	61	114	75	79	76	50	89	159	53	44	94	87	124	46	437	73	0							
21	105	86	259	35	207	47	50	49	41	93	74	25	22	17	87	103	57	486	70	56	0						
22	440	455	869	551	884	535	588	701	665	708	833	747	732	804	440	626	641	910	705	683	650	0					
23	60	48	188	21	198	15	14	33	30	53	169	9,1	50	136	54	45	39	406	60	45	56	436	0				
24	52	42	204	15	206	9,9	8,2	24	22	44	156	4,5	43	123	50	39	34	408	54	48	45	470	0,8	0			
25	22	25	309	13	305	15	5,8	32	20	47	219	46	72	155	19	23	15	522	55	80	62	582	25	18	0		
26	14	5,4	286	1,6	292	0,8	-5,2	41	32	60	221	33	80	169	19	28	34	487	78	75	62	554	14	10	8,6	0	

1. Uruguay; 2. Brasil Sureste; 3. Brasil Noreste; 4. Brasil Sur; 5. Brasil Norte; 6. Argentina1; 7. Argentina2; 8. México; 9. Venezuela; 10. Cuba; 11. Alta Extremadura; 12. Andalucía Oriental; 13. Centro Sur España; 14. Huelva; 15. Barcelona; 16. Mallorca; 17. Valencia; 18. Delta del Ebro; 19. Norte Portugal; 20. Centro Portugal; 21. Sur Portugal; 22. Cerdeña; 23. Sicilia; 24. Sur Italia; 25. Centro Italia; 26. Norte Italia.

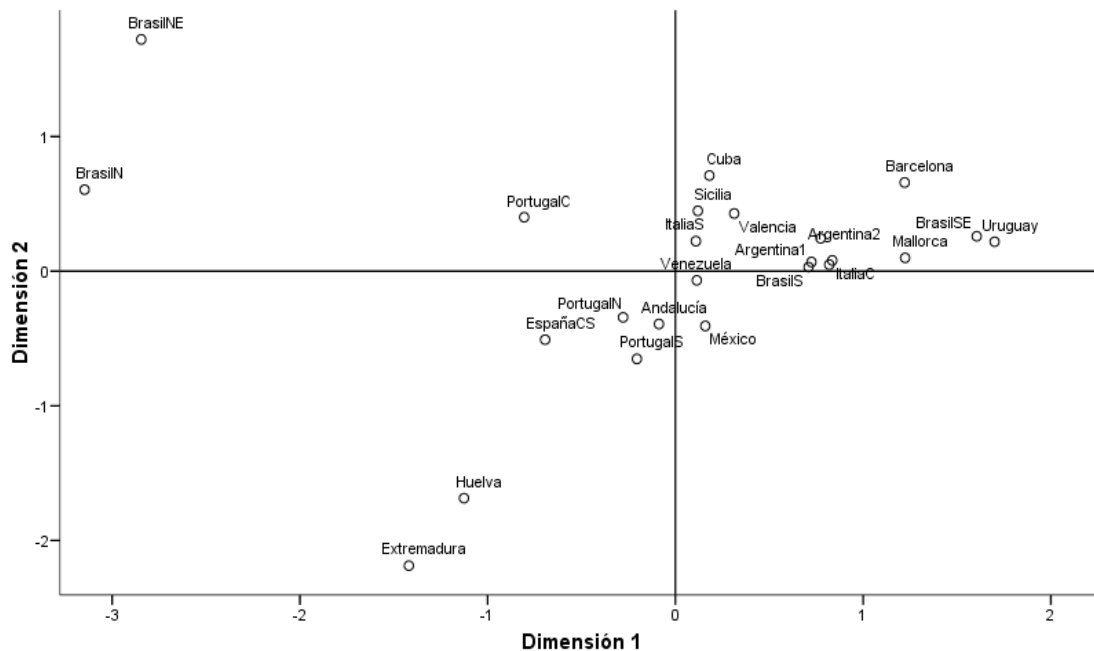


Figura 3. Escalamiento multidimensional (MDS) basado en las distancias genéticas (F_{ST}). Stress: 0,12657 RSQ: 0,95391

Se observan algunos valores negativos de F_{ST} lo cual puede ser explicado por las diferencias en los tamaños de muestra de cada población y la presencia de alelos de baja frecuencia.

Las dos mutaciones más frecuentes en Uruguay: codón 39 (C→T) e IVS-I-110 (G→A) también son las más frecuentes en las poblaciones de Italia y España, los dos países que aportaron el mayor flujo de pobladores en la historia del Uruguay. En Italia, España y Portugal las dos mutaciones antes mencionadas mas la mutación IVS-I-1 (G→A) también identificada en nuestra muestra, explican aproximadamente el 70% de todas las mutaciones de β -talasemia. La mutación codón 39 es la más frecuente en los tres países (64%, 39% y 33% respectivamente), pero mientras que en Italia la segunda más frecuente es la IVS-I-110 (G→A) (11,21%) en España y Portugal es la IVS-I-1 (G→A) (26% y 12,8% respectivamente) (Hardison et al., 1998; Patrinos et al., 2004; Pereira et al., 2009). De todas maneras estos valores son a nivel global en estos países observándose heterogeneidad en el perfil mutacional cuando se observa a nivel de regiones. En la Tabla 7 se presentan la distribución de mutaciones por región en Italia, España y Portugal, observándose la heterogeneidad antes mencionada.

El perfil de mutaciones observado en Uruguay es más similar al observado en las poblaciones italianas donde la mutación codón 39 (C→T) es la más frecuente seguida por la IVS-I-110 (G→A). Dentro de las poblaciones italianas es más similar a las del Centro y Norte de Italia por la mayor frecuencia de las mutación codón 39 (C→T) y la menor frecuencia de las mutaciones IVS-I-6 (T→C) y codón 6 (-A). Con la población de Barcelona (España) también se observa un perfil mutacional similar al observado en nuestra muestra, aunque en Barcelona se observan frecuencias elevadas de la mutación IVS-I-6 (T→C). Cuando observamos las distancias genéticas y el gráfico de MDS, las poblaciones europeas que presentan las menores distancias con Uruguay son las mencionadas anteriormente (Centro y Norte de Italia y Barcelona) y se agrupan en el cuadrante superior del gráfico de MDS. En ese

cuadrante se encuentran también las poblaciones españolas de Valencia y Mallorca.

Tabla 7. Distribución regional de mutaciones de β -talasemias en Italia, España y Portugal.

	Codón 39 (C→T)	IVS-I-110 (G→A)	IVS-I-1 (G→A)	IVS-I-6 (T→C)	Codón 6 (- A)
Uruguay	64,3	19,6	1,8	1,8	1,8
Italia ¹					
Sur de Italia	36,9	22,2	10,4	12,7	1,5
Centro de Italia	48,1	11,5	5,8	3,9	7,7
Norte de Italia	49,3	21,0	5,8	9,4	1,5
Sicilia	35,5	23,6	8,2	16,0	1,2
Cerdeña	95,7	0,5	0,0	0,1	2,2
España ^{2,3}					
Huelva	33,3	0,0	55,5	11,2	0,0
Barcelona	64,0	8,5	3,5	15,5	5,0
Andalucía	31,1	26,7	22,3	8,8	0,0
Valencia	44,2	4,7	9,3	16,3	18,6
Suroeste de España	25,6	9,0	30,1	12,8	0,7
Portugal ^{4,5}					
Sur de Portugal	41,7	10,7	33,9	10,1	0,0
Centro de Portugal	30,8	7,2	17,2	29,9	0,0
Norte de Portugal	27,3	12,8	17,4	8,1	26,7

¹ <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/I-d.html> ² (Villegas et al., 2001) ³ (Pereira et al., 2009) ⁴ (Cabeda et al., 1999) ⁵ (Faustino et al., 1999) ^a Toledo, Extremadura, Huelva. En negrita se marcan las dos mutaciones más frecuentes.

La diferencia más importante observada con las poblaciones españolas y portuguesas es la elevada frecuencia de la mutación IVS-I-1 (G→A) en estas poblaciones, comparada a lo observado en nuestra muestra (1,8%). En las poblaciones portuguesas además se observa una frecuencia importante de la mutación IVS-I-6 (T→C), denominada la mutación portuguesa. En el norte de Portugal es de destacar también una frecuencia importante de la mutación codón 6 (-A).

Aunque en las poblaciones de África sub-sahariana la frecuencia de β -talasemia no es tan elevada como lo observado en el Mediterráneo existen mutaciones específicas de estas poblaciones. Las que se presentan la mayor frecuencia son mutaciones de tipo β^+ ubicadas en el promotor: -88 (C→T) y -29 (A→G) las cuales no fueron encontradas en nuestra muestra (Gonzalez-Redondo et al., 1988; Wheaterall y Clegg, 2001b).

Respecto a las poblaciones sudamericanas se observan las menores distancias con poblaciones de Argentina y Sur de Brasil mientras que las

mayores distancias son observadas con las poblaciones del Norte y Noreste de Brasil así como con Cuba y Venezuela. En la Tabla 8 se presenta la distribución de mutaciones en algunos países de América.

Tabla 8. Distribución regional de mutaciones de β -talasemias en poblaciones de América.

	Codon 39 (C→T)	IVS-I-110 (G→A)	IVS-I-1 (G→A)	IVS-I-6 (T→C)	IVS-II-1 (G→A)	-88 (C→T)	-29 (A→G)
Uruguay	64,3	19,6	1,8	1,8	1,8		
Brasil							
Sur de Brasil ¹	50,9	18,1	0,0	9,5	12,9		
Sudeste de Brasil ²	64,3	20,0	5,7	7,1	0,0		
Noreste de Brasil ³	3,5	8,2	15,1	62,8	0,0		
Norte de Brasil ⁴	0,0	6,5	48,4	41,9			
Argentina							
Argentina 1997 ⁵	47,0	23,2	9,4	5,9	3,5		
Argentina 2004 ⁶	45,7	23,2	10,4	7,9	2,5		
México ^{7,8}	31,4	14,5	14,5	0,0	1,2		
Venezuela ⁹	34,1	6,6	11,1	6,6	3,0	6,0	5,2
Cuba ¹⁰	30,5	8,5	4,9	3,7	8,5	2,4	13,4

¹Reichert et al. (2008); ²Martins et al. (1993a); ³Araujo et al. (2003); ⁴da Silveira et al. (2011); ⁵Roldan et al. (1997); ⁶Rossetti et al. 2004; ⁷Villalobos-Arambula et al. (1997); ⁸Perea et al. (2004); ⁹Bravo-Urquiola et al. (2012); ¹⁰Muñiz et al. (2000)

La primera dimensión del escalamiento multidimensional separa a la mayoría de las poblaciones de la Península Ibérica (Portugal y España), del Norte y Noreste de Brasil, Venezuela y México de las poblaciones italianas, Sur de Sudamérica (Argentina, Sur y Sureste de Brasil y Uruguay). Las excepciones son las poblaciones españolas de Barcelona, Mallorca y Valencia. La segunda dimensión separa a las poblaciones del Sur de Italia y Cerdeña del resto de las poblaciones. La población del Uruguay se encuentra en un cluster con las poblaciones del Sur y Sudeste de Brasil, Argentina, Barcelona, Mallorca, Valencia y las poblaciones del Centro y Norte de Italia. El agrupamiento de la mayoría de las poblaciones alrededor del centro del gráfico indica poca diferenciación entre las mismas.

4.3.2 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.

En la Tabla 9 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de los 10 polimorfismos analizados. Uno de los 55 individuos con mutaciones de β -talasemias, que presentaba la mutación IVS-I-6 no pudo ser analizado debido a la baja concentración de la muestra.

Tres de los sitios analizados no se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg: ϵ -HincII, γ^G -HindIII y 3'Ψβ-HincII. En los tres casos se observó un exceso significativo de heterocigotos en detrimento de los dos homocigotos. En estos tres sitios los individuos heterocigotos fueron re-genotipados para confirmar los resultados y descartar la presencia de digestión parcial en la primera ronda de genotipado confirmándose los resultados obtenidos.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en la muestra de pacientes con β-talasemia (β-Tal/β-Tal, HbS/β-Tal y β-Tal/β-A)

Sitio polimórfico	N	Genotipo	Frecuencias genotípicas	Frecuencias alélicas	Equilibrio de Hardy-Weinberg <i>P</i>
ϵ -HincII	54	+/+	8 (0,148)	+	0,00583
		+/-	38 (0,704)		
		-/-	8 (0,148)	-	
γ^G -HindIII	54	+/+	5 (0,093)	+	0,02398
		+/-	35 (0,648)		
		-/-	14 (0,259)	-	
γ^A -HindIII	54	+/+	4 (0,074)	+	0,36858
		+/-	27 (0,500)		
		-/-	23 (0,426)	-	
5'Ψβ-HincII	54	+/+	0 (0,000)	+	1,0000
		+/-	12 (0,222)		
		-/-	42 (0,778)	-	
3'Ψβ-HincII	54	+/+	3 (0,056)	+	0,00492
		+/-	35 (0,648)		
		-/-	16 (0,296)	-	
5'β-Hinfl	54	+/+	45 (0,833)	+	0,30092
		+/-	8 (0,148)		
		-/-	1 (0,019)	-	
β-Codon 2	54	CC	41 (0,759)	C	1,00000
		CT	13 (0,241)		
		TT	0 (0,000)	T	
β-IVS-II-16	54	CC	41 (0,759)	C	1,00000
		CG	13 (0,241)		
		GG	0 (0,000)	T	
β-IVS-II-74	54	GG	23 (0,426)	G	0,76003
		GT	26 (0,481)		
		TT	5 (0,091)	T	
β-IVS-II-81	54	CC	44 (0,815)	C	1,00000
		CT	10 (0,185)		
		TT	0 (0,000)	T	

4.3.3 Desequilibrio de ligamiento

Se consideró como hipótesis nula que los 10 sitios polimórficos analizados se encuentran en equilibrio de ligamiento, estableciéndose un nivel de significancia de $p \geq 0,05$, rechazándose la hipótesis de equilibrio si la p es menor a 0,05. En la Tabla 10 se presentan los resultados.

Tabla 10. Equilibrio de ligamiento a partir de los datos genotípicos.

	ϵ - <i>HincII</i>	γ^G - <i>HindIII</i>	γ^A - <i>HindIII</i>	5' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	3' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	5' β - <i>Hinfl</i>	Codón 2	IVS-II- 16	IVS-II- 74	IVS-II- 81
ϵ - <i>HincII</i>		+	+	+	+	-	-	-	-	-
γ^G - <i>HindIII</i>	+		+	-	+	-	-	-	-	-
γ^A - <i>HindIII</i>	+	+		-	+	-	-	-	-	-
5' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	+	-	-		-	-	-	-	-	-
3' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	+	+	+	-		-	-	-	-	-
5' β - <i>Hinfl</i>	-	-	-	-	-		+	+	-	-
Codón 2	-	-	-	-	-	+		+	+	+
IVS-II-16	-	-	-	-	-	+	+		+	+
IVS-II-74	-	-	-	-	-	-	+	+		+
IVS-II-81	-	-	-	-	-	-	+	+	+	

+ Probabilidad de equilibrio de ligamiento menor a 0,05. - Probabilidad de equilibrio de ligamiento mayor a 0,05

Las probabilidades de equilibrio de ligamiento observada en la Tabla 8 muestran dos bloques de disequilibrio: a) desde el polimorfismos en el gen ϵ hasta el sitio en la región 3' del pseudogén β y b) desde el polimorfismo en el codón 2 hasta el polimorfismo IVS-II-81 en el intrón 2. Los polimorfismos se encuentran en disequilibrio de ligamiento dentro de cada uno de los bloques pero en equilibrio entre los bloques.

4.3.4 Haplotipos

Para la construcción de los haplotipos se excluyó el polimorfismo 5' β -*Hinfl* el cual es raramente usado para la construcción de los haplotipos. Aunque los haplotipos fueron construidos a partir de los 9 polimorfismos en la Tabla 11

se muestra por separado el sub-haplotipo 5' y el sub-haplotipo 3' construidos por los dos métodos.

La frecuencia de los haplotipos en los cromosomas con y sin mutaciones de β -talasemias difiere significativamente entre sí tanto cuando los construimos usando el software Arlequín o cuando usamos el método manual. También difieren entre sí cuando comparamos los dos métodos entre sí. Sin embargo las frecuencias de los haplotipos totales (con y sin mutaciones) construidos con los dos métodos no difieren significativamente entre sí. En la Tabla 12 se presentan los resultados del test de diferenciación poblacional con el cual se compararon las frecuencias de los haplotipos.

Tabla 11. Haplotipos ligados a los cromosomas con y sin mutación de β -talasemia y construidos por dos métodos.

Sub-haplotipo 5'		Sub-haplotipo 3'					Arlequín			Manual							
							No β -tal	β -tal	Todos	No β -tal	β -tal	Todos					
1	+	-	-	-	-	A	C	C	G	C	22	8	30	6	28	34	
2						B	C	C	T	C	17	1	18	7	5	12	
3						C	T	G	T	C	1	1	2	1		1	
3*						D	T	G	T	T				3		3	
5	-	+	-	+	+	A	C	C	G	C		4	4	2		2	
6						B	C	C	T	C				2		2	
7*						D	T	G	T	T		2	2	2		2	
8	-	+	+	-	+	A	C	C	G	C	1	18	19		20	20	
9						B	C	C	T	C					1	1	
10						D	T	G	T	T		5	5	3		3	
11	-	+	-	-	+	A	C	C	G	C	1	1	2	1		1	
12						B	C	C	T	C		1	1	2		2	
13						D	T	G	T	T		1	1	1		1	
15	-	-	-	-	+	A	C	C	G	C	1	1	2	2		2	
18	-	-	-	+	+	A	C	C	G	C	2		2	2		2	
22						B	C	C	T	C	1	1	2	2		2	
23						D	T	G	T	T		1	1	1		1	
24	-	+	-	-	-	A	C	C	G	C	1		1	1		1	
26	-	+	+	-	-	A	C	C	G	C	1	2	3	1		1	
27	-	+	+	-	-	B	C	C	T	C				2		2	
37	+	-	-	-	+	A	C	C	G	C		1	1				
43	+	+	-	-	-	A	C	C	G	C	3		3	2		2	
44						D	T	G	T	T				1		1	
48	+	-	+	-	-	A	C	C	G	C	1		1	1		1	
49	-	+	+	+	-	A	C	C	G	C		1	1	1		1	
50						B	C	C	T	C	1		1	1		1	
51	-	+	-	+	-	A	C	C	G	C		1	1	1		1	
54	+	-	-	-	+	B	C	C	T	C				1		1	
56	-	-	+	-	+	A	C	C	G	C		2	2	2		2	
57						C	T	G	T	C		1	1	1		1	
58	-	-	+	-	-	A	C	C	G	C		2	2	1	1	2	
Total												53	55	108	53	55	108

Los haplotipos 1, 2 y 8 son los más frecuentes por los dos métodos de construcción, encontrándose el resto de los haplotipos a baja frecuencia, lo cual es compatible con lo observado en poblaciones Europeas del Mediterráneo.

Tabla 12. Comparación entre las frecuencias de haplotipos ligados y no ligados a las mutaciones de β -talasemias.

	β -Tal Arlequín	β -Tal Manual	β -no Tal Arlequín	β -no Tal Manual	Todos Arlequín
β -Tal Arlequín		<i>0,0014</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0000</i>	
β -Tal Manual	<i>0,0014</i>		<i>0,0000</i>	<i>0,0000</i>	
β -no Tal Arlequín	<i>0,0000</i>	<i>0,0000</i>		<i>0,0035</i>	
β -no Tal anual	<i>0,0000</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0035</i>		
Todos Manual					0,8888

En cursiva y negrita se muestran las diferencias significativas.

4.3.4.1 Haplotipos ligados a mutaciones de β -talasemias.

Los dos métodos empleados para la construcción de haplotipos dieron resultados similares siendo los haplotipos 1 y 8 los más frecuentes. Por el método Arlequín los haplotipos más frecuentes son el 8, 1 y 10 en ese orden mientras que con el método manual el orden es 1, 8 y 2.

En la Tabla 13 y 14 se presentan los haplotipos ligados a las mutaciones particulares por los dos métodos de construcción: por los métodos Arlequín y el manual respectivamente.

Con el método de Arlequín, la mutación Codón 39 (C-T) se encuentra asociada a 12 diferentes haplotipos. El haplotipo 8 es el más frecuentemente asociado a esta mutación seguido por el haplotipo 10, mientras el resto de los haplotipos se encuentran en bajo número. La otra mutación frecuente es la IVS-I-110 que esta asociada a cuatro haplotipos diferentes aunque mayoritariamente al haplotipo 1. Los otros haplotipos asociados a esta mutación en nuestra población son el 5, 7 y 51.

Tabla 13. Haplotipos ligados a las mutaciones de beta talasemia en la población uruguaya construidos con Arlequín.

Haplotipos	Codón 39 (C-T)	IVS-I- 110 (G-A)	IVS-I- 5 (G-A)	Cod ón 6 (-A)	+20 (C-T)	IVS-II- 1 (G-A)	IVS-I- 1 (G-A)	Codón 48 (-T)
1 (+-----++)	2	6						
2 (+-----+-)	1							
3 (+-----+)					1			
5(-+-++++)	1	2						1
7(-+-++-+)		2						
8(-+++---)	18							
10(-+++--+)	4					1		
11(-+---++)	1							
12(-+---+-)				1				
13(-+---++)					1			
15(-----++)	1							
18(-----++)								
22(-----+-)				1				
23(-----+)						1		
26(-+++---)	2							
27(-+++---)								
37(+-----++)	1							
43(+++---++)								
48(+--+---++)								
49(-++++-++)	1							
50(-++++-+-)								
50(--+---+-)								
51(-+--+---)		1						
56(--+---++)	2							
57(-++++-+-)								1
58(-++++-+-)	2							
Total	36	11	1	1	2	2	1	1

Tabla 14. Haplotipos ligados a las mutaciones de beta talasemia en la población uruguaya construidos con el método manual.

Haplotipos	Codón 39 (C-T)	IVS- I- 110 (G-A)	IVS-I- 5 (G-A)	Codón 6 (-A)	+20 (C-T)	IVS- II-1 (G-A)	IVS-I- 1 (G-A)	Codón 48 (-T)
1 (+-----++)	15	10			2			1
2 (+-----+-)		1	1	1		1	1	
3 (+-----+)								
5(-+-++++)								
7(-+-++-+)								
8(-+++---)	20							
9(-+++---)						1		
10(-+++--+)								
57(-++++-+-)								
58(-++++-+-)	1							
Total	36	11	1	1	2	2	1	1

Con el método manual observamos una menor diversidad de haplotipos que lo observado con el método Arlequín, observándose a las mutaciones en solo cinco diferentes haplotipos (1, 2, 8, 9 y 58). Solamente las mutaciones codón 39 (C-T) e IVS-I-110 (G→A) se observaron asociadas a más de un haplotipo. Al igual que lo observado con el método Arlequín, los haplotipos mas frecuentemente asociados a las mutaciones codón 39 (C-T) e IVS-I-110 (G→A) son el 8 y el 1 respectivamente.

4.3.4.2 Comparación con otras poblaciones.

Con el propósito de explorar el origen de las mutaciones de β -talasemia presentes en nuestra muestra y la relación con otras poblaciones, calculamos las distancias genéticas (F_{ST}) entre varias poblaciones de América y de la región del Mediterráneo a partir de las frecuencias de los haplotipos ligados a las mutaciones de β -talasemia. Debido a que la mayoría de los datos de haplotipos disponibles en la literatura no especifican la mutación a la que se encuentran ligados los haplotipos y solo se presenta la frecuencia, usamos las frecuencias de los haplotipos ligados a mutaciones de β -talasemia sin tener cuenta la mutación particular.

En la Tabla 15 se presentan las distancias genéticas a partir de las frecuencias haplotípicas calculadas con el método Arlequín y el método manual. Por el método de Arlequín la población uruguaya presenta las menores distancias con España, Campania (Sur de Italia), México, Cerdeña y Este de Sicilia en este orden. Con el método manual las menores distancias son con México, Grecia, Delta del Po (Noroeste de Italia) y España. Por los dos métodos observamos las mayores distancias con las poblaciones de Chipre, Bulgaria y Córcega.

Tabla 15. Distancias genéticas (x1000) a partir de las frecuencias de haplotipos ligados a mutaciones de β -talasemias

	Uruguay ^a	Uruguay ^b	Cerdeña ¹	Cerdeña ²	España ³	Portugal ⁴	Calabria ²	Apulia ²	Delta del Po ²	Libano ²	Chipre ⁵	Bulgaria ⁶	Grecia ²	Sicilia ²	Este de Sicilia ²	Corcega ⁷	Campania ²	Venezuela ⁸	
Cerdeña ¹	77,27	123,79	0																
Cerdeña ²	36,27	54,25	13,04	0															
España ³	23,54	31,56	46,26	11,58	0														
Portugal ⁴	58,64	73,23	130,38	81,04	63,04	0													
Calabria ²	131,36	62,68	253,64	158,23	98,94	124,91	0												
Apulia ²	45,8	58,92	123,81	57,31	22,83	46,37	48,75	0											
D. del Po ²	89,46	30,91	152,41	78,26	62,54	131,68	64,66	77,67	0										
Libano ²	148,4	46,2	266,83	162,66	109,22	177,49	12,51	89,48	47,26	0									
Chipre ⁵	327,72	207,22	463,2	384,16	300,95	383,42	93,84	237,28	186,32	58,16	0								
Bulgaria ⁶	108	75,51	228,86	143,88	107,72	104,72	55,92	83,18	92,25	67,33	168,44	0							
Grecia ²	97,92	23,21	182,39	104,15	64,86	78,54	7,08	41,68	40,33	14,21	106,91	41,52	0						
Sicilia ²	75,49	59,22	185,04	91,9	55,57	92,9	11,9	12,39	59,36	41,51	159,86	58,22	18,35	0					
E. Sicilia ²	60,17	33,79	147,61	70,79	28,54	56,4	17,62	1,64	57,36	45,89	172,69	53,78	12,06	-0,39	0				
Córcega ⁷	159,39	267,07	39,44	90,13	157,04	237,47	375,59	211,64	288,24	424,74	668,82	333,42	289,67	285,33	248,92	0			
Campania ²	29,73	56	132,5	56,21	33,99	39,97	42,28	1,18	55,84	78,69	225,74	58,7	29,62	6,98	3,49	224,5	0		
Venezuela ⁸	57,02	56,84	192,28	101,36	63,73	64,41	25,87	28,72	71,19	49,51	173,74	39,65	16,99	16,41	13,58	295,64	13,39	0	
Mexico ⁹	36,98	5,55	136,74	47,27	21,08	55,29	39,56	25,41	31,49	33,27	231,82	42,1	6,38	26,11	10,49	294,78	14,8	6,74	

^aDistancias calculadas a partir de haplotipos construidos con Arlequín. ^bDistancias calculadas a partir de haplotipos construidos por el método manual

¹Pirastu et al (1987), ²Piras et al (2005), ³Amselem et al (1988), ⁴Gomes et al (1988), ⁵Old et al (1984), ⁶Kalaydjieva et al (1989), ⁷Falchi et al (2005), ⁸Bravo-Urquiola et al (2012), ⁹Villalobos-Arambula et al (1997)

En la Figura 4a y 4b se grafican las distancias en un espacio bidimensional por la técnica de escalamiento multidimensional (MDS). En la Figura 4a observamos el MDS realizado a partir de las distancias calculadas con Arlequín. La primera dimensión separa a las poblaciones del Este del Mediterráneo (Chipre, Grecia, Líbano), Bulgaria y poblaciones americanas exceptuando a Uruguay, de poblaciones del oeste del Mediterráneo (España, Portugal y la mayoría de las poblaciones italianas). La segunda dimensión separa a las poblaciones de América, Portugal, Bulgaria y algunas poblaciones italianas del resto de las poblaciones analizadas.

En la Figura 4b se observa el MDS realizado a partir de las distancias calculadas por el método manual. En este gráfico aunque el perfil es similar al obtenido con los haplotipos calculados por Arlequín observamos una mayor concentración de las poblaciones cerca del centro del gráfico lo que indica una menor diferenciación entre ellas. A diferencia de lo observado en la Figura 4a en este caso la segunda dimensión separa a Uruguay del resto de las poblaciones de América analizadas.

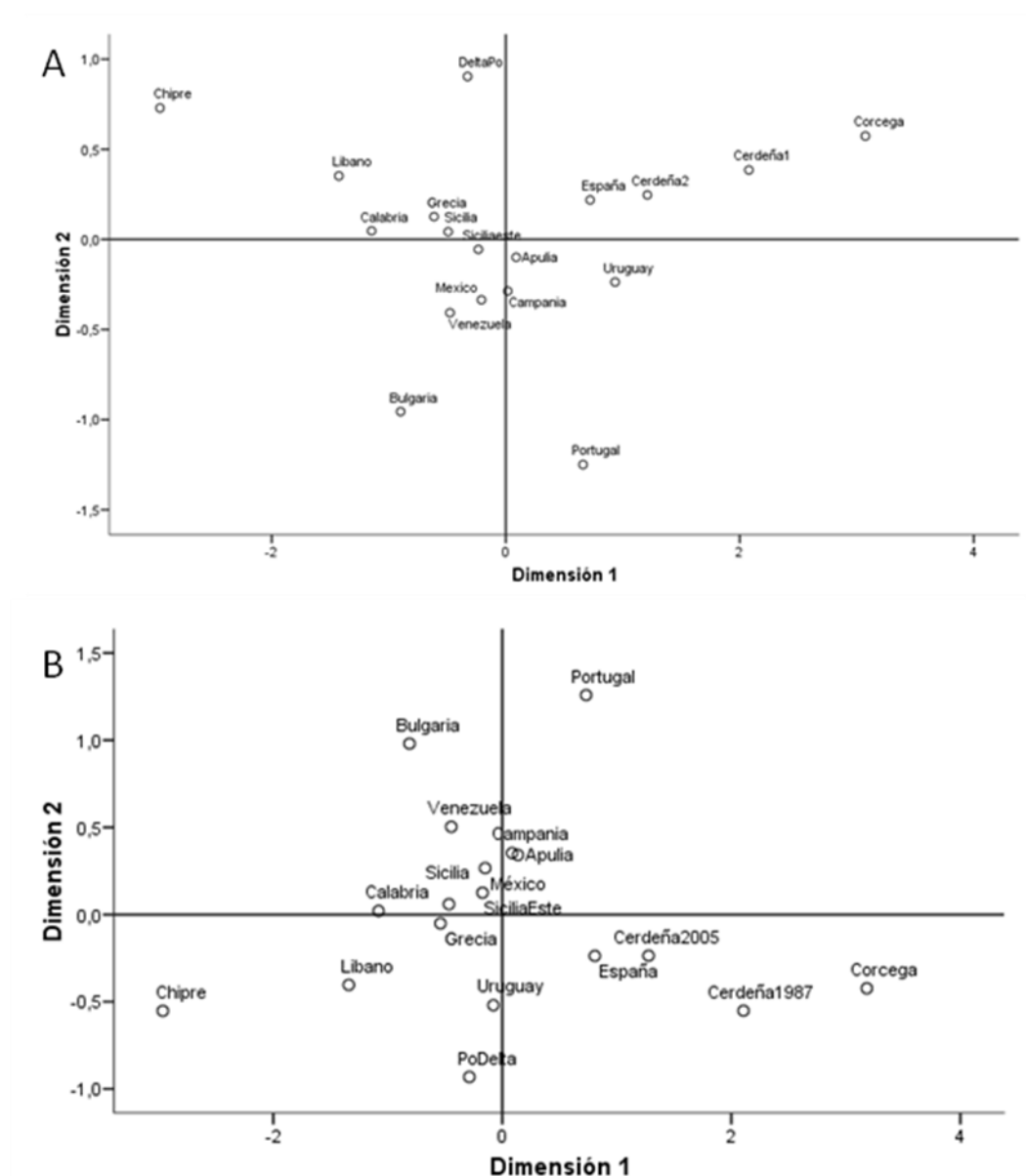


Figura 4. Escalamiento Multidimensional (MDS) a partir de las distancias F_{ST} . A. MDS a partir de las distancias obtenidas a partir de los haplotipos calculados con el software Arlequín. Stress: 0,07363. RSQ: 0,9815. B. MDS a partir de las distancias obtenidas a partir de los haplotipos calculados con el método manual. Stress: 0,05266. RSQ: 0,99038.

4.3.4.3 Haplotipos ligados a cromosomas sin mutación.

En la Tabla 11 se presentaron los haplotipos ligados a los cromosomas sin mutaciones de β -talasemias. A partir de las frecuencias de estos haplotipos se calcularon las distancias genéticas con varias poblaciones de América, África, Europa y Asia. En la Tabla 16 se presentan las distancias genéticas a partir de las frecuencias haplotípicas calculadas con el método Arlequín y el método manual.

Tabla 16. Distancias genéticas (x1000) a partir de las frecuencias de haplotipos ligados a cromosomas sin mutaciones de β -talasemias

	Uruguay ^a	Uruguay ^b	Cerdeña ¹	Cerdeña ²	Bulgaria ³	Chipre ⁴	Sicilia ⁴	Corcega ⁵	Afro- Uruguay Norte ⁶	Afro- Uruguay Sur ⁶	Argelia ⁴	Camboya ⁴	Tailandia ⁴	Sur de China ⁴	Corea ⁴	Japón ⁴	México ⁷	
Cerdeña ¹	39,03	25,15	0															
Cerdeña ²	26,42	38,01	10,62	0														
Bulgaria ³	31,27	43,83	2,01	-4,69	0													
Chipre ⁴	66,93	100,01	34,33	23,25	4,56	0												
Sicilia ⁴	70,19	66,13	20,93	2,32	5,81	36,92	0											
Corcega ⁵	66,48	49,2	35,32	6,15	27,65	75,78	12,29	0										
Afro-Uruguay Norte ⁶	83,3	17,21	8,03	23,48	21,85	55,39	22,61	27,76	0									
Afro-Uruguay	81,43	24,51	68,4	63,69	80,44	127,19	111,64	82,77	67,83	0								
Argelia ⁴	30,02	66,88	20,76	-8,98	-3,27	7,19	8,26	29,15	39,29	92,9	0							
Camboya ⁴	137,49	66,76	79,29	121,11	104,11	179,21	130,91	125,54	101,69	117,07	155,39	0						
Tailandia ⁴	74,06	113,4	121,55	130,84	145,26	217,26	198,33	164,8	189,62	111,5	156,59	118,56	0					
Sur de China ⁴	92,23	54,7	48,25	87,08	68,89	134,62	94,07	95,56	75,7	104,5	113,72	-0,11	98,55	0				
Corea ⁴	104,13	49,66	43,09	79,99	63,97	126,42	76,92	84,47	59,63	102,01	107,8	0,2	121,94	-1,23	0			
Japón ⁴	137,32	64,78	71,76	115,49	93,93	161,94	113,56	115,28	85,5	120,9	145,91	-4,97	141,32	3,38	-1,37	0		
México ⁷	70,82	4,64	11,08	27,58	19,76	59,23	33,65	40,55	-1,82	49,2	46,19	63,43	145,79	48,56	36,15	52,55	0	
Amerindios Colombia ⁴	148,85	178,7	94,74	135,87	88,04	116,3	105,47	130,12	124,88	253,82	129,49	159,2	292,65	106,28	105,46	126,84	121,14	

^aDistancias calculadas a partir de haplotipos contruidos con Arlequín. ^bDistancias calculadas a partir de haplotipos contruidos por el método manual

¹Pirastu et al (1987), ²Piras et al (2005), ³Kalaydjieva et al (1989), ⁴Shimizu et al (2001), ⁵Falchi et al (2005), ⁶Da Luz et al (2010), ⁷Villalobos-Arambula et al (1997)

Por el método de Arlequín la población uruguaya presenta las menores distancias con poblaciones de Cerdeña, Argelia y Bulgaria. Con el método manual las menores distancias son con México, las dos poblaciones Afro-Uruguayas y las dos poblaciones de Cerdeña. Por los dos métodos observamos las mayores distancias con las poblaciones asiáticas, Chipre y Amerindios de Colombia.

En la Figura 5A y 5B se grafican las distancias en un espacio bidimensional por la técnica de escalamiento multidimensional (MDS). En la Figura 5A se observa el MDS realizado a partir de las distancias calculadas con Arlequín. La primera dimensión separa a las poblaciones asiáticas, la población uruguaya de este trabajo y Afro-Uruguayos del Norte del resto de las poblaciones. La segunda dimensión separa a las poblaciones asiáticas (Japón, Corea, Sur de China y Camboya) y Amerindios de Colombia del resto de las poblaciones. En la Figura 5B observamos el MDS realizado a partir de las distancias calculadas por el método manual y el patrón observado es similar al observado con las distancias calculadas con Arlequín. En ambos gráficos la población de Uruguay de este estudio se encuentra en el mismo cuadrante con las poblaciones de Tailandia y la de Afro-Uruguayos del Sur pero más cercano al eje central donde se ubican la mayoría de las poblaciones europeas y americanas.

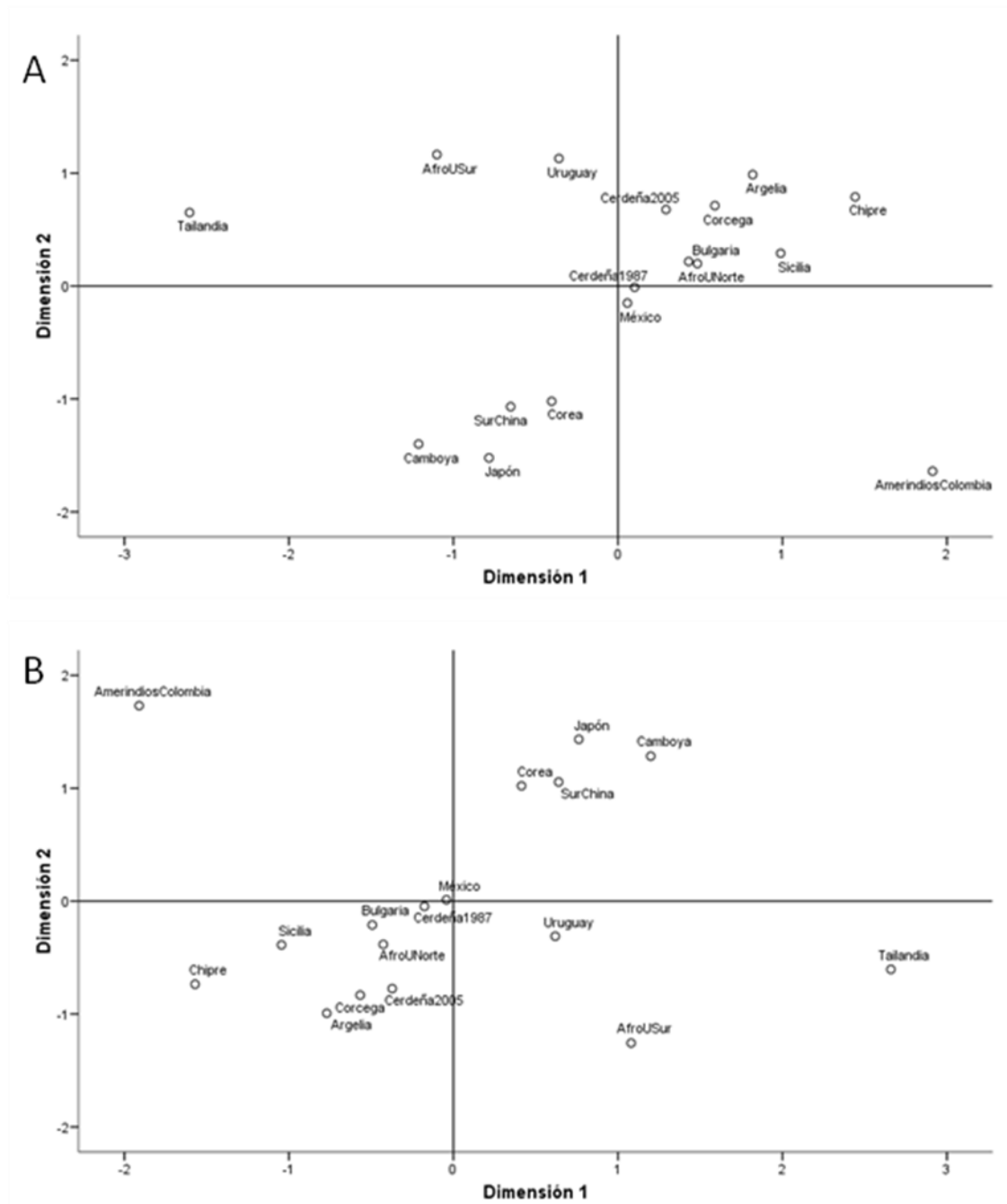


Figura 5. Escalamiento Multidimensional (MDS) a partir de las distancias F_{ST} . A. MDS a partir de las distancias obtenidas a partir de los haplotipos calculados con el software Arlequín. Stress: 0,11024. RSQ: 0,95070. B. MDS a partir de las distancias obtenidas a partir de los haplotipos calculados con el método manual. Stress: 0,09365. RSQ: 0,96183

4.4 Discusión

En este trabajo hemos determinado por primera vez en la población del Uruguay el perfil de mutaciones de β -talasemias en una muestra de individuos heterocigotos para alguna de estas mutaciones, heterocigotos compuestos (β tal/HbS) y un homocigoto (β tal/ β tal).

4.4.1 Mutaciones de β -talasemia

Los datos presentados indican que en la población uruguaya se encuentran como mínimo 9 mutaciones diferentes de β -talasemias. De las 9 mutaciones caracterizadas, 8 ya habían sido previamente reportadas en el área del Mediterráneo (Amselem et al., 1988; Faustino et al., 1999; Rigoli et al., 2001; Villegas et al., 2001; Pereira et al., 2009). Una de las mutaciones, codón 48 (-T), fue descrita por primera vez a nivel mundial a partir de nuestro estudio (Da Luz et al., 2012) (ver Apéndice 1). Aunque los individuos que presentaban esta mutación eran uruguayos que presentaban ancestros con origen en el sur de Italia, región con una elevada frecuencia de β -talasemias (Rigoli et al., 2001; Weatherall, 2001), no podemos descartar que esta mutación haya surgido como una mutación *de novo* en alguno de los ancestros de esta familia.

El hecho que de las 9 mutaciones encontradas, las denominadas codón 39 (C→T) y IVS-I-110 (A→G) representan el 83,9% de todas las mutaciones (64,3% y 19,6% respectivamente), está en consonancia con la historia de la población del Uruguay, ya que estas mutaciones son frecuentes en los países europeos del Mediterráneo que mas han contribuído a la actual población uruguaya (España, Italia, Portugal) (Amselem et al., 1988; Faustino et al., 1999; Hardison et al., 2001; Villegas et al., 2001; Weatherall, 2001; Hardison et al., 2002).

4.4.1.1 Distancias genéticas y comparación con otras poblaciones

Respecto a las poblaciones europeas, las menores distancias son observadas con el Centro y Norte de Italia y con algunas poblaciones españolas (Mallorca, Valencia y Barcelona) lo que está de acuerdo con los datos históricos,

debido a que el mayor aporte de poblaciones de origen europeo provino de España e Italia (Pi and Vidart, 1969).

Aunque poblaciones españolas y portuguesas han contribuido a la actual población uruguaya se observan distancias genéticas elevadas con estas poblaciones lo cual es debido a la baja frecuencia observada en el Uruguay de las mutaciones IVS-I-1 (G→A) e IVS-I-6 (T→C) las cuales son la segunda y tercera mutación más frecuentes en estos países (Faustino et al., 1999; Villegas et al., 2001; Pereira et al., 2009). Respecto a la mutación IVS-I-6 (T→C), la baja frecuencia observada en nuestra muestra puede deberse al sub-diagnóstico de los individuos portadores de esta mutación ya que presenta un fenotipo clínico leve (Efremov et al., 1994). También puede deberse a un sesgo de la muestra ya que la misma se obtuvo mayoritariamente en la ciudad de Montevideo, la región norte del Uruguay puede estar sub-representada en nuestra muestra. La región norte del Uruguay presenta el mayor aporte de poblaciones de origen portugués, las cuales de acuerdo a Hardison et al. (2001; 2002) presentan una frecuencia elevada de la mutación antes mencionada. Es más, a esta mutación se la denomina como la mutación portuguesa (Hardison et al., 2001). Por último, no podemos descartar que las frecuencias observadas en nuestra población se deban a factores micro-evolutivos como efectos fundadores o deriva génica. Por ejemplo esto se observa en las poblaciones del Norte y Noreste de Brasil donde la frecuencia de esta mutación son mayores a las observadas en las poblaciones de donde proviene esta mutación (ver Tabla 8) (Araujo et al., 2003; da Silveira et al., 2011).

Respecto a la mutación IVS-I-1 (G→A) las bajas frecuencias observadas no pueden ser explicadas por sub-diagnóstico ya que esta es una mutación β^0 (Hardison et al., 2001; Hardison et al., 2002) ni tampoco por sesgo en la muestra ya que esta es la segunda mutación más frecuente en España (Villegas et al., 2001). Sí puede explicarse por deriva génica o efectos fundadores pues al igual que la mutación IVS-I-6 (T→C) en las poblaciones del Norte y Noreste de Brasil (Araujo et al., 2003; da Silveira et al., 2011), esta mutación alcanza frecuencias

mayores a las observadas en las poblaciones ancestrales que dan origen a la uruguaya (Tabla 8). Adicionalmente, aunque esta mutación es la segunda más frecuente en España, se observa una heterogeneidad regional en su frecuencia, observándose las frecuencias más bajas en las poblaciones de Barcelona, Valencia y Mallorca (Pereira et al., 2009) por lo que la baja frecuencia observada en nuestra muestra puede parcialmente explicarse por una contribución diferencial de estas poblaciones al Uruguay.

Respecto a las poblaciones de América, las menores distancias genéticas y el perfil mutacional observado es similar a las poblaciones limítrofes del Uruguay (Argentina y sur y sudeste de Brasil) (Tabla 8) lo cual es esperado pues son poblaciones que han recibido un aporte importante de poblaciones de origen español, italiano y portugués (Pi and Vidart, 1969; Carvalho-Silva et al., 2001; Marrero et al., 2005). La principal diferencia observada con estas poblaciones se debe a las mutaciones IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-1 (G→A), que con la excepción del sur de Brasil, presentan frecuencias mayores al 5% en todas estas regiones (Martins et al., 1993a; Roldan et al., 1997; Rossetti et al., 2004). El hecho de que poblaciones limítrofes del Uruguay, con una historia similar, presenten frecuencias diferentes de las mutaciones antes mencionadas refuerza la idea de que las frecuencias observadas en el Uruguay puedan ser explicadas por factores micro-evolutivos.

En relación a las otras poblaciones de América analizadas en este trabajo además de las diferencias observadas en las frecuencias de las mutaciones IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-1 (G→A) es de destacar la ausencia de mutaciones de origen africano como la -88 (C→T) y -29 (A→G) observadas a frecuencias mayores al 5% en Venezuela y Cuba (Muniz et al., 2000; Bravo-Urquiola et al., 2012). Esto puede ser explicado por la baja frecuencia de estas mutaciones en las poblaciones africanas y que el aporte de estas a la población uruguaya es menor que el de poblaciones europeas. Datos del censo 2011 indican que aproximadamente el 94% de la población uruguaya presenta ascendencia *blanca*, el 8,1% ascendencia Africana, el 5,1% ascendencia Indígena y el 0,5% ascendencia Asiática.

(I.N.E., 2011). A nivel genético se ha estimado un aporte africano del 5,36% en la población general del Uruguay (Hidalgo et al., 2005), aunque se puede observar una heterogeneidad geográfica observándose en Montevideo un aporte africano del 7% mientras que en la población de Tacuarembó (noreste del Uruguay) ese aporte sube hasta 15% (Sans et al., 1997).

Adicionalmente, las β -talasemias debidas a estas dos mutaciones pueden estar sub-diagnosticadas ya que presentan un fenotipo clínico leve y en las cuales los homocigotas presentan anemia microcítica moderada sin necesidad de transfusiones en la mayoría de los casos (Gonzalez-Redondo et al., 1988).

Como era esperable, la representación de las distancias genéticas en dos dimensiones por un escalamiento multidimensional (MDS) (ver Figura 3) muestra a Uruguay en un cluster con las poblaciones de Argentina, del Sur y Sudeste de Brasil, Barcelona, Mallorca, Valencia, norte y centro de Italia. Adicionalmente observamos que la primera dimensión del MDS separa las poblaciones antes mencionadas y a las poblaciones italianas de las otras poblaciones de la Península Ibérica y de América. Aunque la posición de la mayoría de las poblaciones alrededor del centro del gráfico indica poca diferenciación entre ellas, la ubicación de Uruguay en un *cluster* junto a las poblaciones antes mencionadas sugiere que el origen de las mutaciones de β -talasemia observadas en el Uruguay es principalmente España e Italia. Sin embargo, el agrupamiento solamente con algunas poblaciones españolas e italianas muestra que el perfil de mutaciones observado en el Uruguay presenta cierta heterogeneidad respecto a estas poblaciones posiblemente debido a aportes diferenciales de distintas regiones de estos países (centro y norte de Italia, Barcelona, Valencia, Mallorca) así como el efecto de factores micro-evolutivos como deriva génica y/o efectos fundadores. Por ejemplo, respecto a la mutación codón 39 (C→T), sólo las poblaciones de Cerdeña (95,7%) y Barcelona (64%) presentan frecuencias similares o mayores a las observadas en Uruguay (64,3%) (Hardison et al., 2002; Pereira et al., 2009). Esto también ocurre en las poblaciones del Norte y Noreste de Brasil donde la mutación IVS-I-6

(T→C) presenta frecuencias mayores a las observadas en las poblaciones de España y Portugal de donde es originaria esta mutación (Faustino et al., 1999; Araujo et al., 2003; Pereira et al., 2009; da Silveira et al., 2011).

En suma, el perfil de mutaciones observado en el Uruguay y las distancias genéticas observadas sugieren un origen claramente Mediterráneo de las mutaciones de β -talasemias observadas en nuestra población con una contribución aparentemente más importante del Centro y Norte de Italia aunque no se pueden descartar factores micro-evolutivos o sesgos en la muestra analizada.

4.4.2 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.

De los 10 polimorfismos analizados, 3 no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (ϵ -*HincII*, γ^G -*HindIII* y 3- $\Psi\beta$ -*HincII*) y se encuentran en el cluster 5'. Esto es esperado ya que presentan mayor variabilidad entre poblaciones que los polimorfismos del cluster 3' (Fullerton et al., 1994; Harding et al., 1997). Adicionalmente, el mestizaje puede alterar el equilibrio de Hardy-Weinberg cuando las poblaciones originales presentan diferentes frecuencias alélicas. La presencia del sitio de corte para el polimorfismo ϵ -*HincII* presenta frecuencias mayores al 60% en poblaciones europeas e indígenas mientras que en poblaciones africanas no alcanza el 10%. Para el sitio γ^G -*HindIII* la presencia del sitio de corte para la enzima es mayor en poblaciones africanas y europeas respecto a poblaciones indígenas mientras que para el sitio 3- $\Psi\beta$ -*HincII* las poblaciones africanas tienen frecuencias mayores al 80% y las poblaciones europeas e indígenas frecuencias menores al 40% (Chen et al., 1990; Long et al., 1990; Mattevi et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Callegari-Jacques et al., 2007).

4.4.3 Equilibrio de ligamiento

Los datos genotípicos de la muestra analizada muestran dos bloques de desequilibrio de ligamiento a cada lado del *hot-spot* de recombinación, el *cluster* 5' y el *cluster* 3' ubicado, ubicados a cada lado de los genes de la δ y β -globina lo

cual ya había sido previamente observado en otras poblaciones (Chakravarti et al., 1984; Schneider et al., 2002). En el *cluster* 5' los tres sitios que no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg son los que presentan mayor número de sitios en desequilibrio de ligamiento posiblemente debido a procesos de mestizaje que aumentan el desequilibrio de ligamiento (Pritchard y Przeworski, 2001). Todos los sitios en el *cluster* 3' se encuentran en desequilibrio de ligamiento, lo cual es esperable debido a la poca distancia entre ellos y al reciente origen de las mutaciones de hemoglobinopatías (Curat et al., 2002; Ghansah et al., 2012; Hughey et al., 2012).

Este patrón donde los sitios dentro de cada *cluster* se encuentran en desequilibrio mientras que los dos *clusters* se encuentran en equilibrio ya se ha observado en otras poblaciones e incluso se ha observado que el desequilibrio puede en ocasiones extenderse a través de los dos clusters. Por ejemplo, en cromosomas con mutaciones de hemoglobinopatías estructurales como la HbS y HbC se observa una homogeneidad haplotípica que se extiende 1,5Mb y 650Kb respectivamente alrededor del hot-spot de recombinación (Curat et al., 2002; Webster et al., 2003; Wood et al., 2005; Ghansah et al., 2012). Por esta razón y porque la mayoría de los estudios de haplotipos en cromosomas con mutaciones de β -talasemia usan los polimorfismos de ambos *clusters* para la construcción de los haplotipos, en este trabajo usamos polimorfismos a ambos lados del *hot-spot* de recombinación para construir los haplotipos (Pirastu et al., 1987; Villalobos-Arambula et al., 1997; Perea et al., 2004; Piras et al., 2005; Bravo-Urquiola et al., 2012).

4.4.4 Haplotipos

Los haplotipos ligados a los cromosomas con y sin mutaciones difieren significativamente entre sí. Estas diferencias se deben tanto a la presencia de haplotipos distintos en ambos tipos de cromosomas como a diferencias en la frecuencia de los haplotipos compartidos.

A pesar de las diferencias observadas, los haplotipos 1, 2, 5, 8 y 10 son los más frecuentes identificados en los cromosomas asociados (65% y 96% por el

método Arlequín y manual respectivamente) y no asociados a mutaciones de β -talasemias (77% y 34% por el método Arlequín y manual respectivamente). Estos resultados indican un origen europeo mediterráneo de estos cromosomas ya que estos son los más frecuentes observados en poblaciones de estas regiones (Pirastu et al., 1987; Shimizu et al., 2001; Falchi et al., 2005; Piras et al., 2005). Además, aunque se detectaron haplotipos característicos de poblaciones africanas (11 y 15) éstos se encuentran en nuestra muestra a baja frecuencia (<5%) y principalmente en los cromosomas sin mutaciones de β -talasemias (Chen et al., 1990; Long et al., 1990; Mattevi et al., 2000).

4.4.4.1 Comparación entre los métodos de construcción de los haplotipos

Aunque observamos diferencias entre los dos métodos usados para la construcción de los haplotipos, con ambos observamos que la mayoría de las mutaciones se encuentran asociadas a los haplotipos 1 y 8 característico de poblaciones mediterráneas. Ambos métodos han sido usados en distintos trabajos acerca de los haplotipos asociados a la β -globina (Long et al., 1990; Mattevi et al., 2000; Vivenes De Lugo et al., 2003; Piras et al., 2005). El método manual puede subestimar el número de haplotipos ya que asume como más probable la presencia de haplotipos comunes o típicos mientras que el método Arlequín puede sobreestimar los haplotipos presentes. En realidad, el haplotipo 15 asociado a la mutación codón 39 (C→T) por el método Arlequín es el haplotipo llamado Benín el cual es característico de los cromosomas con la mutación HbS. Este haplotipo fue identificado en un individuo con HbS/ β -talasemia, por lo que es más probable que el haplotipo 15 esté asociado al cromosoma con la mutación HbS y no al cromosoma que presenta la mutación de β -talasemia mientras que el cromosoma con la mutación de β -talasemia llevaría el haplotipo 1 característico de poblaciones europeas y frecuentemente asociado a estas mutaciones (Pagnier et al., 1984; Kulozik et al., 1986; Trabuchet et al., 1991).

4.4.4.2 Haplotipos ligados a cromosomas con mutaciones de β -talasemia

La mayoría de las mutaciones de β -talasemia se encuentran asociadas a los haplotipos 1 y 8 tal como se ha observado en cromosomas con mutaciones de β -talasemia en otras poblaciones del Mediterráneo (España, Italia, Portugal, Grecia, Chipre, Líbano) y de América (México y Venezuela) (Amselem et al., 1988; Villalobos-Arambula et al., 1997; Cabeda et al., 1999; Latini et al., 2003; Perea et al., 2004; Falchi et al., 2005; Piras et al., 2005; Bravo-Urquiola et al., 2012).

Generalmente las mutaciones de β -talasemias se encuentra asociadas a uno o unos pocos haplotipos reflejando el contexto cromosómico donde surgieron. La mutación codón 39 (C→T) es la que se ha encontrado asociada a más haplotipos, identificándose en cinco haplotipos (1, 5, 8, 11 y 26) en la población de Cerdeña cuando se analizan los cinco polimorfismos del cluster 5' usados en este trabajo y los sitios *Avall* e *HinfII* del cluster 3' (Pirastu et al., 1987; Piras et al., 2005). Estos mismos 5 haplotipos también fueron encontrados en nuestra muestra. En el trabajo de Pirastu et al. (1987) sobre la población de Cerdeña, cuando se agregan otros marcadores ubicados en los *clusters* 5' y 3' los haplotipos aumentan a 9. De los cuatro haplotipos adicionales, 2 son debidos a polimorfismos en los genes de las γ -globinas en el *cluster* 5', los cuales no fueron analizados en este trabajo. Los otros 2 son debidos a polimorfismos en el *cluster* 3', uno de los haplotipos por un sitio de restricción *RsaI* 3' del gen de la β -globina (no analizado) aquí y otro por un polimorfismo en la posición 3 del codón 2 de la β -globina (C/T) analizado en este trabajo. Este haplotipo (+ - - - T - +) no fue encontrado en nuestra muestra, aunque si fueron identificados 4 cromosomas con el sub-haplotipo 3' (T - +) pero con una diferente configuración en el cluster 5' (- + + - + T - +) y fueron clasificados como haplotipo 10.

La mutación codón 39 (C→T) se encuentra entre los dos primeros sitios del sub-haplotipo 3', el polimorfismo del codón 2 (C/T) y el polimorfismo de restricción para la enzima *Avall*. Entonces la presencia de la mutación codón 39

en el haplotipo 10 en nuestra muestra puede ser explicada por recombinación entre cromosomas con la mutación y el sub-haplotipo 3' (T - +) y cromosomas con el sub-haplotipo 5' 8 (- + - + +) teniendo en cuenta que el *hot-spot* de recombinación se encuentra entre los dos haplotipos (Chakravarti et al., 1984; Schneider et al., 2002). Debido a la escasa distancia entre los dos polimorfismos (300pb) y que el haplotipo 8 es muy frecuente en los cromosomas con esta mutación no podemos descartar eventos de conversión génica, por medio de la cual un fragmento de ADN se copia de un cromosoma a otro, quedando sin cambios el cromosoma donante. Eventos de conversión génica ya han sido descritos en los genes de las globinas humanas (Shen et al., 1981; Zhang et al., 2008; Song et al., 2011).

Los restantes haplotipos asociados a esta mutación son el 2, 15, 37, 49, 56 y 58, los cuales hasta el momento no habían sido reportados asociados a la mutación codón 39 (C→T). El elevado número de haplotipos observados en nuestra muestra se debe en parte a la diversidad previa existente asociada a esta mutación en las poblaciones originales. También la recombinación puede haber aumentado la diversidad en nuestra población teniendo en cuenta que la mayor diversidad se encuentra en el cluster 5' y que la mayor parte de los cromosomas con esta mutación presentan el sub-haplotipo 3' o *framework* + + (28 de 35) el cual es el más frecuentemente asociado a esta mutación en las poblaciones del Mediterráneo (Pirastu et al., 1987; Amselem et al., 1988; Kalaydjieva et al., 1989; Piras et al., 2005).

La otra mutación frecuente observada es la IVS-I-110 (G→A) y se encuentra asociada a cuatro haplotipos diferentes (1, 5, 7 y 51). Al igual que lo observado en los países del Mediterráneo esta mutación se encuentra fundamentalmente asociada al haplotipo 1 (54,5%) seguida por el haplotipo 5 y 7 (18,2%). (Amselem et al., 1988; Diaz-Chico et al., 1988; Kalaydjieva et al., 1989; Falchi et al., 2005). También se ha encontrado asociada al haplotipo 5 a menor frecuencia en Turquía pero no asociada a los haplotipos 7 y 51 que identificamos en Uruguay (Diaz-Chico et al., 1988). La presencia de haplotipos

atípicos asociados a esta mutación pueden ser explicados por recombinación cuando presentan el mismo sub-haplotipo 3' que las poblaciones originales (haplotipo 51) o por conversión génica cuando presentan sub-haplotipos 3' distintos (haplotipo 7) (Chakravarti et al., 1984; Song et al., 2011).

Respecto a las otras mutaciones encontradas en la muestra hay pocos datos acerca de los haplotipos asociados a ella. Las mutaciones + 20 (C→T) y IVS-II-1 (G→A) se observaron en dos casos cada una. Aunque presentan sub-haplotipos 5' diferentes, el sub-haplotipo 3' es el mismo para cada una de ellas (- +) lo cual podría estar indicando que estas mutaciones surgieron en este haplotipo. Sin embargo, para la mutación IVS-II-1 (G→A), este sub-haplotipo (- +) ha sido observado solamente en poblaciones kurdas de Irán (Rahimi et al., 2009) mientras que en el resto de las poblaciones se ha encontrado asociado básicamente al sub-haplotipo 3' (+ -) (Diaz-Chico et al., 1988). El origen básicamente Mediterráneo de la población del Uruguay hacen poco probable, aunque no puede descartarse, que esta mutación tenga un origen kurdo en nuestro país (Pi y Vidart, 1969). La presencia de este sub-haplotipo asociado a esta mutación podría ser explicado por recombinación o conversión génica.

Por el método manual de construcción de los haplotipos observamos una menor diversidad en el número de haplotipos asociados a las mutaciones de β -talasemia. Sin embargo esta disminución se debe a una reducción del número de haplotipos raros o poco frecuentes y se mantienen el haplotipo 1 y 8 como los más frecuentes asociados a las mutaciones, lo cual genera un patrón haplotípico mas característico de poblaciones europeas mediterráneas (Pirastu et al., 1987; Piras et al., 2005)

4.4.4.3 Distancias genéticas

Las menores distancias genéticas observadas por ambos métodos son con algunas poblaciones de Italia, España y México mientras que las mayores son observadas con las poblaciones de Chipre y Córcega. Las elevadas distancias con estas dos poblaciones puede ser debido al bajo número de haplotipos asociados con las mutaciones de β -talasemia (3 en Chipre y 4 en Córcega)

comparado a lo observado en Uruguay donde identificamos 20 haplotipos distintos con el método Arlequín y 5 con el método manual (Old et al., 1984; Falchi et al., 2005).

La representación de las distancias genéticas en dos dimensiones por el MDS muestra a la población de Uruguay en una posición intermedia entre algunas poblaciones de Italia y España reflejando posiblemente el origen en ambas poblaciones de los cromosomas analizados. La diferencia más importante en ambos gráficos es que con las distancias calculadas a partir del método manual, la población de Uruguay se ubica más al centro del gráfico posiblemente a la menor diversidad haplotípica observada con este método. Al igual que con las distancias calculadas a partir de las frecuencias de las mutaciones, por los métodos usados la población del Uruguay presenta las menores distancias con algunas poblaciones italianas y España, lo cual puede ser consecuencia de que estas poblaciones son las que han contribuido en mayor proporción a la población uruguaya actual. La colonización del actual territorio del Uruguay comienza en el siglo XVI por portugueses y españoles y a mitad del siglo XIX comienzan las oleadas inmigratorias que continúan hasta mediados del siglo XX. Estos inmigrantes eran mayoritariamente italianos y españoles aunque hubo un aporte menor de otras poblaciones como luso-brasileños y vascos franceses. El aporte de otras poblaciones europeas y no europeas (Próximo Oriente, norte de Africa), aunque existió, fue menor comparado al de las poblaciones mencionadas (Pi y Vidart, 1969; Sans, 1994; Sans et al., 1997).

4.4.4.4 Haplotipos ligados a cromosomas sin mutaciones de β -talasemia

Por ambos métodos de construcción de los haplotipos, el 1 y el 2 son los más frecuentes representando el 73,6% y el 24,5% del total por los métodos Arlequín y manual respectivamente. Estos dos haplotipos son característicos de poblaciones europeas (Antonarakis et al., 1985; Pirastu et al., 1987; Chen et al., 1990; Long et al., 1990; Latini et al., 2003). Aunque mayoritariamente se observan haplotipos europeos también se encuentran presentes haplotipos

característicos de poblaciones de origen africano a baja frecuencia como el 5, 11 y el 15. Por el método Arlequín estos haplotipos son el 3,8% de la muestra mientras que por el método manual son el 9,4% de la muestra. Estos datos muestran nuevamente el carácter de población “mezclada”, trihíbrida, del Uruguay ya determinado en estudios previos (Sans, 1994; Sans et al., 1997; Bertoni et al., 2005; Gascue et al., 2005; Da Luz et al., 2010).

4.4.4.5 Distancias genéticas

Aunque no pudimos analizar las mismas poblaciones en los cromosomas con y sin mutaciones de β -talasemias y a la existencia de diferencias significativas entre estos cromosomas, en ambos casos observamos una mayor relación con poblaciones europeas mediterráneas indicando que los individuos que portan estas mutaciones presentan un origen mediterráneo.

Las diferencias significativas observadas entre cromosomas con y sin mutaciones no es un fenómeno raro ya que esto ha sido observado en poblaciones europeas. En la población de Cerdeña, el orden de frecuencia de los haplotipos asociados a cromosomas sin mutación es: 1, 8, 2, 6, 5, 3 mientras que en los cromosomas con mutación este orden es: 8, 1, 3, 6 y 5 (Pirastu et al., 1987; Piras et al., 2005). En nuestra muestra los haplotipos asociados a cromosomas sin mutación por el método Arlequín tienen el siguiente orden de frecuencia: 1, 2 y 18 y con el método manual: 2, 1, 3 y 10. Los haplotipos asociados a mutaciones de β -talasemia presentan el siguiente orden de frecuencia por el método Arlequín: 8, 1, 10 y 5 mientras que por el método manual el orden es: 1, 8 y 2. A diferencia de lo observado en la población de Cerdeña el haplotipo 8 en nuestra muestra se encuentra casi exclusivamente asociado a los cromosomas con mutación pero se comparten los haplotipos 1, 2 y 3. Al igual que lo observado en Cerdeña y en otras poblaciones europeas, los haplotipos 1 y 8 son los más frecuentes asociados a mutaciones de β -talasemias (Amselem et al., 1988). Aunque la población uruguaya analizada en este trabajo en general comparte los mismos haplotipos observados en poblaciones europeas, el orden de frecuencias de estos no es igual mostrando que procesos como el mestizaje,

deriva génica y el aporte diferencial de poblaciones europeas han influido en la composición haplotípica y mutacional actual de la población uruguaya.

4.5 Conclusiones

El perfil de mutaciones de β -talasemias determinadas en el Uruguay muestra un origen claramente europeo mediterráneo determinado por la elevada frecuencia de las mutaciones Codón 39 (C→T) e IVS-I-110 (G→A).

El perfil de mutaciones observado es similar al observado en Argentina y el sur y sudeste del Brasil, regiones limítrofes del Uruguay, reflejando un aporte poblacional similar. La distribución de haplotipos asociados a cromosomas con y sin mutaciones de β -talasemias sugiere un origen europeo de la mayoría de los cromosomas portando estas mutaciones. El perfil de mutaciones y las distancias genéticas sugieren que el origen de las mutaciones de β -talasemias es principalmente de España e Italia aunque no podemos descartar de otras poblaciones europeas como Portugal.

La baja frecuencia de mutaciones características de las poblaciones ancestrales y presentes en la región como la IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-1 (G→A) indican que factores micro-evolutivos como deriva génica y/o efectos fundadores han contribuido al actual perfil de mutaciones de β -talasemias presentes en nuestra población.

La ausencia de mutaciones de origen africano posiblemente refleje el menor aporte de estas poblaciones a la población uruguaya. También puede deberse al sub-diagnóstico ya que son mutaciones que presentan un fenotipo clínico leve o un muestreo insuficiente.

4.6 Perspectivas

Aunque el presente estudio ha permitido determinar el perfil de mutaciones de β -talasemias en nuestra población, es necesario determinar en una muestra mayor la frecuencia de portadores de estas mutaciones en la población del Uruguay. Los únicos datos hasta el momento provienen de este trabajo (Capítulo 1) determinándose una frecuencia de portadores de 0,25% en

una muestra de niños que se atienden en el Centro Hospitalario Pereira Rosell. Sin embargo en esa muestra hay una sobrerrepresentación de individuos con ancestría africana e indígena, poblaciones las cuales presenta una frecuencia baja o nula de estas mutaciones.

Además sería interesante analizar una muestra con una mayor ancestría europea (italianos, españoles) y también del interior del país ya que los datos genéticos e históricos muestran una conformación poblacional diferente. Por ejemplo la población del norte del país tiene un mayor aporte de poblaciones luso-brasileñas, africanas e indígenas que el resto del país. Ampliar la muestra a estas regiones permitiría además de determinar la frecuencia de portadores, confirmar si la baja frecuencia observada de la mutación IVS-I-6 (T→C), característica de poblaciones portuguesas y también con elevadas frecuencias en España, es real o se debe a problemas de muestreo.

El conocimiento de las mutaciones presentes en nuestro país permitirá realizar un diagnóstico más adecuado de los individuos con estas mutaciones así como un correcto asesoramiento genético a la familia ya que aunque todas son mutaciones de β -talasemias, existe una heterogeneidad clínica elevada dependiendo de la mutación presente. y por lo tanto, el consiguiente tratamiento de ser necesario.

Por último, en una población como la uruguaya donde se observa una elevada frecuencia de anemia por déficit de hierro, el diagnóstico de beta talasemia menor puede pasar inadvertido por lo que es necesario contar con métodos que permitan un diagnóstico temprano para evitar que el paciente sufra continuas investigaciones e incluso un tratamiento inadecuado con hierro en forma oral (Pearson et al., 2000).

4.7 Bibliografia

- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J.G., Coulibaly, D., Kone, A., Kayentao, K., Djimde, A., Plowe, C.V., Doumbo, O., Wellem, T.E. and Diallo, D. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* **96** (2000), pp. 2358-63.
- Allison, A.C. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **48** (1954), pp. 312-8.
- Amselem, S., Nunes, V., Vidaud, M., Estivill, X., Wong, C., d'Auriol, L., Vidaud, D., Galibert, F., Baiget, M. and Goossens, M. Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *Am J Hum Genet* **43** (1988), pp. 95-100.
- Angastiniotis, M., Modell, B., Englezos, P. and Boulyjenkov, V. Prevention and control of haemoglobinopathies. *Bull World Health Organ* **73** (1995), pp. 375-86.
- Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H., Jr. and Orkin, S.H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* **69** (1985), pp. 1-14.
- Antonarakis, S.E., Orkin, S.H., Kazazian, H.H., Jr., Goff, S.C., Boehm, C.D., Waber, P.G., Sexton, J.P., Ostrer, H., Fairbanks, V.F. and Chakravarti, A. Evidence for multiple origins of the beta E-globin gene in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (1982), pp. 6608-11.
- Araujo, A.S., Silva, W.A., Leao, S.A., Bandeira, F.C., Petrou, M., Modell, B. and Zago, M.A. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin* **27** (2003), pp. 211-7.
- Bertoni, B., Jin, L., Chakraborty, R. and Sans, M. Directional mating and a rapid male population expansion in a hybrid Uruguayan population. *Am J Hum Biol* **17** (2005), pp. 801-8.
- Bevilaqua, L.R., Mattevi, V.S., Ewald, G.M., Salzano, F.M., Coimbra, C.E.J., Santos, R.V. and Hutz, M.H. Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five Brazilian Indian tribes. *Am J Phys Anthropol* **98** (1995), pp. 395-401.
- Bravo-Urquiola, M., Arends, A., Gomez, G., Montilla, S., Gerard, N., Chacin, M., Berbar, T., Garcia, O., Garcia, G., Velasquez, D., Castillo, O. and Krishnamoorthy, R. Molecular spectrum of beta-thalassemia mutations in the admixed Venezuelan population, and their linkage to beta-globin gene haplotypes. *Hemoglobin* **36** (2012), pp. 209-18.
- Cabeda, J.M., Correia, C., Estevinho, A., Simoes, C., Amorim, M.L., Pinho, L. and Justica, B. Unexpected pattern of beta-globin mutations in beta-thalassaemia patients from northern Portugal. *Br J Haematol* **105** (1999), pp. 68-74.
- Calvo-Villas, J.M., Zapata, M.F., Cuestatovar, J., De la Iglesia, S., Roper, P., Carreter, E. and Sicilia, F. Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *An.Med.Interna* **23** (2006), pp. 206-212.

- Callegari-Jacques, S.M., Crossetti, S.G., Kohlrausch, F.B., Salzano, F.M., Tsuneto, L.T., Petzl-Erler, M.L., Hill, K., Hurtado, A.M. and Hutz, M.H. The beta-globin gene cluster distribution revisited-patterns in Native American populations. *Am J Phys Anthropol* **134** (2007), pp. 190-7.
- Cao, A., Saba, L., Galanello, R. and Rosatelli, M.C. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. *JAMA* **278** (1997), pp. 1273-7.
- Carvalho-Silva, D.R., Santos, F.R., Rocha, J. and Pena, S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* **68** (2001), pp. 281-6.
- Castro De Guerra, D., Hutz, M.H., Bortolini, M.C. and Salzano, F.M. Beta-globin gene cluster haplotypes in an admixed Venezuelan population. *American Journal of Human Biology* **9** (1997), pp. 323-327.
- Colah, R., Gorakshakar, A. and Nadkarni, A. Global burden, distribution and prevention of beta-thalassemias and hemoglobin E disorders. *Expert Rev Hematol* **3** (2010), pp. 103-17.
- Curat, M., Trabuchet, G., Rees, D., Perrin, P., Harding, R.M., Clegg, J.B., Langaney, A. and Excoffier, L. Molecular analysis of the beta-globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the beta(S) Senegal mutation. *Am J Hum Genet* **70** (2002), pp. 207-23.
- Chakravarti, A., Buetow, K.H., Antonarakis, S.E., Waber, P.G., Boehm, C.D. and Kazazian, H.H. Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet* **36** (1984), pp. 1239-58.
- Chen, L.Z., Easteal, S., Board, P.G. and Kirk, R.L. Evolution of beta-globin haplotypes in human populations. *Mol Biol Evol* **7** (1990), pp. 423-37.
- Da Luz, J., Kimura, E.M., Costa, F.F., Sonati Mde, F. and Sans, M. Beta-globin gene cluster haplotypes in Afro-Uruguayans from two geographical regions (South and North). *Am J Hum Biol* **22** (2010), pp. 124-8.
- da Silveira, Z.M., das Victorias Barbosa, M., de Medeiros Fernandes, T.A., Kimura, E.M., Costa, F.F., de Fatima Sonati, M., Rebecchi, I.M. and de Medeiros, T.M. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol* **34** (2011), pp. 425-8.
- Diaz-Chico, J.C., Yang, K.G., Stoming, T.A., Efremov, D.G., Kutlar, A., Kutlar, F., Aksoy, M., Altay, C., Gurgey, A., Kilinc, Y. and et al. Mild and severe beta-thalassemia among homozygotes from Turkey: identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood* **71** (1988), pp. 248-51.
- Efremov, D.G., Dimovski, A.J., Baysal, E., Ye, Z., Adekile, A.D., Ribeiro, M.L., Schiliro, G., Altay, C., Gurgey, A., Efremov, G.D. and et al. Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with beta-thalassaemia due to a homozygosity for the IVS-I-6 (T-->C) mutation. *Br J Haematol* **86** (1994), pp. 824-30.

- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1** (2005), pp. 47-50.
- Falchi, A., Giovannoni, L., Vacca, L., Latini, V., Vona, G. and Varesi, L. beta-globin gene cluster haplotypes associated with beta-thalassemia on Corsica island. *Am J Hematol* **78** (2005), pp. 27-32.
- Faustino, P., Pacheco, P., Loureiro, P., Nogueira, P.J. and Lavinha, J. The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the Portuguese population. *Br J Haematol* **107** (1999), pp. 903-4.
- Foglietta, E., Deidda, G., Graziani, B., Modiano, G. and Bianco, I. Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* **81** (1996), pp. 387-96.
- Fullerton, S.M., Harding, R.M., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. Molecular and population genetic analysis of allelic sequence diversity at the human beta-globin locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994), pp. 1805-9.
- Gascue, C., Mimbacas, A., Sans, M., Gallino, J.P., Bertoni, B., Hidalgo, P. and Cardoso, H. Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Hum Biol* **77** (2005), pp. 873-8.
- Ghansah, A., Rockett, K.A., Clark, T.G., Wilson, M.D., Koram, K.A., Oduro, A.R., Amenga-Etego, L., Anyorigiya, T., Hodgson, A., Milligan, P., Rogers, W.O. and Kwiatkowski, D.P. Haplotype analyses of haemoglobin C and haemoglobin S and the dynamics of the evolutionary response to malaria in Kassena-Nankana District of Ghana. *PLoS One* **7** (2012), p. e34565.
- Goh, S.H., Lee, Y.T., Bhanu, N.V., Cam, M.C., Desper, R., Martin, B.M., Moharram, R., Gherman, R.B. and Miller, J.L. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood* **106** (2005), pp. 1466-72.
- Gomes, M.P., da Costa, M.G., Braga, L.B., Cordeiro-Ferreira, N.T., Loi, A., Pirastu, M. and Cao, A. Beta-thalassemia mutations in the Portuguese population. *Hum Genet* **78** (1988), pp. 13-5.
- Gonzalez-Redondo, J.M., Stoming, T.A., Lanclos, K.D., Gu, Y.C., Kutlar, A., Kutlar, F., Nakatsuji, T., Deng, B., Han, I.S., McKie, V.C. and et al. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous beta-thalassemia from the southeastern United States. *Blood* **72** (1988), pp. 1007-14.
- Harding, R.M., Fullerton, S.M., Griffiths, R.C., Bond, J., Cox, M.J., Schneider, J.A., Moulin, D.S. and Clegg, J.B. Archaic African and Asian lineages in the genetic ancestry of modern humans. *Am J Hum Genet* **60** (1997), pp. 772-89.
- Hardison, R.C., Chui, D.H., Giardine, B., Riemer, C., Patrinos, G.P., Anagnou, N., Miller, W. and Wajcman, H. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* **19** (2002), pp. 225-33.

- Hardison, R.C., Chui, D.H., Riemer, C., Giardine, B., Lehvaslaiho, H., Wajcman, H. and Miller, W. Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. *Hemoglobin* **25** (2001), pp. 183-93.
- Hardison, R.C., Chui, D.H., Riemer, C.R., Miller, W., Carver, M.F., Molchanova, T.P., Efremov, G.D. and Huisman, T.H. Access to a syllabus of human hemoglobin variants (1996) via the World Wide Web. *Hemoglobin* **22** (1998), pp. 113-27.
- Hidalgo, P.C., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A. and Alvarez, I. Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetic* **5** (2005), pp. 217-222.
- Hughey, J.R., Du, M., Li, Q., Michalodimitrakis, M. and Stamatoyannopoulos, G. A search for beta thalassemia mutations in 4000 year old ancient DNAs of Minoan Cretans. *Blood Cells Mol Dis* **48** (2012), pp. 7-10.
- I.N.E.: Ascendencia etnico-racial. Instituto Nacional de Estadísticas (2011), pp. <http://www.ine.gub.uy/censos2011/resultadosfinales/pais%20poblacion.html>.
- Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178** (1956), pp. 792-4.
- Ingram, V.M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* **180** (1957), pp. 326-8.
- Kalaydjieva, L., Eigel, A. and Horst, J. The molecular basis of beta thalassaemia in Bulgaria. *J Med Genet* **26** (1989), pp. 614-8.
- Kimura, E.M., Grignoli, C.R., Pinheiro, V.R., Costa, F.F. and Sonati, M.F. Thalassemia intermedia as a result of heterozygosis for beta 0 -thalassemia and alpha alpha alpha anti-3,7 genotype in a Brazilian patient. *Braz J Med Biol Res* **36** (2003), pp. 699-701.
- Kulozik, A.E., Wainscoat, J.S., Serjeant, G.R., Kar, B.C., Al-Awamy, B., Essan, G.J., Falusi, A.G., Haque, S.K., Hilali, A.M., Kate, S. and et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* **39** (1986), pp. 239-44.
- Lam, K.W. and Jeffreys, A.J. Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006), pp. 8921-7.
- Lam, K.W. and Jeffreys, A.J. Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007), pp. 10950-5.
- Latini, V., Vacca, L., Ristaldi, M.S., Marongiu, M.F., Memmi, M., Varesi, L. and Vona, G. Beta-globin gene cluster haplotypes in the Corsican and Sardinian populations. *Hum Biol* **75** (2003), pp. 855-71.
- Long, J.C., Chakravarti, A., Boehm, C.D., Antonarakis, S. and Kazazian, H.H. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am J Phys Anthropol* **81** (1990), pp. 113-30.

- Marrero, A.R., Das Neves Leite, F.P., De Almeida Carvalho, B., Peres, L.M., Kommers, T.C., Da Cruz, I.M., Salzano, F.M., Ruiz-Linares, A., Da Silva Junior, W.A. and Bortolini, M.C. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* **17** (2005), pp. 496-506.
- Martins, C.S., Ramalho, A.S., Sonati, M.F., Goncalves, M.S. and Costa, F.F. Molecular characterisation of beta thalassaemia heterozygotes in Brazil. *J Med Genet* **30** (1993a), pp. 797-8.
- Martins, M.C., Olim, G., Melo, J., Magalhaes, H.A. and Rodrigues, M.O. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet* **30** (1993b), pp. 235-9.
- Mattevi, V.S., Fiegenbaum, M., Salzano, F.M., Weiss, K.M., Moore, J., Monsalve, M.V., Devine, D.V. and Hutz, M.H. Beta-globin gene cluster haplotypes in two North American indigenous populations. *Am J Phys Anthropol* **112** (2000), pp. 311-7.
- Miranda, S.R., Fonseca, S.A., Figueiredo, M., Yamamoto, M., Grotto, H.Z., Saad, S.T. and Costa, F.F. Hb Köln [a2b298(FG5) val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Genet* **20** (1997).
- Muniz, A., Martinez, G., Lavinha, J. and Pacheco, P. Beta-thalassaemia in Cubans: novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. *Am J Hematol* **64** (2000), pp. 7-14.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E. and Steinberg, M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev* **17** (2003), pp. 167-78.
- Old, J.M., Petrou, M., Modell, B. and Weatherall, D.J. Feasibility of antenatal diagnosis of beta thalassaemia by DNA polymorphisms in Asian Indian and Cypriot populations. *Br J Haematol* **57** (1984), pp. 255-63.
- Pagnier, J., Mears, J.G., Dunda-Belkhodja, O., Schaefer-Rego, K.E., Beldjord, C., Nagel, R.L. and Labie, D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (1984), pp. 1771-3.
- Pante-De-Sousa, G., Mousinho-Ribeiro, R.C., Dos Santos, E.J. and Guerreiro, J.F. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Ann Hum Biol* **26** (1999), pp. 365-73.
- Patrinos, G.P., Giardine, B., Riemer, C., Miller, W., Chui, D.H., Anagnou, N.P., Wajcman, H. and Hardison, R.C. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* **32** (2004), pp. D537-41.
- Pauling, L., Itano, H.A. and et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* **110** (1949), pp. 543-8.
- Pearson, H.A., Ehrenkranz, R.A., Rinder, H.M. and Riely, C.A. Hemosiderosis in a normal child secondary to oral iron medication. *Pediatrics* **105** (2000), pp. 429-31.

- Perea, F.J., Magana, M.T., Cobian, J.G., Sanchez-Lopez, J.Y., Chavez, M.L., Zamudio, G., Esparza, M.A., Lopez-Guido, B. and Ibarra, B. Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Mexican population. *Blood Cells Mol Dis* **33** (2004), pp. 150-2.
- Pereira, M.d.l., Dalmau, A.C. and Corrons, J.L. Molecular heterogeneity of beta-thalassemia alleles in Spain and its importance in the diagnosis and prevention of beta-thalassemia major and sickle cell disorders. *Hemoglobin* **33** (2009), pp. 226-34.
- Peschle, C., Mavilio, F., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Russo, G., Mastroberardino, G. and Marinucci, M. Erythropoietic development and hemoglobin switching in human embryos: cellular and molecular aspects. *Prog Clin Biol Res* **191** (1985), pp. 383-96.
- Pi, R. and Vidart, D., *El legado de los inmigrantes, I Nuestra Tierra*, Montevideo (1969).
- Piel, F.B., Patil, A.P., Howes, R.E., Nyangiri, O.A., Gething, P.W., Williams, T.N., Weatherall, D.J. and Hay, S.I. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* **1** (2010), p. 104.
- Piras, I., Vona, G., Falchi, A., Latini, V., Ristaldi, S., Vacca, L., Varesi, L. and Calo, C.M. Beta-globin cluster haplotypes in normal individuals and beta(0)39-thalassemia carriers from Sardinia, Italy. *Am J Hum Biol* **17** (2005), pp. 765-72.
- Pirastu, M., Galanello, R., Doherty, M.A., Tuveri, T., Cao, A. and Kan, Y.W. The same beta-globin gene mutation is present on nine different beta-thalassemia chromosomes in a Sardinian population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987), pp. 2882-5.
- Pritchard, J.K. and Przeworski, M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* **69** (2001), pp. 1-14.
- Rahimi, Z., Muniz, A., Akramipour, R., Tofieghzadeh, F., Mozafari, H., Vaisi-Raygani, A. and Parsian, A. Haplotype analysis of beta thalassemia patients in Western Iran. *Blood Cells Mol Dis* **42** (2009), pp. 140-3.
- Reichert, V.C., de Castro, S.M., Wagner, S.C., de Albuquerque, D.M., Hutz, M.H. and Leistner-Segal, S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol* **87** (2008), pp. 381-4.
- Rigoli, L., Meo, A., Miceli, M.R., Alessio, K., Caruso, R.A., La Rosa, M.A., Salpietro, D.C., Ricca, M. and Barberi, I. Molecular analysis of beta-thalassaemia patients in a high incidence area of southern Italy. *Clin Lab Haematol* **23** (2001), pp. 373-8.
- Roldan, A., Gutierrez, M., Cygler, A., Bonduel, M., Sciuccati, G. and Torres, A.F. Molecular characterization of beta-thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* **54** (1997), pp. 179-82.
- Rossetti, L.C., Targovnik, H.M. and Varela, V. The molecular basis of beta-thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin. *Haematologica* **89** (2004), pp. 746-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. . Ed 2da. Cold Spring Harbor Laboratory press. United States of America. (1989).

- Sans, M., Estudio genético e histórico de la población del departamento de Tacuarembó, Uruguay. (1994).
- Sans, M., Salzano, F.M. and Chakraborty, R. Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* **69** (1997), pp. 161-70.
- Schneider, J.A., Peto, T.E., Boone, R.A., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. Direct measurement of the male recombination fraction in the human beta-globin hot spot. *Hum Mol Genet* **11** (2002), pp. 207-15.
- Shen, S.H., Slightom, J.L. and Smithies, O. A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell* **26** (1981), pp. 191-203.
- Shimizu, K., Hashimoto, T., Harihara, S., Tajima, K., Sonoda, S. and Zaninovic, V. Beta-globin gene haplotype characteristics of Colombian Amerinds in South America. *Hum Hered* **51** (2001), pp. 54-63.
- Song, G., Hsu, C.H., Riemer, C., Zhang, Y., Kim, H.L., Hoffmann, F., Zhang, L., Hardison, R.C., Green, E.D. and Miller, W. Conversion events in gene clusters. *BMC Evol Biol* **11** (2011), p. 226.
- Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R. and Nagel, R.L., Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge University Press (2001).
- Trabuchet, G., Elion, J., Baudot, G., Pagnier, J., Bouhass, R., Nigon, V.M., Labie, D. and Krishnamoorthy, R. Origin and spread of beta-globin gene mutations in India, Africa, and Mediterranean: analysis of the 5' flanking and intragenic sequences of beta S and beta C genes. *Hum Biol* **63** (1991), pp. 241-52.
- Villalobos-Arambula, A.R., Bustos, R., Casas-Castaneda, M., Gutierrez, E., Perea, F.J., Thein, S.L. and Ibarra, B. Beta-thalassemia and beta[A] globin gene haplotypes in Mexican mestizos. *Hum Genet* **99** (1997), pp. 498-500.
- Villegas, A., Porres, A., Sanchez, J., Gonzalez, F.A., Perez-Clausell, C., Martinez, M., Murga, M.J., Cacha, J., Lozano, M., Fernandez-Fuertes, I., Del Arco, A., Arrizabalaga, B., Perez de Mendiguren, B., San Juan, I., Saavedra, R., Ricart, P., Sainz, C., Guerra, J.L., Munoz, J.A., Lago, C. and Anso, V.M. Red blood cell phenotypes in alpha-thalassemias in the Spanish population. *Haematologica* **83** (1998), pp. 99-103.
- Villegas, A., Roper, P., González, F.A., Anguita, E. and Espinos, D. The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* **25** (2001), pp. 273-283.
- Vivenes De Lugo, M., Rodriguez-Larralde, A. and Castro De Guerra, D. Beta-globin gene cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the northeastern coast of Venezuela. *Am J Hum Biol* **15** (2003), pp. 29-37.
- Weatherall, D.J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* **115** (2001), pp. 4331-6.

- Webster, M.T., Clegg, J.B. and Harding, R.M. Common 5' beta-globin RFLP haplotypes harbour a surprising level of ancestral sequence mosaicism. *Hum Genet* **113** (2003), pp. 123-39.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* **79** (2001a), pp. 704-712.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* **79** (2001b), pp. 704-712.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J.B.: *The Thalassaemia Syndromes*. Wiley-Blackwell (2001c).
- Wood, E.T., Stover, D.A., Slatkin, M., Nachman, M.W. and Hammer, M.F. The beta -globin recombinational hotspot reduces the effects of strong selection around HbC, a recently arisen mutation providing resistance to malaria. *Am J Hum Genet* **77** (2005), pp. 637-42.
- Zhang, W., Cai, W.W., Zhou, W.P., Li, H.P., Li, L., Yan, W., Deng, Q.K., Zhang, Y.P., Fu, Y.X. and Xu, X.M. Evidence of gene conversion in the evolutionary process of the codon 41/42 (-CTTT) mutation causing beta-thalassaemia in southern China. *J Mol Evol* **66** (2008), pp. 436-45.

Apéndice Capítulo 4. A new β^0 thalassemia frameshift mutation [Codon 48 (-T); CTG (Leu) \rightarrow CG] in a Uruguayan family. Da Luz et al, Int J Lab Hematol 2012 35: (1) 111-114

Da Luz J, López P, Kimura EM, Albuquerque DM, Costa FF, Sans M, Sonati MF.
A new β^0 -thalassemia frameshift mutation [β 48 (-T)] in a Uruguayan family.
Int J Lab Hematol 2012 35:(1) 111-114

A new β^0 thalassemia frameshift mutation [Codon 48 (-T); CTG (Leu) \rightarrow CG] in a Uruguayan family.

Julio Da Luz¹ jdal@fmed.edu.uy

Pablo López¹ plopez@fmed.edu.uy

Elza Miyuki Kimura² kimura@fcm.unicamp.br

Dulcinéia Martins Albuquerque³ dulmal@unicamp.br

Fernando Ferreira Costa³ ferreira@unicamp.br

Mónica Sans⁴ msans@fhuce.edu.uy

Maria de Fatima Sonati² sonati@fcm.unicamp.br

¹Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Departamento de Patología Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, Brazil

³Hemocentro, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, Brazil

⁴Departamento de Antropología Biológica, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Corresponding autor: J. Da Luz, Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR). General Flores 2125 ZIP code 11800 Montevideo, Uruguay. Phone: (598) 29249562, Fax (598) 29249563. E-mail: jdal@fmed.edu.uy (preferred)/jdal@adinet.com.uy (alternative)

Running title: A new β^0 -thalassemia mutation in a Uruguayan family

Abstract

We describe here a new frameshift mutation of β^0 -thalassemia in a Uruguayan family with Italian ancestry [Codon 48 (-T); CTG (Leu) \rightarrow CG]. This frameshift results in formation of premature stop codon (TGA) 40 pb downstream which probably produce an unstable product which is degraded in the cell.

Key words: hemoglobinopathy, thalassemia, genetics, anemia,

Introduction

β -thalassemia (β -thal) is a heterogeneous and common genetic disorder caused by mutations that reduce (β^+) or abolish (β^0) the synthesis of β -globin chains. There are currently 260 mutations causing β -thalassemia and each ethnic or geographic group carries its own set of common mutations. The majority of these mutations are point mutations (substitutions, insertions, deletions) whereas only a few of them are large deletions or insertions (1, 2). These mutations were introduced in Uruguay by European Mediterranean immigration, mainly Italians and Spaniards, during the last half of the 19th century and the beginning of the 20th century (3, 4). We describe herein a new mutation of β^0 -thalassemia, a deletion of T in the second position of codon 48, [Codon 48 (-T) CTG (Leu)→CG] in a family with Italian ancestry.

Patients and Methods

Case Report

A 29-year-old Uruguayan woman of Italian ancestry presented with a history of hypochromic and microcytic anemia. She was diagnosed as minor β -thalassemia by Hb electrophoresis in the childhood when was observed anemia, moderate pallor and moderate spleen enlargement without requirement for blood transfusions so far [RBC $4.8 \times 10^6 / \text{mm}^3$], Hb 9.4 g / dL, PCV 0.30, MCV 61.6fL, MCH 19.4 pg]. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis (VariantTM, BioRad Laboratories, CA, USA) showed levels of HbA2 and HbF of 4.6% and 1.3% respectively, suggesting the presence of a β -thalassemia mutation in heterozigosis. DNA was extracted from peripheral blood sample by standard methods and the β -globin gene sequencing was performed using primers described elsewhere (5), DyenamicTM ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and a MegaBace 1000DNA Analysis System (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Sunnyvale, CA, USA). The sequencing showed a frameshift mutation in the second position of codon 48 [Codon 48 (-T) CTG \rightarrow CG]. In order to confirm the mutation the β -globin gene amplified product was cloned using the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced (Fig. 1A). This mutation results in the formation of a stop codon 40 pb downstream of this change. Haematologic, biochemical and familial data of the patient are showed in Table 1. All carriers of this mutation presented with hypochromic and microcytic anemia. These carriers include the patient's grand-mother, mother and one sister (Fig. 1B). The brother who presents normal haematological values does not show any mutation in the beta globin gene. The

presence of deletional α -thalassemias were analyzed by a multiplex PCR according to conditions previously described (6) and mutations were not observed.

(Table 1 y Figure 1 here)

Discussion

This mutation produces a premature termination of the globin chain synthesis due to the interruption of translation. Such mutations usually originate an unstable product that is quickly degraded in the cell (7). There are currently described 260 mutations causing β -thalassemia being 91 (35%) of them frameshift mutations. This is the second β -thalassemia mutation due to the alteration in the codon 48 (2,8).

The Uruguayan population is formed by the unequal contribution of people from European, African and Native American origin. The greater contribution is the European populations, mainly Spaniards and Italians, who arrived in Uruguay since the first time of colonization with the higher contribution during the last half of the 19th century and the beginning of the 20th century (3,4). As β -thalassemia mutations are absent or found at a low frequency in African Sub-Saharan and Native American populations, these mutations in Uruguay probably presents a European Mediterranean origin. Although in Uruguay the frequency and spectrum of β -thalassemia mutations are unknown, they are probably similar to those observed in border countries as Argentine and Brazil. In those countries, four mutations are responsible for the majority of cases of β -thalassemia (β^0 Codon 39, β^+ IVS-I-nt 110, β^+ IVS-I-nt 6 and β^0 IVS-I-nt 1) (9,10). The new mutation detected here has probably Italian origin because the patient's grandmother is on Italian descent, being this grandmother's father born in the region of Toscana and her mother born in the city of Potenza, of southern Italy. However, no

Italians have been found carrying this mutation so far, therefore the origin can be, eventually, Uruguayan.

Acknowledgements

We thank Dr Jose Tort (Facultad de Medicina, UDELAR, Uruguay) for revising the manuscript. Financial support from CSIC (2006), Uruguay and FAPESP, Brazil; Contract grant number: no. 2008/57441-0

References

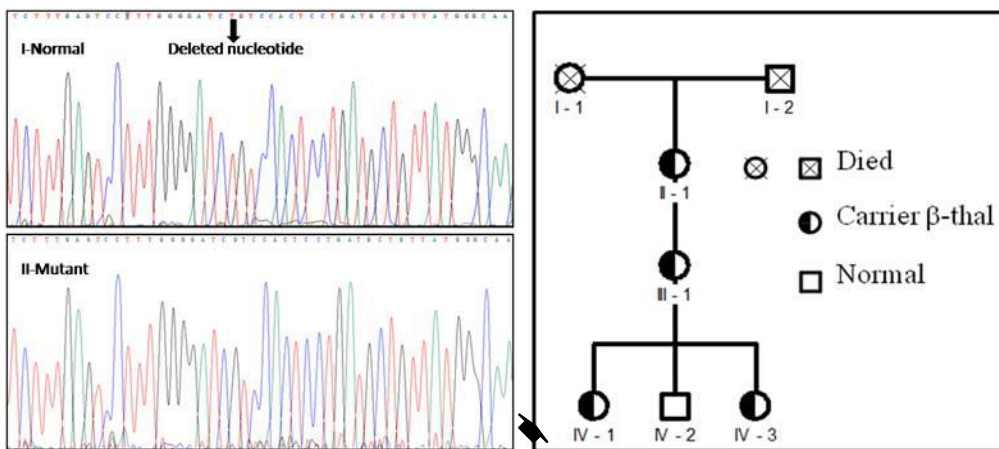
1. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. 2001. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, Cambridge
2. Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* 2002; 19:225-233.
3. Pi R, Vidart D. El legado de los inmigrantes. Montevideo, Nuestra Tierra (eds). 1969; 29: 1-60.
4. Sans M. Genética e historia, hacia una revisión de nuestra identidad como “país de inmigrantes”. Montevideo, Eds. del V. Centenario, FHCE-UDELAR. 1992.
5. Miranda SRP, Fonseca S, Figueredo M, Yamamoto M. 1997. Hb Köln [$\alpha 2\beta 298(\text{FG}5)$ val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Genet* 20(4).
6. Tan AS, Quah T, Low P, Chong SS. 2001. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 98: 250-51.
7. Huisman THJ. Frequencies of common b-thalassemia alleles among different populations: variability in clinical severity. *Br J Haematol* 1990;75:454-457.
8. el-Kalla S, Mathews AR. A novel frameshift mutation causing beta-thalassemia in a Sikh. *Hemoglobin* 1995;19:183-9.

9. Roldán A, Gutiérrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF. Molecular characterization of β -thalassemia genes in an Argentine population. *Am. J. Hematol* 1997; 54: 179-182.
10. Martins CSB, Ramalho AS, Sonati MF, Goncalves MS, Costa FF. Molecular characterization of β -thalassemia heterozygotes in Brazil. *J Med Genet* 1993; 30:797-800.

Table 1. Haematological, biochemical and familial data of the β^0 thalassemia carrier patient [Codon 48 (-T) CTG \rightarrow CG].

	Age	Hb (g/dl)	PCV (l/l)	RBC ($10^{12}/l$)	MCV (fl)	MCH (pg)	A2 (%)	F (%)
II-1	85	11.4	0.36	6.0	60.2	19.2		
III-1	53	10.9	0.36	5.5	65.2	19.6	4.3	1.4
IV-1	29	9.4	0.30	4.8	61.6	19.4	4.6	1.3
IV-2	27	13.5	0.40	4.8	84	28.2		
IV-3	21	9.4	0.31	4.6	68	20.6		

Figure 1. β -globin gene sequencing. AI Normal strand. AII. Strand with the mutation in exon 2 [Codon 48 (-T) CTG→CG]. B. β^0 thalassemia family pedigree. Arrow indicates the proband.



Capitulo 5. Haplotipos de la β -globina asociados a la HbS

5.1 Introducción

La hemoglobina humana es un tetrámero de 64,5 kDa constituida por dos cadenas de α -globina y dos cadenas de β -globina. Cada una de las cadenas polipeptídicas se encuentra unida por enlaces covalentes a un grupo heme. Su fórmula general, siempre en referencia a seres humanos, es X_2Y_2 , donde X se refiere a las cadenas de α -globinas e Y a las cadenas de β -globinas (Steinberg et al., 2001). A lo largo del desarrollo de un individuo desde el feto al adulto se expresan distintas hemoglobinas formados por cadenas distintas de α y β -globinas.

5.1.1 Mutaciones de los genes de las hemoglobinas.

Actualmente se han identificado y caracterizado más de 1500 mutaciones en los genes de las globinas, las cuales son responsables de las talasemias (α y β) y de las variantes estructurales de la hemoglobina. Las variantes estructurales de la hemoglobina representan más de tres cuartos partes de las mutaciones descritas, al momento 1161 variantes de acuerdo al *Globin Gene Server* (<http://globin.cse.psu.edu/>) (Hardison et al., 2002).

La mayoría de las variantes estructurales de la hemoglobina son raras con las excepciones de hemoglobinas S (Hb S), C (Hb C), D (Hb D), y E (Hb E). Estas variantes frecuentes se encuentran distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales de Africa y Asia y en la región del mar Mediterráneo: por ejemplo, las mutaciones que producen Hb S y C son originarias de Africa, Hb D (Punjab) de la India y la Hb E del Sudeste asiático. Esta distribución se solapa con las áreas de paludismo endémico. La elevada frecuencia de estas variantes se debe a que los individuos heterocigotas para estas mutaciones poseen una ventaja selectiva sobre los homocigotas normales y con la mutación de la enfermedad, debido a que presentan mayor resistencia a la infección por el *Plasmodium falciparum*, el agente productor de la malaria (Allison, 1954; Agarwal et al., 2000; Piel et al., 2010). Este tema será desarrollado más adelante.

5.1.2 Hemoglobina S

La hemoglobina S (Hb S) está formada por dos cadenas α normales y dos cadenas β mutadas ($\alpha_2\beta^S_2$). La variante β^S posee valina en la sexta posición de la cadena aminoacídica en lugar del ácido glutámico que se encuentra en las cadenas normales (β) que forman la hemoglobina A (HbA) del adulto ($\alpha_2\beta_2$). El cambio de ácido glutámico a valina se debe a una transversión de A a T en el codón 6 (GAG→GTG). La HbS fue la primera molécula que se pudo asociar a una enfermedad, la anemia falciforme o anemia drepanocítica, ya en la década de 1940 (Pauling et al., 1949; Ingram, 1956; Ingram, 1957). Cuando está desoxigenada la HbS tiene la propiedad de polimerizarse en largos filamentos de alto peso molecular (tactoides) lo cual produce daño en el eritrocito con alteración de su forma, que adquiere un aspecto de hoz como consecuencia de cambios en la estructura de la membrana celular (Steinberg et al., 2001).

Los individuos homocigotas para el alelo β^S del gen de la β -globina desarrollan la enfermedad anemia falciforme o anemia drepanocítica, que se caracteriza por complicaciones crónicas, recurrentes y agudas afectando muchos órganos y tejidos. Las células falciformes interactúan con otras células sanguíneas y con el endotelio causando daño vascular y ocluyendo pequeños vasos. Con el tiempo pueden ocluir vasos sanguíneos mayores lo cual es responsable de la mayoría de las complicaciones más graves de esta enfermedad (Steinberg et al., 2001). Además de los homocigotas para el alelo β^S , los heterocigotas compuestos para este alelo y el alelo generador de la hemoglobina C (β^S/β^C) o con un alelo generador de talasemias β (HbS/ β^{tal}) generan un fenotipo de anemia falciforme aunque con menor gravedad clínica (Nagel et al., 2003).

Los individuos heterocigotas para el alelo β^S son asintomáticos y presentan aproximadamente 60% de HbA y 40% de HbS; no presentan eventos hemolíticos ni vaso oclusivos debido a la baja concentración de HbS salvo condiciones severas de hipoxia (Sears, 1978).

La hemoglobina S se encuentra principalmente en poblaciones de África ecuatorial donde la frecuencia de portadores en algunas poblaciones es de más del 30%. También se encuentra en algunas regiones del Medio Oriente y en la India aunque a menores frecuencias (Allison, 1954; Kulozik et al., 1986; Weatherall, 2001; Piel et al., 2010). La elevada frecuencia de la hemoglobina S en estas regiones fue la primera demostración en humanos del mecanismo de la ventaja del heterocigota para el mantenimiento de un polimorfismo. En las regiones mencionadas la malaria mediada por el parásito *Plasmodium falciparum* es endémica. Aunque los individuos homocigotas para el alelo β^S presentan una anemia grave y en ausencia de un tratamiento intensivo no sobreviven, los individuos heterocigotas para este alelo y un alelo normal, los cuales son prácticamente asintomáticos, son resistentes a la malaria, mientras que los homocigotas para el alelo normal son muy sensibles a desarrollar malaria severa. Por lo tanto, los individuos heterocigotas presentan un mayor *fitness* que los dos homocigotas en regiones donde la malaria es muy común; la viabilidad de los genotipos AA, AS y SS en estas áreas fue estimada en 0.9, 1 y 0.2 respectivamente, lo cual permite calcular una frecuencia alélica en el equilibrio de 0.89 para el alelo β^A y de 0.11 para el alelo β^S (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1981).

5.1.2.1 Poblaciones americanas

Aunque originaria de las regiones antes mencionadas la HbS se ha extendido a todo el mundo, incluyendo el continente americano, por el tráfico de esclavos desde África, ocurrido entre los siglos XVI y XIX y en las últimas décadas debido a las migraciones forzadas debido a problemas económicos. En las poblaciones y países del continente americano el tráfico de esclavos ha sido la principal fuente de genes africanos, en muchos casos portadores de HbS. Por esta razón, la frecuencia de HbS en el continente americano depende en gran parte del porcentaje del aporte africano a cada población.

En la Tabla 1 se presenta la frecuencia de heterocigotas HbS/HbA en población afrodescendiente de distintos países del continente americano.

Tabla 1. Frecuencia de heterocigotas HbS/HbA en afrodescendientes de algunos países del continente americano.

Poblaciones	N	%
Barbados	912	7.0
Belice	724	27.7
Brasil	21372	6.2
Colombia	1184	11.9
Costa Rica	1890	8.1
Cuba	6996	6.1
Curaçao	2499	10.7
Dominica	1000	13.1
Ecuador	1734	17.8
Guadalupe	1000	9.2
Guatemala	150	18.3
Haití	807	13.2
Honduras	1671	10.0
Jamaica	100000	10.0
Martinica	213	9.4
México		11.2
Nicaragua	118	11.1
Panamá	7604	16.0
Portugal	1000	5.4
República Dominicana	798	7.0
San Vicente	748	8.7
Santa Lucía	825	14.0
Santo Tomás	1769	9.1
Surinam	1058	17.1
Trinidad y Tobago	379	11.1
Venezuela	2132	8.7
Uruguay1	40	10
Uruguay2	138	2.2

(Rodríguez et al., 1998); Uruguay1 (Da Luz et al., 2006) Uruguay2 (ver capítulo 1)

A nivel de la población general las frecuencias de heterocigotas HbS/HbA es menor dependiendo del porcentaje de población de origen africano en cada país. En un estudio hecho en Brasil sobre 55217 individuos de cuarenta ciudades se observó una frecuencia de 1,9% de heterocigotas HbS/HbA. (Naoum et al., 1987). Similares resultados fueron observados en regiones particulares de Brasil; en recién nacidos en el Hospital de Clínicas de Porto Alegre se observó una frecuencia de heterocigotas HbS/HbA de 1,2%(Esteves et al., 2002) mientras que en el norte de Brasil, en la ciudad de Natal la frecuencia de heterocigotas en 1940 recién nacidos fue de 1,5%(Pignataro et al., 2004).

En Argentina, en el área del Gran Buenos Aires se observó una frecuencia de heterocigotas HbS/HbA de 0,23% (Abreu and Peñalver, 1983) mientras que en la provincia de Rosario esta frecuencia fue de 0,5% (Noguera et al., 1999). En Venezuela, un estudio en recién nacidos mostró una frecuencia de heterocigotas HbS/HbA de 1,3% (Gimenez et al., 2009) aunque la frecuencia

varía entre 0% en poblaciones indígenas y 5% en mestizos y afro-descendientes, llegando en algunos casos a frecuencias de 12% en la costa de la región norte (Arends et al., 1982).

En Uruguay se observó una frecuencia de heterocigotas HbS/HbA de 0,76% (Capítulo 1) menor a lo observado en Brasil y Venezuela, posiblemente debido al menor aporte de poblaciones de origen africano a nuestro país.

5.1.3 Haplotipos del cluster de genes de la β -globina

El análisis de los haplotipos del cluster de genes de la β -globina ha sido ampliamente utilizado para estudiar la variabilidad genética y las relaciones entre poblaciones humanas desde un punto de vista evolutivo (Chen et al. 1990; Long et al. 1990). A lo largo de aproximadamente 60Kb de este cluster, una serie de polimorfismos muestra grados variables de desequilibrio de ligamiento (LD). Elevados grados de LD son observados en las regiones 5' y 3' del cluster pero no entre ellas. Esto permitió la identificación de un *hot-spot* de recombinación 5' del gen de la β -globina el cual presenta una tasa de recombinación de aproximadamente 80cM/Mb (Chakravarti et al. 1984; Schneider et al. 2002; Wall et al. 2003).

Los polimorfismos permiten la construcción de dos grupos de haplotipos a cada lado del *hot-spot* de recombinación: el haplotipo 5' y el haplotipo 3' o *frameworks* (Orkin et al. 1982). El haplotipo 5' está definido por seis sitios de restricción polimórficos ubicados 5' del gen de la β -globina y del *hot-spot* de recombinación. Estos son ordenados de 5' a 3' de la siguiente manera: un sitio *HincII* 5' del gen de la globina ϵ (HBE), dos sitios *HindIII*, uno en el intrón 2 (IVS-2) del gen de la globina γ (HBG1) y el otro en el intrón 2 de la globina $\alpha\gamma$ (HBG2), dos sitios *HincII*, uno dentro del pseudogén de la globina β ($\psi\beta$) (HBBP1) y el otro en su extremo 3', y un sitio *Hinfl* en el extremo 5' del gen de la β -globina (HBB). De estos seis sitios, los primeros cinco son los que se han usado mayoritariamente para la construcción de los haplotipos. El haplotipo 3' está definido por seis sitios polimórficos, cinco dentro del gen de la β -globina

(uno la posición 3 del codón 2 (C/T), y cuatro en el intrón 2 (IVS-2) en las posiciones 16 (C/G), 74 (G/T), 81 (C/T) y 666 (T/C) y uno hacia 3' del gen de la β -globina que determina la presencia-ausencia de un sitio de restricción para la enzima *HinfI* (ver Figura 1).

Los primeros cinco sitios del haplotipo 5' han sido ampliamente usados en análisis evolutivos. La mayor diferencia observada en las poblaciones mundiales es que el haplotipo más frecuente en África (- - - - +) es raro o ausente en poblaciones no-africanas y otro haplotipo, el cual es el más frecuente en el resto de las poblaciones mundiales (+ - - - -), es muy raro en África. Esta diferencia fue interpretada como una evidencia adicional a la teoría *out of Africa* acerca del origen de los humanos modernos, donde el haplotipo Africano frecuente fue perdido en otras poblaciones debido a un período de reducción poblacional (Wainscoat et al. 1986; Chen et al. 1990; Long et al. 1990). También, la variación en frecuencia de estos haplotipos ha permitido realizar estudios microevolutivos en poblaciones modernas (Pante-De-Sousa et al. 1999; Mattevi et al. 2000; Vivenes De Lugo et al. 2003).

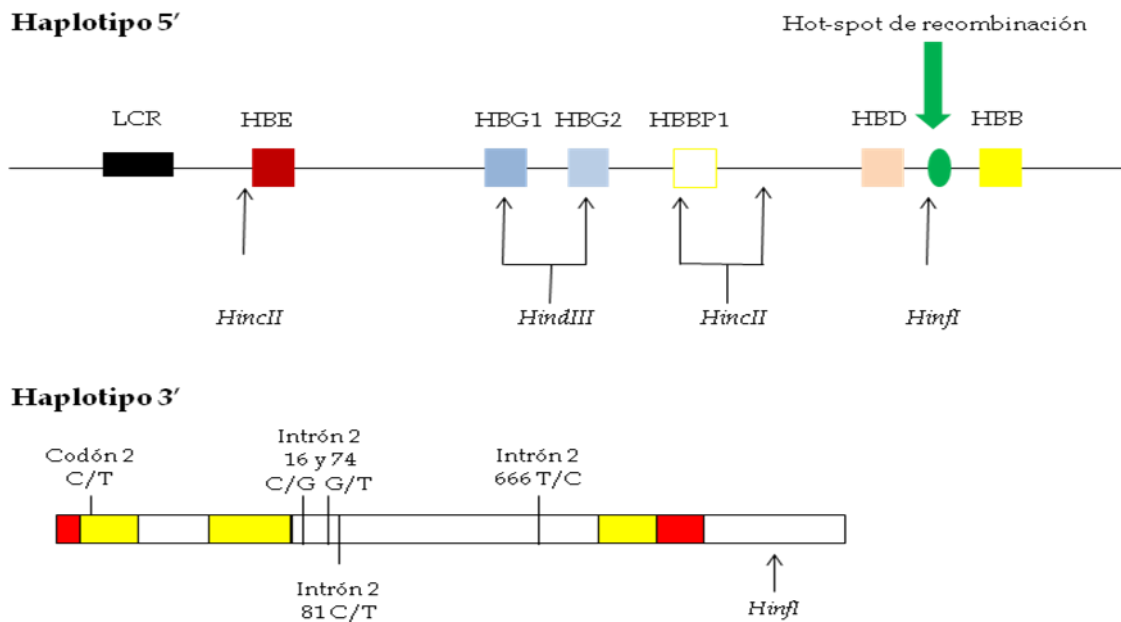


Figura 1. Haplotipos 5' y 3'. En el haplotipo 5' se representan los genes del cluster de la β -globina y la región reguladora del cluster, LCR (locus control región). El círculo verde indica el hot-spot de recombinación. En el haplotipo 3' los rectángulos coloreados indican los exones del gen de la β -globina y los sin colorear los intrones. La región roja indica las secuencias no traducidas 5' y 3'.

Los polimorfismos ubicados 3' del *hot-spot* de recombinación definen cuatro grupos de haplotipos 3' o *frameworks*: haplotipo I o A (C C G C T +), haplotipo II o B (C C T C T -), haplotipo III-asiático o C (T G T C C +) y el haplotipo III o D (T G T T C +) (Orkin et al. 1982).

5.1.3.1 Haplotipos asociados a la HbS

Adicionalmente, estos haplotipos han sido de importancia en el análisis evolutivo de las hemoglobinopatías como la HbS, HbC, HbE y las β -talasemias. Como se señaló, las mutaciones que generan dichas hemoglobinas confieren protección contra la malaria en los individuos que las portan en estado heterocigota y han incrementado su frecuencia debido a la selección (Allison, 1954; Agarwal et al., 2000; Modiano et al., 2001; Piel et al., 2010). Esas mutaciones se encuentran generalmente asociadas a uno o algunos pocos haplotipos 5' en la población o región donde esta mutación se encuentra. La mutación que produce HbS en África se encuentra asociada principalmente a cuatro haplotipos, y en distintas regiones geográficas predomina solamente uno de ellos. Estos haplotipos son denominados: **1)** Bantú o CAR (- + - - -), ubicado en el centro de Africa, relacionado a la distribución del grupo lingüístico Bantú: Gabón, República Centroafricana, Congo, Zaire y Angola, **2)** Senegal (- + - + +), ubicado en la costa Atlántica al noroeste de Africa: Senegal, Gambia, Guinea, Guinea-Bissau, Sierra Leona, Liberia y parte de la Costa de Marfil, **3)** Benín (- - - - +), ubicado en el oeste de Africa, al norte del golfo de Guinea: Costa de Marfil, Togo, Benín, Burkina Faso (Alto Volta) y el oeste de Nigeria y **4)** Camerún (- + + - +), ubicado al este del Golfo de Guinea en la zona central de Camerún (ver Figura 2).

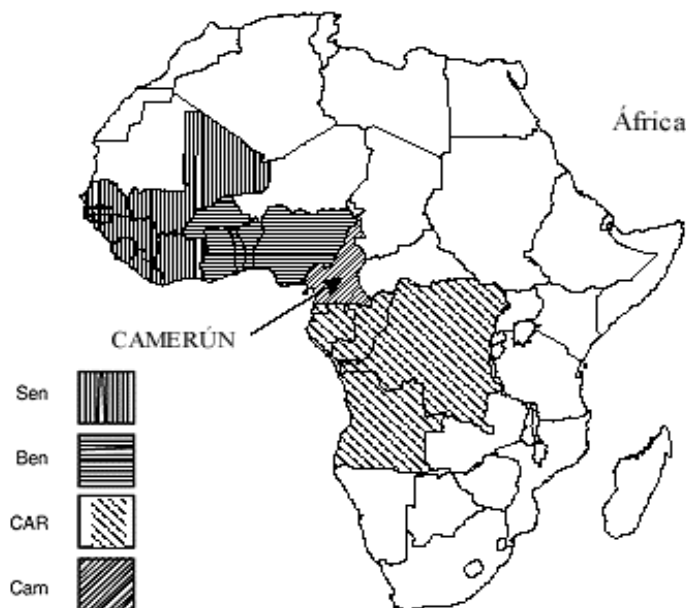


Figura 2. Distribución de los haplotipos ligados al alelo β^S en Africa. Sen, Senegal; Ben; Benín; CAR; Bantú o República Centroafricana y Cam; Camerún. Tomado de Rodríguez y cols., 1998.

En las poblaciones del Medio Oriente y la India se encontró el gen de la HbS ligado a un quinto haplotipo denominado Árabe-Indio (+ + - + +) indicando un origen independiente de este alelo (Kulozik et al. 1986).

Además de los estudios basados en los polimorfismos antes mencionados, en las últimas décadas se han realizado estudios de diversidad en otras regiones del *cluster* del gen de la β -globina como la región R/T ubicada 5' del gen de la δ -globina, la secuencia repetida $(AT)_xN_y(AT)_z$ ubicada en la región hipersensitiva 2 (*HS2*) de la región control de locus (*LCR*) y una región 5' del gen de la β -globina que presenta el motivo polimórfico $ATxTy$ y polimorfismos de nucleótido simple (*SNPs*).

5.1.3.1.1 Región R/T

Esta región fue inicialmente identificada estudiando individuos que presentaban el gen de la β -globina deletado pero mientras algunos poseían niveles elevado de expresión de hemoglobina fetal otros poseían niveles

normales de esta Hb. Se estableció que cuando la delección del gen de la β -globina se extendía hasta una región entre el gen de γ^A y la δ -globina y eliminaba dos repetidos Alu ubicados en sentido inverso, los niveles de HbF se elevaban mientras que los niveles de Hb eran normales y se observaba un fenotipo de persistencia hereditaria de HbF. Cuando la delección no abarca esta región, no se observaban niveles elevados de HbF, pero sí niveles de anemia variables y un fenotipo de β -talasemia (Maeda et al., 1983). Esta región fue denominada R/T en función de que fueron identificados dos haplotipos divergentes, R (+ -) y T (- +) en función de la digestión con las enzimas de restricción *RsaI* y *TaqI* respectivamente. Adicionalmente, se vio que los dos tipos de haplotipos difieren en 18 polimorfismos ubicados en la mitad 5' de la región que es la que contiene los dos sitios Alu mencionados anteriormente (Maeda et al., 1983). El análisis de esta región en ocho poblaciones de África, Asia y Europa mostró que la mayoría de los individuos presentaban los haplotipos clásicos R o T, sugiriendo que estos haplotipos se mantienen en la población por selección a favor de los heterocigotas. En estas mismas poblaciones cuando se analizó la variación a nivel de secuencia alélica usando una sub-región de la región R/T que presenta 8 de los 18 polimorfismos antes mencionados se observó el mismo patrón de haplotipos divergentes, detectándose muy pocas variantes de los tipos clásicos R y T (Webster et al., 2002; Webster et al., 2003). En cromosomas con la mutación HbS se observó que el haplotipo Bantú está asociado al haplotipo R clásico mientras que el haplotipo Benín se encontró asociado al haplotipo T clásico definidos por los sitios de restricción y los ocho polimorfismos usados por Webster et al. (2002).

5.1.3.1.2 Motivo (AT) x Ny(AT) z en el HS2 LCR

La región control de locus (LCR) es la encargada de la regulación tiempo y tejido-específica de los genes del cluster de la β -globina. La LCR se encuentra localizada en el extremo 5' del cluster de genes de la β -globina de 6Kb a 22Kb del gen de la ϵ -globina y presenta cinco regiones hipersensitivas para la ADNasa I: HS1, HS2, HS3, HS4 y HS5. Estas cinco regiones presentan sitios de

unión para factores de transcripción que forman complejos que interaccionan con los promotores de los genes de las β -globinas y se ha demostrado que la región HS2 está involucrada en la expresión de los genes ϵ , γ y β (Li et al., 2002).

En la región HS2 se encuentra el motivo polimórfico $(AT)_xN_y(AT)_z$ el cual presenta distintas estructuras en los cromosomas con la hemoglobina S y se ha propuesto que variaciones en este motivo están asociadas a los niveles de severidad de la anemia falciforme en individuos homocigotas para la HbS (Oner et al., 1992). Cada uno de los haplotipos asociados a la HbS presenta una variante particular de este motivo: el haplotipo Bantú presenta el motivo $(AT)_8N_{12}(AT)_{11}$, el haplotipo Benín el motivo $(AT)_8N_{14}(AT)_7$, el haplotipo Senegal el motivo $(AT)_9N_{12}(AT)_{10}$ y el haplotipo Camerún el motivo $(AT)_8N_{12}(AT)_{12}$ (Oner et al., 1992; Zago et al., 2000; 2001).

5.1.3.1.3 Región ATxTy

Los haplotipos 5' y 3' se encuentran separados por una región de aproximadamente 9Kb que abarca el gen δ , la cual se encuentra en equilibrio de ligamiento con los haplotipos 5' y 3'. En esta región se demostró que existe un *hot-spot* de recombinación que presenta una tasa de recombinación de aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor a los valores promedio del genoma (Chakravarti et al., 1984; Schneider et al., 2002). En esta región se encuentran una serie de polimorfismos los cuales han dado evidencia adicional para la hipótesis del origen multicéntrico de la HbS. Cada uno de los haplotipos típicos asociados a la HbS presenta una única secuencia alélica. Respecto al motivo ATxTy las configuraciones son las siguientes: Bantú $(AT)_6T_9$, Benín $(AT)_8T_4$, Senegal $(AT)_8T_4$, Camerún $(AT)_8T_5$ y Arabe-Indio $(AT)_9T_5$. Otros polimorfismos (SNPs) alrededor de este motivo permiten diferenciar cada uno de los haplotipos típicos asociados a la HbS.

Todos estos datos indican que los cromosomas asociados a la HbS presentan una homogeneidad de secuencia dentro de cada grupo de haplotipos definidos por los haplotipos 5' y 3'. Esta homogeneidad observada en los

cromosomas con la mutación HbS no es observada en cromosomas sin la mutación, reflejando posiblemente el efecto de la selección sobre los individuos que la portan.

El trabajo de Webster y cols. (2003) mostró que los cromosomas con la mutación de la HbS y el haplotipo Bantú eran idénticos a nivel de secuencia alélica en el intervalo de 12,2 Kb estudiado. Otro estudio sobre la mutación que produce HbS asociada al haplotipo Senegal, donde se observa la diversidad alélica a nivel de secuencia en la región que abarca el *hot-spot* de recombinación, también muestra que estos cromosomas son idénticos, mientras que los que no tienen la mutación de la HbS presentan una diversidad mayor (Curat et al., 2002). Otro estudio en cromosomas con el haplotipo Bantú y Senegal en Jamaica y Nigeria mostró una homogeneidad de secuencia en un intervalo de aproximadamente 400Kb, lo cual no es observado en los cromosomas sin la mutación (Hanchard et al., 2007). Esta homogeneidad también fue observada en un trabajo en la población de Ghana donde esta homogeneidad de secuencia se extiende por 1,5 Mb a través del *hot-spot* de recombinación y no es observada en los cromosomas sin mutación (Ghansah et al., 2012).

5.1.3.2 Haplotipos ligados a la HbS en la población uruguaya

Hasta el momento, sólo se ha realizado en nuestro país un estudio tendiente a identificar los haplotipos de la β -globina en cromosomas portando la mutación que produce HbS. En diez cromosomas portando la mutación de la HbS en individuos afro-uruguayos, 20% presentaban haplotipos atípicos, 20% eran Benín y 60% eran Bantú (Da Luz et al., 2006). Estos resultados sugieren que el origen de la población afro-uruguaya es mayoritariamente del centro de África donde el haplotipo Bantú predomina, con aportes del oeste dada la presencia del haplotipo Benín. Estos resultados deben ser tomados con precaución debido al pequeño número de cromosomas analizados y a la elevada frecuencia de haplotipos atípicos.

De confirmarse la presencia de haplotipos atípicos, se plantea una situación ideal para el estudio de los mecanismos que los generan (recombinación, conversión génica, mutación). Estudios en otras poblaciones de diversos polimorfismos a lo largo del *cluster* de la β -globina han mostrado que estos haplotipos se forman por una variedad de mecanismos genéticos (recombinación, conversión génica, mutación). Además de estos mecanismos podemos investigar el rol que juega la recombinación, la mezcla poblacional y la deriva génica en la frecuencia de estos haplotipos. La recombinación en la población afro-uruguaya con aproximadamente un 50% de mezcla no-africana (Sans et al., 2002; Da Luz et al., 2010) podría estar generando las frecuencias observadas ya que en la mayoría de las poblaciones de afro-descendientes analizadas en otras regiones de América el aporte africano es mayor. Además no podemos descartar el efecto de la deriva génica y/o efectos fundadores en la elevada frecuencia de estos haplotipos. Estudios basados en los haplotipos ligados al alelo normal de la hemoglobina en Afro-Uruguayos ha mostrados que las poblaciones del norte y sur del país presentan diferencias significativas para estos haplotipos y que estas diferencias podrían ser explicadas por factores micro-evolutivos (Da Luz et al., 2010) (ver anexo 3).

Por otra parte, muchos de los haplotipos considerados como típicos (aproximadamente 3%) determinados por PCR-RFLP, en realidad presentan reordenamientos productos de los mecanismos antes mencionados (Zago et al., 2000; 2001) indicando que la determinación por PCR-RFLP puede subestimar parte de la diversidad de estos cromosomas.

5.1.4 Objetivo general

Determinar los haplotipos asociados a la HbS en la población uruguaya con el propósito de investigar el origen de estos cromosomas así como investigar los mecanismos que han influenciado en la actual composición haplotípica observa en la actualidad.

5.1.4.1 Objetivo específicos

- Determinar los haplotipos ligados a la mutación de la HbS en una muestra de individuos homocigotas y heterocigotas del Uruguay portando esta mutación.
- Investigar el origen de la población afro-uruguaya a partir de los haplotipos ligados a la HbS.
- Comparar la distribución y frecuencias de los haplotipos asociados a la mutación de la HbS observados en nuestra población con otras poblaciones mundiales.
- Corroborar o rechazar la elevada frecuencia de haplotipos atípicos observados en un estudio previo; de corroborarse, investigar cuales son los mecanismos que los generaron.

5.2 Muestra y Métodos

5.2.1 Muestra

Se obtuvieron un total de 40 muestras de sangre de individuos con la mutación HbS: 26 heterocigotas HbS/HbA, 8 homocigotas HbS/HbS y 5 heterocigotas compuestas HbS/ β -talasemia. De estas muestras, 26 corresponden a individuos no relacionados: 13 heterocigotas HbS/HbA, 8 homocigotas HbS/HbS y 5 heterocigotas compuestas HbS/ β -talasemia. Esto corresponde a 34 cromosomas no directamente relacionados y portando la mutación HbS: 18 de los heterocigotas (HbS/HbA y HbS/ β -talasemia) y 16 de los homocigotas (HbS/HbS).

Las muestras fueron obtenidas de pacientes que se atienden o se atendieron en el Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica del Centro Hospitalario Pereira Rossell, en el Hospital de Clínicas, en el Hospital Regional de Tacuarembó y otros derivados directamente por sus médicos tratantes con el propósito de realizar el diagnóstico molecular. Todos los pacientes habían sido diagnosticados en las instituciones de salud donde se atienden basándose en datos clínicos y en electroforesis de hemoglobina. Todos los individuos participantes en este estudio firmaron un consentimiento informado donde se les explicó el alcance de este estudio y acordaron participar en él.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Obtención de la muestra de sangre y extracción de ADN

A todos los individuos que participaron en este estudio se les extrajo 5ml de sangre periférica por punción venosa. A partir de la misma se obtuvo el ADN utilizando protocolos estandarizados de extracción salina y precipitación con etanol absoluto (Sambrook et al., 1989).

5.2.2.2 Confirmación molecular de las mutación de HbS

Se amplificaron dos segmentos del gen de la β -globina por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores P1, P5, P58 y P7 de acuerdo a condiciones descritas previamente (Miranda et al., 1997; Kimura et

al., 2003). El primer segmento, que abarca los exones 1 y 2 más el intrón 1 y la porción 5' del intrón 2, fue amplificado con los cebadores P1 y P5 mientras que el exón 3, la porción 3' del intrón 2 y la porción 5' del 3' UTR fueron amplificados con los cebadores P6 y P7 (ver Figura 3)



Figura 3. Representación del gen de la β -globina y posición de los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.

La presencia de la mutación HbS se determinó por digestión con la enzima de restricción *DdeI* del producto de PCR amplificado con los cebadores P1 y P5. La presencia de la mutación HbS (GAG→GTG) elimina un sitio de restricción para la enzima *DdeI*. Esta enzima reconoce el sitio CTNAG presente en los cromosomas sin la mutación de la HbS (CTGAG), el cual es perdido por la mutación de la HbS (CTGTG). La digestión con esta enzima no distingue entre HbS y HbC ya que en esta última mutación el cambio es GAG→GAA el cual tampoco es reconocido por la enzima generándose la pérdida del sitio de corte, pero junto a los datos clínicos y de laboratorio (electroforesis de hemoglobina) es posible distinguir entre las dos hemoglobinas. En la Figura 4 se muestra el mapa de restricción con la enzima *DdeI* del producto amplificado con los cebadores P1 y P5.

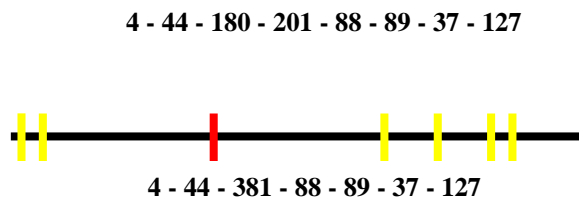


Figura 4. Mapa del amplicón con los fragmentos observados cuando se digiere con la enzima de restricción *DdeI*. En rojo se muestra la mutación la cual elimina un sitio de restricción. En la parte superior se muestran los fragmentos generados en un cromosoma sin la mutación, y en la parte inferior los fragmentos de un cromosoma con la mutación. En los cromosomas con la mutación se genera un fragmento de 381 pb debido a la pérdida del sitio de restricción marcado en rojo.

Con el propósito de determinar la presencia de otras mutaciones, los productos de PCR se purificaron con métodos comerciales (*QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen*) y luego fueron secuenciados con los mismos cebadores utilizados para la PCR en el Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT). La secuencia de los cebadores y las condiciones de la PCR se muestran en el anexo 1.

5.2.2.3 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.

5.2.2.3.1 Haplotipos 5' y 3'

Los seis sitios polimórficos que determinan el haplotipo 5' fueron determinados por PCR-RFLP de acuerdo a condiciones descritas previamente (Bevilaqua et al., 1995). Estos son: a) *HincII*, 5' del gen del gen ϵ ; b) *HindIII*, en el intrón dos del gen $^G\gamma$; c) *HindIII*, en el intrón dos del gen $^A\gamma$; d) *HincII*, en el pseudogén $\Psi\beta$; e) *HincII*, en la región 3' del pseudogén $\Psi\beta$ y f) *Hinfl* en la región 5' del gen β . Los polimorfismos que determinan el haplotipo 3' fueron determinados a partir de la lectura de los datos de secuenciación del gen de la β -globina. Los polimorfismos analizados fueron: a) codón 2 (C/T), b) IVS-II-16 (C \rightarrow G), c) IVS-II-74 (G \rightarrow T) y d) IVS-II-81 (C \rightarrow T). Los polimorfismos IVS-II-666 (T \rightarrow C) y el sitio *Hinfl* 3' del gen de la β -globina se encuentra fuera de los dos segmentos amplificados para la secuenciación por lo que no fueron determinados. Sin embargo con los cuatro polimorfismos leídos con los datos de secuenciación podemos determinar los cuatro haplotipos descritos en la mayoría de las poblaciones: haplotipo I o A (C C G C T +), haplotipo II o B (C C T C T -), haplotipo III-asiático o C (T G T C C +) y el haplotipo III o D (T G T T C +).

5.2.2.3.2 Región R/T

La región R/T se encuentra ubicada en una sección no codificante 5' del gen de la δ -globina. Existen dos tipos de secuencias denominadas R y T las cuales difieren en la presencia-ausencia de dos sitios de restricción para las enzimas *RsaI* y *TaqI*. La secuencia tipo R presenta la siguiente configuración

(*RsaI* +, *TaqI* -) y la región T (*RsaI*-, *TaqI*+) donde + y - significan presencia y ausencia de sitios de restricción para las enzimas *RsaI* y *TaqI* respectivamente. La determinación de los dos tipos de secuencias se realizó por amplificación de los dos segmentos conteniendo estos sitios y posterior digestión con las enzimas correspondientes. La región conteniendo el sitio polimórfico *RsaI* fue amplificada con los cebadores FRTN4 y BRTR*RsaI* mientras que la región conteniendo el sitio polimórfico *TaqI* con los cebadores FRTT*TaqI* y BRTT*TaqI* de acuerdo a condiciones previamente descritas (Webster et al., 2003).

Una vez clasificados los tipos R y T se amplificó un fragmento de la región R/T por PCR alelo específico usando un cebador directo común (RTRG). Para amplificar las secuencias de tipo R se usó el cebador reverso RTRG y para las secuencias de tipo T el cebador reverso RTRC. Estos dos cebadores distinguen un SNP (G/C). La variante G de este polimorfismo está presente en la secuencia tipo R mientras que la variante C en la secuencia tipo T. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a condiciones previamente descritas (Webster et al., 2002) y los productos fueron posteriormente purificados con métodos comerciales (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) y secuenciados con los mismos cebadores utilizados para la PCR en el Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT). La secuencia de los cebadores y las condiciones de la PCR se muestran en el anexo 1. En la Figura 5 se representa la región R/T y la posición de los cebadores usados para el PCR-RFLP y para la amplificación de los productos a ser secuenciados.

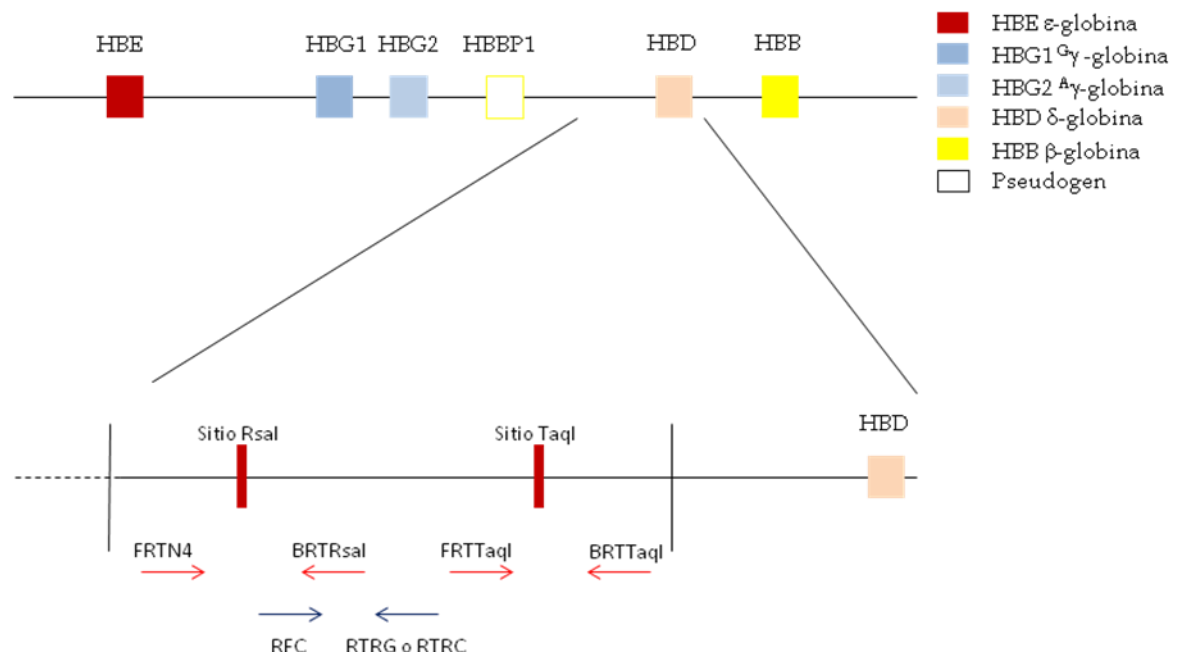


Figura 5. Representación del cluster de genes de la β -globina y magnificación de la región R/T. Las dos líneas verticales definen los límites de la región R/T de acuerdo a Maeda et al. (1983). Los rectángulos rojos esta región indican la ubicación de los sitios de corte para las enzimas *RsaI* y *TaqI*. Debajo de la región R/T, en rojo se representan los cebadores usados para el PCR-RFLP y en azul para la amplificación del producto a ser secuenciado.

5.2.2.3.3 HS2LCR

La región denominada HS2 del LCR (*locus control region*) presenta un motivo polimórfico $(AT)_xN_y(AT)_z$ donde los sub-índices denotan el número variables de repetidos AT y el número variable de nucleótidos entre los dos repetidos. La región conteniendo este motivo polimórfico fue amplificado con los cebadores HS2F y HS2R de acuerdo a condiciones previamente descritas (Kukreti et al., 2002). Este producto fue digerido con las enzimas de restricción *Hinfl* y *Ddel* y separado por electroforesis en acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes por 4 horas. La digestión produce tres fragmentos de tamaño constante de 47pb, 86pb y 195pb y un fragmento de tamaño variable (125pb-135pb) que depende del número de repetidos en el motivo $(AT)_xN_y(AT)_z$. Los haplotipos de tipo Bantú $[(AT)_8N_{12}(AT)_{11}]$ y Senegal $[(AT)_9N_{12}(AT)_{10}]$ presentan un fragmento de 131 pb, el haplotipo Benín $[(AT)_8N_{14}(AT)_7]$ un fragmento de 125pb y el haplotipo Camerún $[(AT)_8N_{12}(AT)_{12}]$ un fragmento de 133pb. Para

distinguir entre los haplotipos Bantú y Senegal y confirmar configuraciones atípicas observadas en la electroforesis los productos amplificados fueron secuenciados con los mismos cebadores usados en la amplificación. En el anexo 1 se presentan las condiciones de la PCR. La Figura 6 muestra el mapa de la región del HS2LCR.

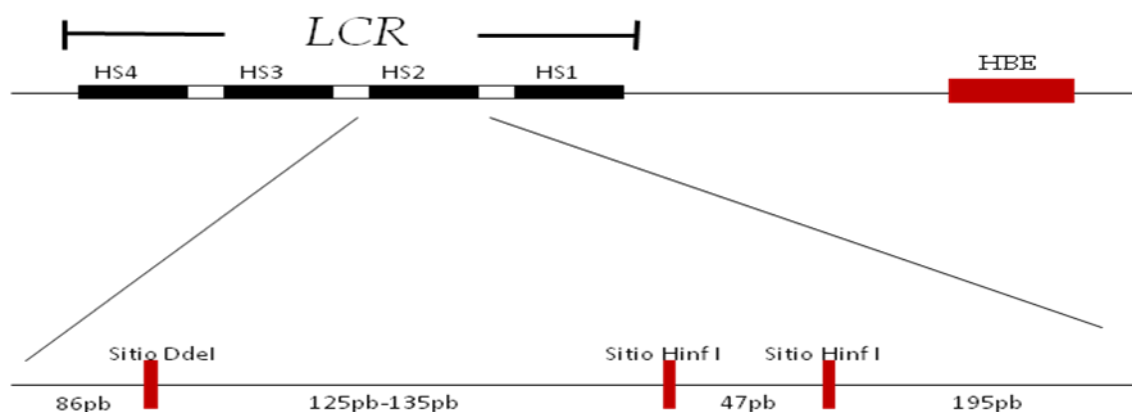


Figura 6. Representación del LCR del cluster de genes de la β -globina y magnificación del HS2. Los rectángulos rojos indican los sitios de corte para las enzimas *DdeI* y *HinfI*. Debajo se indican los tamaños esperados luego de la digestión con estas enzimas.

5.2.2.3.4 Región ATxTy

Esta región se encuentra aproximadamente a 500 pb en dirección 5' del gen de la β -globina. En esta región, en la posición -530 respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen HBB, se encuentra un motivo polimórfico denominado ATxTy además de una serie de polimorfismo alrededor de este sitio en las posiciones -551 (T/C), -543 (C/T), -521 (C/T) y -491 (A/C). Para la obtención de datos de secuencia a nivel alélico, se amplificó un fragmento de 1321 pb por PCR alelo específico usando un cebador directo común (H9) y dos cebadores reversos (*DdeI*- y *DdeI*+). El cebador *DdeI*- presenta en su extremo 3' una A la cual le permite reconocer el alelo con la mutación de la HbS mientras que el cebador *DdeI*+ presenta una T que le permite reconocer el alelo sin la mutación de la HbS. Los productos amplificados fueron purificados con métodos comerciales (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) y luego fueron secuenciados en el Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT) con un cebador interno denominado *Seq*. En los individuos homocigotas para la HbS la

secuencia alélica fue determinada por la presencia de homocigosis o por comparación con datos de secuencia de un familiar directo (padre, madre o hijo). Debido a la baja eficiencia y presencia de productos inespecíficos no se pudieron obtener datos a nivel de secuencia alélica de los cromosomas sin la mutación de la HbS. La Figura 7 muestra el mapa de la región ATxTy

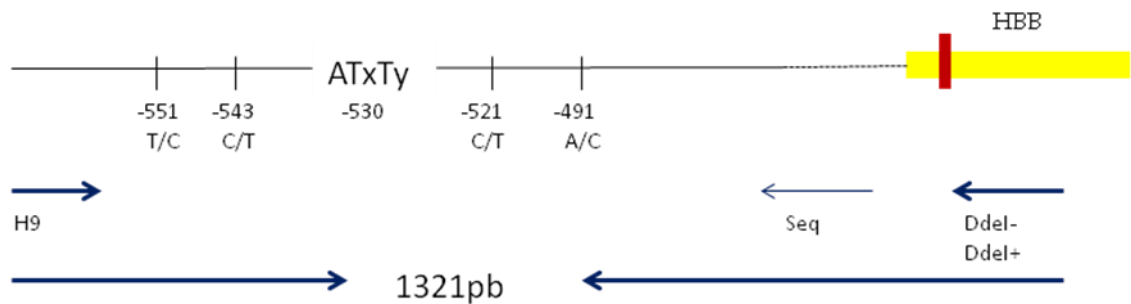


Figura 7. Representación de la región ATxTy. En la posición -530 respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen HBB se encuentra el motivo ATxTy. También se representan cuatro *SNPs*, dos a cada lado del motivo ATxTy. El rectángulo rojo indica el sitio de la mutación HbS y las flechas indican la posición de los cebadores usados y el tamaño del amplicón.

5.2.2.4 Análisis genético y estadístico

5.2.2.4.1 Cálculo de frecuencias alélicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Las frecuencias alélicas se calcularon por el método de conteo directo y para testar el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el procedimiento descrito por Guo y Thompson (1992). El desequilibrio de ligamiento se analizó a partir de los datos genotípicos por medio del estadístico *S* que es el logaritmo del cociente de probabilidades asumiendo que hay equilibrio de ligamiento y que no lo hay (Excoffier y Slatkin, 1998). El equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento se analizaron con el *software* Arlequin 2005 v.3.1 (Excoffier et al., 2005).

5.2.2.4.2 Determinación de los haplotipos

Se construyeron haplotipos basados en los polimorfismos determinados, identificándose en primer lugar los haplotipos 5' y 3' en los individuos homocigotas para los marcadores utilizados. En los individuos que presentaban heterocigosis para algunos de los polimorfismos que definen el haplotipo 5' y 3' primero se compararon con muestras de familiares directos y si este procedimiento no permitía asignar inequívocamente los haplotipos asumimos que el haplotipo asociado a la HbS era uno de los haplotipos típicos asociados a esta mutaciones (Bantú, Benín, Senegal, Camerún y Árabe-Indio). Esta estrategia ya fue usada previamente (Kulozik et al., 1986; Long et al., 1990; Castro De Guerra et al., 1997; Vivenes De Lugo et al., 2003). La nomenclatura usada para la denominación de los haplotipos es la de Shimizu et al. (2001). Para la construcción de los haplotipos extendidos con las distintas regiones analizadas primero se construyeron los haplotipos 5' y 3' y luego se fueron asignando las otras regiones usando la misma estrategia mencionada para los haplotipos 5' y 3'.

5.2.2.4.3 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de la región R/T y de la región ATxTy fueron visualizadas con el *software* BioEdit y alineadas con el software MEGA versión 5.05 (ver Anexo 2) (Tamura et al., 2011).

5.2.2.4.4 Variación intra-poblacional, inter-poblacional y comparación con otras poblaciones

A partir de los datos haplotípicos se calcularon las distancias genéticas F_{ST} en nuestra muestra y en muestras de otras poblaciones usando el *software* Arlequin 2005 v3.1 (Excoffier et al., 2005). La significancia de los valores de F_{ST} fue estimada por 10000 permutaciones. La relación entre las poblaciones analizadas fue representada por medio de dendrogramas por el método *Neighbor Joining* (NJ) usando el software MEGA versión 5.05 (Tamura et al. 2011). En la Tabla 2 se muestran las poblaciones usadas en las comparaciones. Todas las poblaciones americanas son clasificadas como Afro-descendientes,

con excepción de la población de Sucre-Anzoategui la cual de todas maneras presenta una importante mezcla con poblaciones de origen africano (Vivenes de Lugo et al. 2003)

Tabla 2. Poblaciones con las cuales se comparó la población uruguaya.

Poblaciones	N		Referencias
	HbS	HbA	
<u>América</u>			
Brasil Amazonia	20	132	(Pante-De-Sousa et al., 1999)
Brasil Para	59		(Figueiredo et al., 1994; Pante de Sousa et al., 1998)
Brasil Bahia	42		(Figueiredo et al., 1994)
Brasil R Preto	67		(Zago et al., 1992; Figueiredo et al., 1994)
Brasil Campinas	142		(Goncalves et al., 1994)
Venezuela Aragua	94		(Moreno et al., 2002)
Venezuela Sucre-Anzoategui	42	74	(Vivenes De Lugo et al., 2003)
Venezuela Panaquire		96	(Castro De Guerra et al., 1997)
Colombia (oeste)	92		(Cuellar-Ambrosi et al., 2000)
Colombia	33		(Duran et al., 2012)
Cuba	198		(Muniz et al., 1995)
México		312	(Magana et al., 2002)
Jamaica	93		(Antonarakis et al., 1984)
Guadalupe	252		(Keclard et al., 1996)
Panamá	200		(Rusanova et al., 2011)
Afro EEUU	76		(Antonarakis et al., 1984)
Afro-Sur Uruguay		40	(Da Luz et al., 2010)
Afro-Norte Uruguay		52	(Da Luz et al., 2010)
Beta tal		53	Este trabajo
<u>Indígenas americanos</u>			
Aché		164	(Callegari-Jacques et al., 2007)
Guaraní		152	(Callegari-Jacques et al., 2007)
Kaingang		108	(Callegari-Jacques et al., 2007)
<u>Europa</u>			
Inglaterra		37	(Long et al., 1990)
Italia		84	(Long et al., 1990)
Grecia		39	(Long et al., 1990)
Chipre		82	(Long et al., 1990)
<u>Asia</u>			
India	46	358	(Kulozik et al., 1986; Varawalla et al., 1992)
Arabia	55		(Kulozik et al.; 1986)
Palestina	118		(Samarah et al., 2009)
Sur de China		211	(Shimizu et al., 2001)
Norte de China		48	(Chen et al., 1990)
Tailandia		97	(Shimizu et al., 2001)
Camboya		65	(Shimizu et al., 2001)
Japón		178	(Shimizu et al., 2001)
Corea		142	(Shimizu et al., 2001)
<u>Oceanía</u>			
Melanesia (Tierras bajas)		424	(Chen et al., 1990)
Melanesia (Tierras altas)		38	(Chen et al., 1990)
<u>África</u>			
Nigeria	34	35	(Kulozik et al.; 1986; Long et al., 1990)
Senegal	56	296	(Pagnier et al., 1984; Currat et al., 2002)
Benín	20	30	(Pagnier et al., 1984; Long et al., 1990)
Kenia		46	(Webster et al., 2003)
Ex CAR (República Centro-Africana)	28		(Pagnier et al., 1984)
Bantú		45	(Shimizu et al., 2001)
KungSan		42	(Shimizu et al., 2001)
Mauritania	87		(Veten et al., 2012)
Argelia	20	70	(Pagnier et al., 1984; Shimizu et al., 2001)
Túnez	332		(Imen et al., 2011)

N. Número de cromosomas

5.3 Resultados

La presencia de la mutación de la HbS fue confirmada molecularmente en todos los pacientes.

5.3.2 Polimorfismos del cluster de genes de la β -globina.

En la Tabla 3 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de los 8 polimorfismos de restricción analizados y de los 4 SNPs que determinan el haplotipo 3'. Dos de los sitios analizados no se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (*RsaI* y *TaqI*) y el sitio 5' $\Psi\beta$ *HincII* resultó monomórfico no observándose la presencia de corte para la enzima de restricción.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en la muestra de pacientes con HbS (HbS/HbS, HbS/ β -Tal y HbS/HbA)

Sitio polimórfico	N	Genotipo	Frecuencias genotípicas		Frecuencias alélicas	Equilibrio de Hardy-Weinberg <i>P</i>
ϵ - <i>HincII</i>	26	+/+	2 (0,077)	+	12 (0,231)	0,57864
		+/-	8 (0,308)			
		-/-	16 (0,616)	-	40 (0,769)	
γ^G - <i>HindIII</i>	26	+/+	8 (0,308)	+	26 (0,500)	0,25944
		+/-	10 (0,384)			
		-/-	8 (0,308)	-	26 (0,500)	
γ^A - <i>HindIII</i>	26	+/+	0 (0,000)	+	3 (0,058)	1,0000
		+/-	3 (0,115)			
		-/-	23 (0,885)	-	49 (0,942)	
<i>RsaI</i> R/T	26	+/+	17 (0,654)	+	37 (0,712)	0,00043
		+/-	3 (0,115)			
		-/-	6 (0,231)	-	15 (0,288)	
<i>TaqI</i> R/T	26	+/+	5 (0,192)		15 (0,288)	0,00986
		+/-	5 (0,192)			
		-/-	16 (0,616)		37 (0,712)	
5' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	26	+/+	0 (0,000)	+	0 (0,000)	
		+/-	0 (0,000)			
		-/-	26 (0,778)	-	52 (1,000)	
3' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	26	+/+	2 (0,077)	+	13 (0,250)	0,62547
		+/-	9 (0,346)			
		-/-	15 (0,577)	-	39 (0,750)	
5' β - <i>Hinfl</i>	26	+/+	5 (0,192)	+	22 (0,423)	1,00000
		+/-	12 (0,462)			
		-/-	9 (0,346)	-	30 (0,577)	
β -Codón2	26	CC	25 (0,962)	C	51 (0,981)	1,00000
		CT	1 (0,038)			
		TT	0 (0,000)	T	1 (0,019)	
β -IVS-II-16	26	CC	24 (0,923)	C	50 (0,962)	1,00000
		CG	2 (0,077)			
		GG	0 (0,000)	T	2 (0,038)	
β -IVS-II-74	26	GG	12 (0,462)	G	35 (0,673)	1,00000
		GT	11 (0,423)			
		TT	3 (0,115)	T	17 (0,327)	
β -IVS-II-81	26	CC	24 (0,924)	C	49 (0,942)	0,06035
		CT	1 (0,038)			
		TT	1 (0,038)	T	3 (0,058)	

5.3.3 Equilibrio de ligamiento

Se consideró como hipótesis nula que los 12 sitios polimórficos analizados se encuentran en equilibrio de ligamiento, estableciéndose un nivel de significancia de $p \geq 0,05$, rechazándose la hipótesis de equilibrio si la p es menor a 0,05. En la Tabla 4 se presentan los resultados.

Tabla 4. Equilibrio de ligamiento a partir de los datos genotípicos.

	ϵ - <i>HincII</i>	γ^G - <i>HindIII</i>	γ^A - <i>HindIII</i>	R/T <i>RsaI</i>	R/T <i>TaqI</i>	5' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	3' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	5' β - <i>Hinfl</i>	Codón 2	IVS- II-16	IVS- II-74	IVS- II-81
ϵ - <i>HincII</i>		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
γ^G - <i>HindIII</i>	+		+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
γ^A - <i>HindIII</i>	-	+		-	-	-	+	-	-	-	-	-
R/T <i>RsaI</i>	-	+	-		+	-	+	-	-	-	+	-
R/T <i>TaqI</i>	-	+	-	+		-	+	-	-	-	+	-
5' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3' $\Psi\beta$ - <i>HincII</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5' β - <i>Hinfl</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Codón 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IVS-II-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IVS-II-74	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
IVS-II-81	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

+ Probabilidad de equilibrio de ligamiento menor a 0,05. - Probabilidad de equilibrio de ligamiento mayor a 0,05

Aunque la mayoría de los sitios analizados se encuentran en equilibrio de ligamiento, observamos algunos sitios en los que el desequilibrio de ligamiento se extiende a través del *hot-spot* de recombinación ubicado entre el sitio 3' $\Psi\beta$ -*HincII* y el sitio IVS-II-16 (γ^G -*HindIII*, *RsaI* y *TaqI*).

5.3.3 Haplotipos 5' y 3'

En las Tablas 5 y 6 se muestran los haplotipos 5' y 3' asociados a los cromosomas con la mutación de la HbS y a los cromosomas sin la mutación excluyendo a los sitios *RsaI* y *TaqI*.

La mayoría de los haplotipos asociados a la mutación HbS son del tipo Bantú (64,71%), seguido a menor frecuencia por el tipo Benín (23,53%). Cuatro cromosomas presentan haplotipos atípicos, lo cual representa un 11,6%. De los

cuatro cromosomas, uno presenta el haplotipo 5' de tipo Benín y un haplotipo 3' atípico, mientras que los otros 3 presentan haplotipos 5' atípicos. De estos 3, uno presenta un haplotipo 3' de tipo Bantú, otro Benín y el otro un haplotipo 3' atípico.

Tabla 5. Haplotipos 5' y 3' asociados a la mutación de la HbS.

	Sub-haplotipo 5'						Sub-haplotipo 3'				N ¹	%	
	ϵ - <i>HincII</i>	γ G- <i>HindIII</i>	γ^A - <i>HindIII</i>	5' Ψ β - <i>HincII</i>	3' Ψ β - <i>HincII</i>	5' β - <i>Hinfl</i>	Codón 2	IVS- II-16	IVS- II-74	IVS- II-81			
Bantú	-	+	-	-	-	-	A	C	C	G	C	22	64,71
Benín	-	-	-	-	+	-	B	C	C	T	C	8	23,53
Atípicos													
Benín*	-	-	-	-	+	-		C	C	G	T	1	2,94
2 ⁺ *	+	-	-	-	-	-		C	C	T	T	1	2,94
22	-	-	-	-	-	-	B	C	C	T	C	1	2,94
43	+	+	-	-	-	-	A	C	C	G	C	1	2,94
Total												34	100

¹Número de cromosomas* El haplotipo 5' es del tipo Benín pero el haplotipo 3' presenta una configuración atípica * El haplotipo 3' presenta una configuración atípica en la posición IVS-II-81

Aunque el número de cromosomas analizados sin la mutación de la HbS es menor se observa un mayor número de haplotipos en estas cromosomas (9 vs 6). Los haplotipos más frecuentes son el 1 y el 2 representando el 50% de los haplotipos observados. Estos son dos haplotipos característicos de poblaciones europeas, asiáticas y amerindias. Los haplotipos 8 y 9 aunque presentes en la mayoría de las poblaciones son más frecuentes en poblaciones africanas y el haplotipo 15 es característico de africanos. Los haplotipos 21, 22 y 23 son característicos de poblaciones amerindias y asiáticas (Chen et al., 1990; Long et al., 1990; Shimizu et al., 2001).

Tabla 6. Haplotipos 5' y 3' asociados a los cromosomas sin mutación de la HbS.

	Haplotipo 5'						Haplotipo 3'				N ¹	%	
	ϵ - <i>HincII</i>	γ G- <i>HindIII</i>	γ^A - <i>HindIII</i>	5' Ψ β - <i>HincII</i>	3' Ψ β - <i>HincII</i>	5' β - <i>Hinfl</i>	Codón 2	IVS- II-16	IVS- II-74	IVS- II-81			
1	+	-	-	-	-	+	A	C	C	G	C	5	27,7
1 ⁺	+	-	-	-	-	+		C	C	G	T	1	5,6
2	+	-	-	-	-	+	B	C	C	T	C	4	22,1
8	-	+	+	-	+	+	A	C	C	G	C	2	11,1
9	-	+	+	-	+	+	B	C	C	T	C	1	5,6
15	-	-	-	-	+	+	A	C	C	G	C	1	5,6
21	-	-	-	-	-	+	A	C	C	G	C	1	5,6
22	-	-	-	-	-	+	B	C	C	T	C	2	11,1
23	-	-	-	-	-	+	C	T	G	T	C	1	5,6
Total												18	100

¹Número de cromosomas *El sub-haplotipo 3' presenta una configuración atípica en la posición IVS-II-81

5.3.4 Región R/T

Los haplotipos *RsaI/TaqI* observados en nuestra muestra son presentados en la Tabla 7 junto los datos de otras poblaciones. Al igual que lo observado en las otras poblaciones mundiales observamos que dos haplotipos (+ - y - +) representan la mayoría de los haplotipos observados, aunque en nuestra muestra observamos un predominio del tipo R similar a lo observado en poblaciones asiáticas y en la población africana de Malawi.

Tabla 7. Haplotipos *RsaI/TaqI* en la muestra analizada y en varias poblaciones mundiales.

Haplotipos		África ¹				Asia ¹			Europa ¹
<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>	Uruguay	Kenia	Costa de Marfil	Malawi	Mongolia	Tailandia	PNG	Reino Unido
+	-	36 (69,3%)	88 (54,3%)	61 (49,2%)	122 (64,9%)	45 (64,1%)	141 (76,6%)	67 (74,4%)	30 (45,5%)
-	-	12 (23,1%)	72 (44,4%)	63 (50,8%)	63 (33,5%)	22 (32,4%)	43 (23,4%)	21 (23,3%)	36 (54,5%)
+	+	2 (3,8%)	2 (1,23%)	0(0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	2 (2,3%)	0 (0,0%)
-	-	2 (3,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0(0,0%)
Cromosomas		52	162	124	188	68	184	90	66

¹ (Webster et al., 2002)

Los cromosomas con la mutación HbS y con el haplotipo 5' Bantú presentaron en su mayoría (20 de 22) un haplotipo de tipo R (+ -), uno un haplotipo atípico (+ +) y otro un haplotipo T (- +). El haplotipo atípico + + presentaba a nivel de secuencia un perfil de haplotipo R, mientras que el cromosoma Bantú con el haplotipo T a nivel de secuencia presentaba un haplotipo T. Los 9 cromosomas con un haplotipo 5' del tipo Benín presentaron un haplotipo T (- +) el cual también se observaba a nivel de secuencia (Tabla 8).

Tabla 8. Haplotipos *RsaI/TaqI* y haplotipos de secuencia asociados a la mutación de la HbS

Haplotipos 5' y 3'	Haplotipos <i>RsaI/TaqI</i>		Secuencia de referencia Genbank												
			C	(GT) ₃	T	C	T	A	C	T	T	A	G		
Bantú	R	+	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	20	
		+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
	T	-	+	*	(GT) ₂	*	*	G	*	*	A	C	*	C	1
Benín	T	-	+	*	(GT) ₂	*	*	G	*	*	A	C	*	C	9
	2*	R	+	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
	22	T	-	+	*	(GT) ₂	*	*	G	*	A	C	*	C	1
43	R	+	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
Cromosomas													34		

En los cromosomas con haplotipos 5' atípicos la presencia de un haplotipo R o T a nivel de sitios de restricción se correlacionaba con el mismo haplotipo a nivel de secuencia alélica.

Tabla 9. Haplotipos RsaI/TaqI y haplotipos de secuencia asociados a los cromosomas sin la mutación de la HbS

Haplotipos 5' y 3'	Haplotipos RsaI/TaqI		Secuencia de referencia Genbank												
			C	(GT) ₃	T	C	T	A	C	T	T	A	G		
1	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	4
		- -	*	(GT) ₂	*	*	G	*	*	A	C	*	C	1	
1*	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
2	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	4	
8	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	2	
9	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
15		- -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
21	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
22		+ +	*	(GT) ₂	*	*	G	*	*	A	C	*	C	1	
	T	- +	*	(GT) ₂	*	*	G	*	*	A	C	*	C	1	
23	R	+ -	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	
Cromosomas													18		

La mayoría de los cromosomas sin la mutación de la HbS (Tabla 9) presentaron haplotipos R a nivel de sitios de restricción y a nivel de secuencia. Solo tres cromosomas presentaron un haplotipo T a nivel de secuencia de los cuales uno presentaba el patrón de restricción T (- +) mientras que los otros dos presentaron el patrón + + y - -. El otro cromosoma con el patrón de restricción - - presentó un haplotipo de secuencia tipo R. Aunque se observaron haplotipos atípicos a nivel de sitios de restricción, a nivel de secuencia alélica solamente se observaron los tipos clásicos R y T (Webster et al., 2002).

5.3.5 HS2LCR

En la Tabla 10 se presenta la asociación del polimorfismo [(AT)_xN_y(AT)_z] con los haplotipos 5' y 3' en los cromosomas con la mutación HbS. Tres de los cromosomas con la mutación HbS no pudieron ser analizados para este polimorfismo, 2 que presentaban el haplotipo Bantú y uno el haplotipo Benín.

Todos los cromosomas con el haplotipo Bantú presentaron la configuración AT₈N₁₂AT₁₁. la cual es la configuración típica asociada a este haplotipo. En los cromosomas con el haplotipo Benín solo 4 presentaron la

configuración típica asociada a este haplotipos. Tres presentaron una configuración del tipo Bantú y uno presentó una configuración atípica AT₉N₁₂AT₁₂.

Tabla 10. Configuración del HS2 LCR en cromosomas asociados a los cromosomas con la mutación de la HbS

Haplotipos 5' y 3'	HS2LCR [(AT) _x N _y (AT) _z]			
	AT ₈ N ₁₄ AT ₇	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₂	AT ₉ N ₁₂ AT ₁₁
Bantú		20		20
Benín	4	3	1	8
2*		1		1
22		1		1
43				1
Cromosomas	4	25	2	31

En los cromosomas sin la mutación de la HbS pudimos analizar solamente 15 de los 18 cromosomas. Sin embargo se observa una diversidad mayor de configuraciones (Tabla 11), observándose 9 configuraciones distintas siendo la más frecuente AT₈N₁₂AT₁₃ mientras que las restantes se observan en uno o dos cromosomas.

Tabla 11. Configuración del HS2 LCR en cromosomas asociados a los cromosomas sin la mutación de la HbS

Haplotipos 5' y 3'	HS2LCR [(AT) _x N _y (AT) _z]								
	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₂	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₃	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₄	AT ₉ N ₁₂ AT ₁₀	AT ₉ N ₁₂ AT ₁₂	AT ₁₀ N ₁₂ AT ₁₀	AT ₁₀ N ₁₂ AT ₁₁	AT ₁₀ N ₁₂ AT ₁₂
	1			1	1				1
1*						1			
2	1	1	2						
8	1								
15			1						
21		1							
22					1		1		
23			1						
Cromosomas	2	2	5	1	1	1	1	1	1

5.3.6 Región ATxTy

La región ATxTy pudo ser analizada solamente en 22 cromosomas con la mutación HbS debido a problemas en el PCR alelo específico usado para amplificar esta región.

Los 14 cromosomas con el haplotipo 5' y 3' Bantú presentaron un mismo haplotipo de secuencia para la región analizada, el cual es el que se ha descrito usualmente asociado a este haplotipo. Para los cromosomas con el haplotipo 5' y 3' de tipo Benín, el haplotipo de secuencia observado es el típico de este

haplotipo. El cromosoma con el haplotipo atípico 22 presenta un haplotipo de secuencia de tipo Benín (Tabla 12).

Tabla 12. Región ATxTy en relación a los haplotipos 5' y 3' en cromosomas con la mutación de la HbS.

Haplotipos 5' y 3'	Referencia GenBank					
	-551	-543	-530 ATxTy	-521	-491	
	T	C	7/7	C	A	
Bantú	C	*	6/9	*	*	14
Benín	*	T	4/8	*	C	7
22	*	T	4/8	*	C	1
Cromosomas						22

5.3.7 Haplotipos atípicos

Cuando observamos todas las regiones analizadas encontramos 8 cromosomas con haplotipos atípicos, tres que presentaban haplotipos atípicos para el haplotipo 5' y 3', uno con un haplotipo 5' de tipo Benín y un haplotipo 3' atípico y cuatro que presentan un haplotipo 5' y 3' de tipo Benín y la configuración en el HS2 LCR es atípica (Tabla 13).

Tabla 13. Haplotipos atípicos en los cromosomas con la mutación HbS teniendo en cuenta todas las regiones analizadas.

	HS2LCR ATxNyATz	Haplotipo 5'	Región R/T	Región ATxTy					Haplotipo 3'			
1	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	----+-	T	T	T	4/8	T	C	C	C	T	C
2	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	----+-	T	T	T	4/8	T	C	C	C	T	C
3	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	----+-	T	T	T	4/8	T	C	C	C	T	C
4	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₂	----+-	T			ND			C	C	T	C
5	ND	----+-	T			ND			C	C	G	T
6	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	+----+	R			ND			C	C	T	T
7	AT ₈ N ₁₂ AT ₁₁	-----	T	T	T	4/8	T	C	C	C	T	C
8	AT ₉ N ₁₂ AT ₁₁	++----	R			ND			C	C	G	C

Los cromosomas 1, 2, 3 difieren del tipo Benín solamente en la región del HS2 LCR, en el cual presentan una configuración de tipo Bantú. El cromosoma numerado como 4 también difiere solamente en la región del HS2 LCR, presentando una configuración del tipo Camerún. El cromosoma 5 difiere del tipo Benín en el haplotipo 3' donde se observa una configuración atípica. El cromosoma 6 presenta una configuración en el HS2 LCR y en la región R/T del tipo Bantú pero el haplotipo 5' y 3' son atípicos, mientras que el cromosoma 7 presenta una configuración en el HS2 LCR de tipo Bantú, la región R/T, ATxTy

y el haplotipo 3' de tipo Benín y el haplotipo 5' atípico. Finalmente el cromosoma 8 presenta la región R/T y el haplotipo 3' de tipo Bantú mientras que el resto de los polimorfismos analizados son atípicos.

5.3.8 Comparación con otras poblaciones

Para comparar los haplotipos asociados a los cromosomas con y sin la mutación de la HbS usamos solamente los haplotipos construidos con los cinco primeros sitios del haplotipo 5' ya que estos son los que se han usado más ampliamente y por lo tanto de los cuales se tienen más datos poblacionales.

5.3.8.1 Haplotipos asociados a la HbS

En la Tabla 14 se presentan las frecuencias de haplotipos asociados a la HbS en varias poblaciones mundiales de África, Asia y América. Aunque se observan 14 haplotipos diferentes, los cinco haplotipo clásicos: Bantú (- + - - -), Benín (- - - + -), Senegal (- + - + +), Camerún (- + + - +) y Arabé-Indio (+ + - + +) mas el haplotipo 1 (+ - - - -) explican la mayor parte de los haplotipos observados.

En la Tabla 15 se presentan las distancias F_{ST} calculadas a partir de las frecuencias de haplotipos asociados a los cromosomas con la mutación HbS de las poblaciones de la Tabla 14.

Las menores distancias observadas de Uruguay con las poblaciones africanas es con la población de la ex República Centro Africana (ex CAR) la cual presenta frecuencia elevadas del haplotipo Bantú mientras que con las demás poblaciones africanas y asiáticas son con las que se observan las mayores distancias.

Respecto a las poblaciones americanas las menores distancias son con las poblaciones que presentan frecuencias elevadas del haplotipo Bantú (Panamá, Venezuela 2 o Sucre-Anzoategui, Colombia 1 región oeste y las poblaciones de Brasil con la excepción de Amazonia) mientras que las mayores distancias son

con poblaciones que presentan frecuencias elevadas del haplotipo Benín (poblaciones americanas del Caribe) o del haplotipo Senegal (Amazonia).

Tabla 14. Haplotipos 5' asociados a la hemoglobina S en Uruguay y en varias poblaciones mundiales

	++-++	+---+	+----	-+++	-+---	-++-+	-----	-+---	-++--	-----	--+-	+-----	---+-	++---	N
Uruguay			1		22		9			1				1	34
India	39	2	2	2	1										46
Arabia	47		7	1											55
Nigeria						1	33								34
Senegal			1	46			8	1							56
Mauritania	5			70	4		8								87
Benín							20								20
Ex CAR			1		24	1	2								28
Argelia							20								20
Túnez			28		9		201			89	5				332
Palestina			6		6	1	104							1	118
Afro-EEUU			1	5	17	3	47	1	2						76
Guadalupe				22	29	7	194								252
Jamaica			3	7	17		66								93
Panamá	2		5	17	102	8	60	5				1			200
Venezuela1	2		4	3	39		46								94
Venezuela2				1	21		15		3	2					42
Cuba				16	81		101								198
Colombia1				4	51	5	32								92
Colombia2				10	12	4	7								33
Brasil Amazonia				6	12		2								20
Brasil Para				2	39		18								59
Brasil Bahia					23		19								42
Brasil R Preto				1	49		17								67
Brasil Campinas				3	113		26								142

India, Arabia y Nigeria (Kulozik et al., 1986); Senegal, Benín, Ex CAR (ex Republica Centroafricana), Argelia (Pagnier et al., 1984); Mauritania (Veten et al., 2012); Túnez (Imen et al., 2011); Palestina (Samarah et al., 2009); Afro EEUU, Jamaica (Antonarakis et al., 1984); Guadalupe (Keclard et al., 1996) Panamá (Rusanova et al., 2011); Venezuela 1 (Aragua) (Moreno et al., 2002); Venezuela2 (Sucre-Anzoategui (Vivenes De Lugo et al., 2003); Cuba (Muniz et al., 1995); Colombia1 (Región oeste) (Cuellar-Ambrosi et al., 2000); Colombia2 (Duran et al., 2012); Amazonia (Pante-De-Sousa et al., 1999); Bahía (Figueiredo et al., 1994); Ribeirao-Preto (Zago et al., 1992; Figueiredo et al., 1994); Campinas (Goncalves et al., 1994).

Tabla15. Distancias genéticas (x1000) a partir de las frecuencias de haplotipos asociados a cromosomas con la mutación de la HbS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1.Uruguay	0																									
2.India	602,9	0																								
3.Arabia	628,4	1,21	0																							
4.Nigeria	607,8	815,9	821,7	0																						
5.Senegal	583,3	692,3	711	758	0																					
6.Mauritania	566,8	652,2	672,2	728,3	1,14	0																				
7.Benín	584,5	812,3	819,6	16,81	751,8	722,3	0																			
8.CAR	66,22	718,9	737,4	834,1	703,1	666,3	834,9	0																		
9.Argelia	584,5	812,3	819,6	16,81	751,8	722,3	0	834,9	0																	
10.Túnez	329,8	524	530,6	162,2	478,7	491	165,2	491	165,2	0																
11.Palestina	559,1	759,2	765,1	17,74	710,1	700,4	21,57	739,3	21,57	134	0															
12.AfroEEUU	207	551,3	571	164,1	476,5	486,8	161	411,2	161	92,53	122,1	0														
13.Guadalupe	399,2	639,6	649,4	66,22	557	565,2	71,19	578,9	71,19	109,7	33,37	32,72	0													
14.Jamaica	296	606,3	621,6	117,8	526,7	534,5	116,9	504,6	116,9	91,88	66,92	0,69	5,1	0												
15.Panamá	7,78	469,8	487,7	384,4	416,8	411,5	382,8	115,7	382,8	257	362,1	122,4	272	186,4	0											
16.Venezuela1	68,79	520,3	539,8	301,3	481,2	483,6	292,7	251,8	292,7	170,5	267,4	36,71	159,7	81,6	31,39	0										
17.Venezuela2	5,89	543,8	571,1	450,6	508	503,1	426,4	164,2	426,4	227,5	422,3	99,81	274,6	175,4	0,78	11,19										
18.Cuba	86,57	520,9	537,4	271,7	450,4	452,2	270,8	263,3	270,8	174,1	235	32,81	138,8	72,58	40,55	3,41	21,59	0								
19.Colombia1	0,34	539,1	561,1	438	499,1	493,7	427,7	128,3	427,7	273,4	417,9	130	296	202,7	1,85	26,99	5,73	36,1	0							
20.Colombia2	109,3	499,9	533,3	499,1	298,9	289,1	470,1	239,4	470,1	275,5	491,4	151,9	326,2	234,3	44,76	102,8	70,66	101,6	75,93	0						
21.Amazonia	68,16	601,6	633,9	708,2	447,3	413,7	684,2	138,5	684,2	394,2	648,2	275,4	469,6	372	46,66	160,3	85,94	162,9	78,44	20,96	0					
22.Para	17,86	607,1	629,9	571,2	575	560	555,2	83,9	555,2	340,6	534,6	207,8	386,5	290,3	12,34	69,44	12,88	80,28	1,26	121,2	76,84	0				
23.Bahia	19,33	604,2	628,3	473,5	572,2	562,6	452,9	209,9	452,9	246	418,6	98,32	260,7	166,2	13,51	2,45	6,91	11,46	3,04	119,4	144,5	15,83	0			
24.RPreto	11,02	642,4	662,6	640,8	620,6	600,4	629,2	43,49	629,2	393,9	597,7	279,5	451,7	364,2	38,98	123,5	50,75	134	29,86	170,3	95,41	6,95	59,35	0		
25.Campinas	24,06	676,4	691,3	687,6	659	636,1	685	8,22	685	463	648	381,4	523,2	457,9	85,36	210,9	123,2	212,5	86,55	245,4	123,6	31,11	141,2	1,84	0	

Tabla 16. Distancias genéticas (x1000) a partir de las frecuencias de haplotipos asociados a cromosomas sin la mutación de la HbS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31					
1.Uruguay	0																																			
2.Nigeria	320,7	0																																		
3.Senegal	180,3	43,83	0																																	
4.Kenia	92,92	96,05	31,45	0																																
5.Benín	302,1	0,04	43,44	90,36	0																															
6.Bantú	195	14,07	1,29	25,86	16,14	0																														
7.KungSan	258,9	94,65	45,59	57,61	105	60,87	0																													
8.Argelia	38,24	283,4	155,9	91,89	294,4	183	231,9	0																												
9.Inglaterra	122,3	315,8	154,4	119,2	330	201,1	219,1	22,59	0																											
10.Italia	95,5	425,8	254,5	201,5	441,5	318,2	363,6	13,17	71,26	0																										
11.Grecia	29,83	273,7	124,3	58,48	263,9	146,2	189,5	15,07	31,35	78,58	0																									
12.Melanesia1	69,62	394	258,8	189,8	410,4	306,8	350,1	20,35	90,56	6,69	88,47	0																								
13. Melanesia2	95,75	473	310,8	251,5	483,4	380,6	430,9	65,35	191,9	32,93	141	22,62	0																							
14.Chipre	77,03	441,8	264,7	207,6	451,8	328,6	381,3	22,51	104,6	4,63	76,67	11,93	15,3	0																						
15.SurChina	130,4	546,1	349	317,5	555,7	446	503,9	92,59	233,6	40,18	172,2	42,62	8,45	12,52	0																					
16.India	44,58	322,7	188,6	121,9	331,3	219,9	261,1	0,57	23,49	21,99	4,92	36,48	71,58	25,53	81,22	0																				
17.Tailandia	260,7	648,1	388,4	400,6	656,8	533,9	590,4	183,4	378,3	123,6	291,5	96,76	36,54	81,68	19,27	143,2	0																			
18.Camboya	130	500,8	306	258	513	388,4	436,7	61,92	180,5	14,89	146,7	21,62	1,55	2,44	0,15	65,57	39,71	0																		
19.NorteChina	183,3	559,2	343,5	304,8	567,5	439,2	491,9	116,4	271,7	66,68	208,1	55,68	11,16	39,67	1,97	109	5,44	2,09	0																	
20.Corea	71,68	481	298,8	246	486,7	371,9	431,8	56,15	172,2	26,39	106,1	32,96	10,52	1,67	1,03	50,6	41,52	7,02	21,27	0																
21.Japón	86,05	469,8	301	242,1	480,9	371	423,7	50,05	163,1	15,86	118	18,8	1,95	0,35	2,21	53,46	40,28	3,52	12,84	0,66	0															
22.Aché	106,2	546,2	340,6	305,2	547,2	434,8	498,5	118,2	268,1	87,74	159,2	83,33	33,35	43,22	17,05	92,25	36,41	43,15	35,14	9,07	27,92	0														
23.Guaraní	62,67	473,1	304,4	239,2	472,9	370,6	426,9	82,16	216,8	64,04	128	53,92	15,55	32,46	18,12	77,25	40,6	27,01	26,34	9,17	16,13	11,55	0													
24.Kaingang	15,24	309,7	190,1	109,2	319	214,9	273,6	1,91	77,5	18,52	40,75	13,16	30,36	15,58	53,3	21,08	115,1	35,81	69,97	28,75	22,45	70,54	39,33	0												
25.México	16,2	254,6	142,5	66,49	258	160,4	197,6	2,97	43,17	39,7	2,71	41,09	67,05	38,93	88,36	9,54	141	71,29	107,5	55,84	57,08	89,9	65,72	11,07	0											
26.Panaquire	53,17	121	66,17	1,71	128,4	60,43	101,9	50,26	98,38	130,6	51,24	117,5	162	135,4	216,9	85,76	271,7	167,3	204	164,6	157,6	214,3	158,4	55,11	38,72	0										
27.SucreA	7,46	175,2	85,17	20,89	171,8	89,06	136,4	27,58	74,33	100,2	17,99	88,21	131,2	99,8	178,1	47,73	247,1	140,1	178,9	121,8	122,7	168,5	120,3	30,75	11,45	2,96	0									
28.Amazonia	100,6	68,59	39,69	14,62	59,99	28,96	99,26	105,7	149,4	200,4	101,4	188,4	236,8	205,5	289,4	150,5	330,7	238,3	268,4	235,3	232,4	281,8	229,7	115,9	95,52	16,79	34,53	0								
29.AfroSur	57,55	130,9	72,73	12,2	132,9	67,63	141,1	44,19	106,5	131,7	61,61	109	160,9	138,4	226,1	86,77	319,7	178,4	226,7	169,8	158,1	232,9	165,7	46,15	39,69	6,38	7,02	7,78	0							
30.AfroNorte	78,04	139,6	49,79	6,14	144,7	63,76	70,88	43,75	53,35	135,9	28,6	131,4	201,5	150,1	262,5	68,51	349,3	201,1	254,8	197,6	190	265,6	203	75,1	34,08	4,6	11,52	34,75	18,33	0						
31.Beta tal	56	194,3	92,88	25,73	189,1	109,4	118,1	38,56	57,43	114,4	24,17	102,3	164,6	123,4	221,1	54,98	303,9	169,4	215,2	161,1	152,6	222,9	164,9	57,9	25,7	18,68	8,71	48,91	28,44	0,92	0					

Nigeria, Benín, Inglaterra, Italia, Grecia, Chipre, Tailandia (Long et al., 1990); Senegal (Currat et al., 2002); Kenia (Webster et al., 2003); Bantú, KungSan, Argelia, Sur de China, Camboya, Corea, Japón (Shimizu et al., 2001); Melanesia1, Melanesia2, Norte de China (Chen et al., 1990); India (Varawalla et al., 1992); Aché, Guaraní, Kaingang ((Callegari-Jacques et al., 2007); México (Magana et al., 2002); Panaquire (Castro De Guerra et al., 1997); Sucre-Anzoategui (Vivenes De Lugo et al., 2003); Amazonia (Pante-De-Sousa et al., 1999); AfroSur, AfroNorte (Uruguay)(Da Luz et al., 2010) ; Beta tal: ver capitulo beta talasemias.

5.3.8.2 Haplotipos asociados a cromosomas sin la mutación de la HbS

En la Tabla 16 se presentan las distancias genéticas F_{ST} calculadas a partir de las frecuencias haplotípicas en cromosomas sin la mutación de HbS con varias poblaciones mundiales.

Las menores distancias observadas de los cromosomas no asociados a la mutación HbS son con las poblaciones de Sucre-Anzoategui y poblaciones con ancestría africana de México. Si bien las mayores distancias se observaron en las poblaciones africanas, la menor distancia corresponde la población Bantú. Respecto a las europeas las menores distancias son con las poblaciones mediterráneas de Italia y Grecia. Con las poblaciones asiáticas las distancias son siempre elevadas con excepción de la población de la India.

Cuando observamos las distancias con las poblaciones americanas analizadas las menores distancias son con la población Kaingang, la cual reside en el Estado de Rio Grande del Sur (Brasil) mientras que con las poblaciones Guaraní y Ache que residen en Mato Grosso del Sur y Paraguay, respectivamente, las distancias son mayores.

Con las otras poblaciones uruguayas, Afro Uruguayos del Sur y del Norte y la de pacientes portadores de beta talasemia se observan distancias intermedias. Las distancias genéticas de los cromosomas asociados a cromosomas con y sin la mutación de la HbS fueron representadas en un dendrograma por el método de Neighbor Joining (Figura 8 y 9).

El dendrograma con las distancias de los cromosomas asociados a la mutación HbS muestra dos cluster bien delimitados. Uno corresponde a las poblaciones asiáticas, algunas indígenas y las poblaciones africanas de Senegal y Mauritania. En el otro cluster se encuentran la mayoría de las poblaciones, observándose en un extremo a las poblaciones africanas de Benín, Argelia y Nigeria y en el otro a la población de la ex-República Centro Africana (ex-CAR). Las poblaciones americanas se encuentran entre estas poblaciones en función de la frecuencia de los haplotipos Bantú y Benín. A mayor frecuencia del haplotipo

Bantú y menor del haplotipo Benín más cerca de la población ex CAR y a la inversa más cerca de las poblaciones de Argelia, Nigeria y Benín. Uruguay se encuentra cerca de la población de ex CAR junto a las poblaciones brasileñas con la excepción de Amazonia que junto con la población de Colombia 2 se encuentra en el cluster junto a las poblaciones de Asia y las africanas de Senegal y Mauritania ya mencionadas.

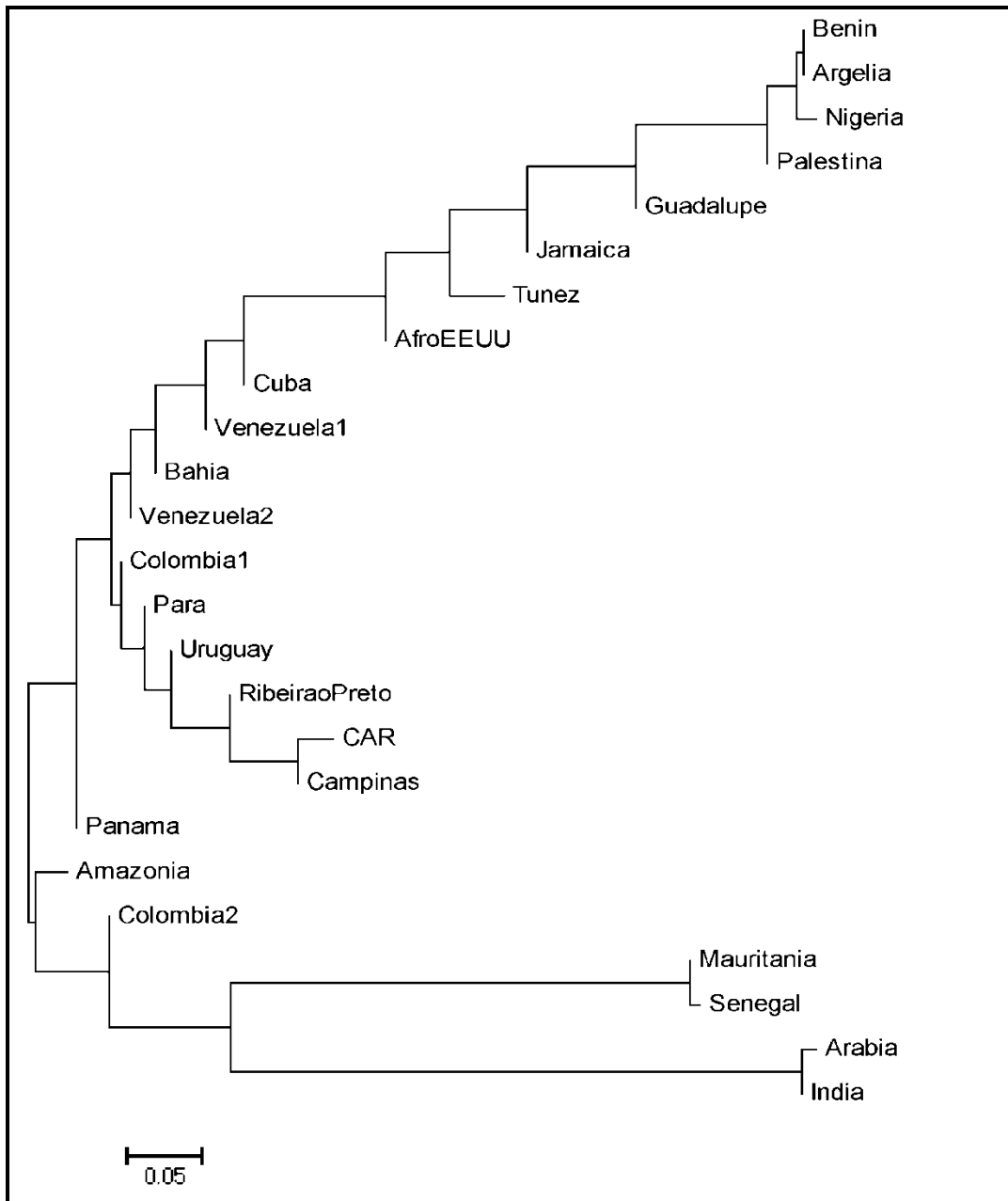


Figura 8. Dendrograma construido por el método Neighbor Joining con el software MEGA 5 a partir de las distancias F_{ST} de los haplotipos asociados a cromosomas con la mutación de la HbS.

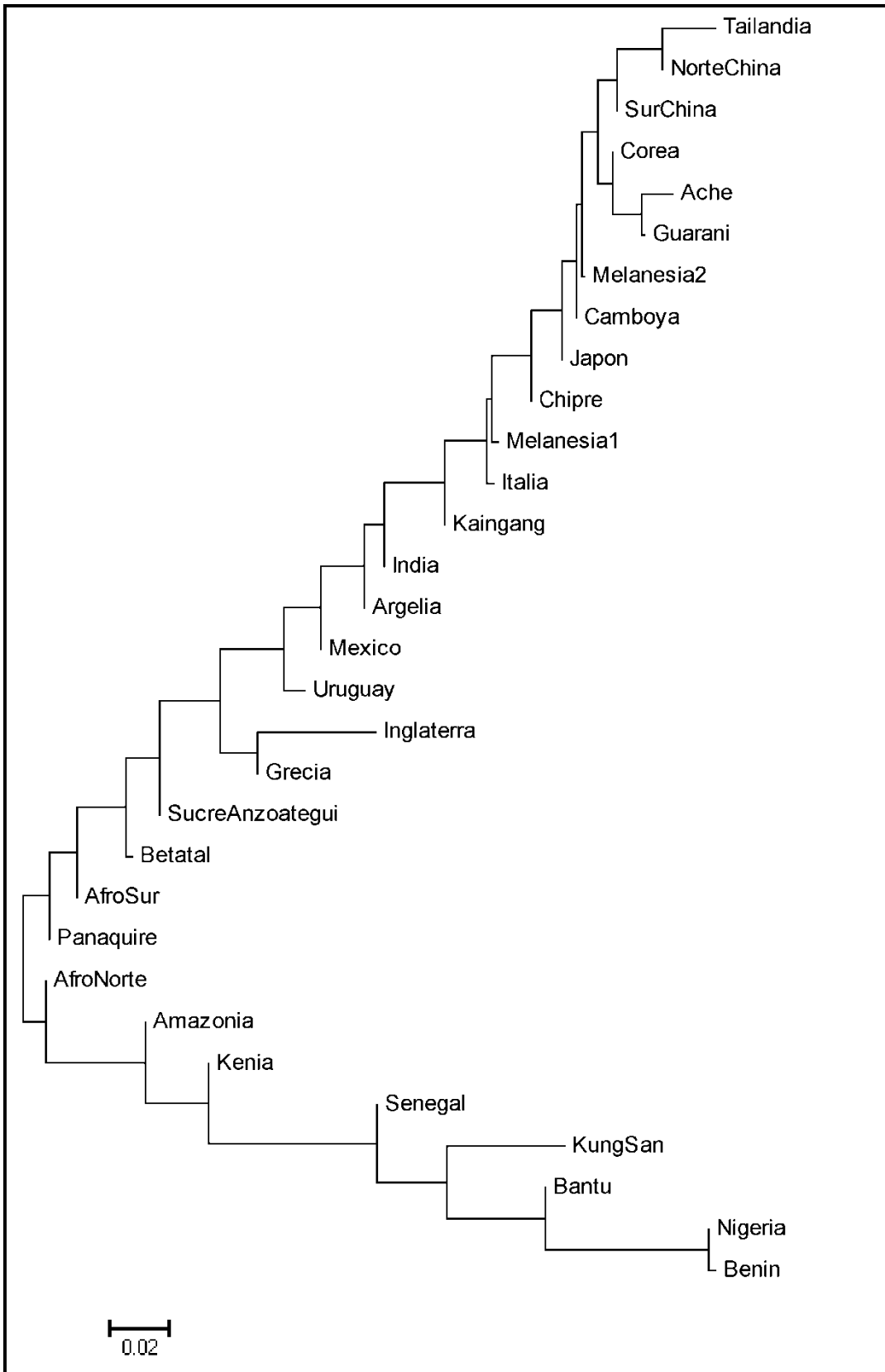


Figura 9. Dendrograma construido por el método Neighbor Joining con el software MEGA 5 a partir de las distancias F_{ST} de los haplotipos asociados a cromosomas sin la mutación de la HbS.

El dendrograma a partir de las distancias de cromosomas asociadas a los cromosomas sin la mutación separa a las poblaciones africanas del resto de las poblaciones, ubicándose las poblaciones africanas en un extremo y las asiáticas en el otro. Las poblaciones americanas se encuentran entre las poblaciones africanas y las europeas. La población de cromosomas sin la mutación de HbS se encuentra ubicada junto a la población de afro-descendientes de México. Las otras tres poblaciones uruguayas se encuentran más cerca de las poblaciones africanas, incluso la población de cromosomas sin mutaciones de beta talasemias de individuos portadores de estas mutaciones.

5.4 Discusión

En este trabajo hemos analizado los haplotipos asociados a los cromosomas con y sin la mutación de la HbS a partir de los siguientes polimorfismos: 1) seis sitios de restricción 5' del gen de la β -globina que definen el haplotipo clásico 5'; 2) 4 polimorfismos dentro del gen de la β -globina que definen el haplotipo 3' clásico; 3) el motivo ATxNyATz en el HS2 LCR; 4) la región R/T a partir de los sitios de restricción *RsaI* y *TaqI* y de datos de secuencia alelica y 5) el motivo ATxTy y cuatro SNPs alrededor de este motivo.

5.4.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Solamente los sitios *RsaI* y *TaqI* no se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, en ambos casos debido a un exceso de los genotipos homocigotas ++ y -- y una menor proporción de los genotipos heterocigotas +-. Esta situación puede ser explicada por los efectos del mestizaje y/o por la muestra seleccionada ya que en los cromosomas con la mutación de la HbS y con el haplotipo Bantú predomina el haplotipo *RsaI-TaqI* +- mientras que en los cromosomas con la misma mutación y el haplotipo Benín predomina el haplotipo -+ (Webster et al., 2003). En nuestra muestra la mayoría de los haplotipos asociados a la HbS son Bantú, seguidos por Benín, por lo que la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg observada es más probable sea debido a la muestra utilizada. El exceso de homocigotos es frecuente en poblaciones subdivididas o subestructuradas y es conocido como el efecto Wahlund (Curnow, 1973). En este caso, podría estar dado por la falta de flujo génico entre los portadores de los haplotipos Bantú y Benín, que podría deberse a factores históricos, como por ejemplo, que los esclavos que ingresaron al Uruguay provenían tanto del tráfico directo por el puerto de Montevideo, de origen preferentemente de Congo-Angola, como por Brasil, desconociéndose en este caso el origen en Africa (Isola, 1975); estos últimos se instalaron preferentemente cerca de la frontera brasileña. Algunos estudios han señalado la existencia de endogamia grupal en el comportamiento marital de las primeras generaciones de africanos, tanto de esclavos como de libertos, lo que

podría explicar que ambos contingentes poblacionales, posiblemente con haplotipos diferentes al menos en sus frecuencias, tuvieran poco intercambio génico entre ellos, provocando sub-estructuración en la población afrodescendiente (Sans y Barreto, 1997; Barreto, 2011).

5.4.2 Equilibrio de ligamiento

Similar a lo observado en otros estudios con individuos portando la mutación de la HbS, el desequilibrio de ligamiento se extiende a través del *hot-spot* de recombinación ubicado entre los genes de la δ y β -globina (Webster et al., 2003; Hanchard et al., 2007; Ghansah et al., 2012). De todas maneras, el desequilibrio de ligamiento observado a nivel general es menor al observado en estos estudios. Esto puede ser explicado por el aporte de cromosomas sin la mutación en los individuos heterocigotas HbS/HbA, ya que ha sido observado que a diferencia de los cromosomas con la mutación HbS, no presentan una homogeneidad de secuencia que se extiende por aproximadamente 1,5 Mb, (Ghansah et al., 2012).

5.4.3 Haplotipos 5' y 3'

La presencia a elevadas frecuencias del haplotipo Bantú seguido por el Benín sugiere que el origen de estos cromosomas en la población uruguaya es principalmente de la región centro-sur de Africa, donde habitan los portadores del mismo. Estos resultados están en consonancia con datos históricos acerca del origen de los esclavos traídos al Uruguay. Un censo realizado en 1812 muestra que la mayoría de los esclavos eran congos, benguelas (de una región de Angola) y angoleños seguidos por minas de la actual Ghana (Isola, 1975). Los tres primeros grupos provienen de regiones donde actualmente predomina el haplotipo Bantú mientras que los minas provienen de regiones donde predomina el haplotipo Benín.

El porcentaje de haplotipos atípicos asociados a la HbS (11,6%) es similar al observado previamente en una muestra menor de cromosomas en la población uruguaya (Da Luz et al., 2006). Aunque la elevada frecuencia de haplotipos atípicos observados puede ser explicada por recombinación o mutación no podemos descartar que hayan sido introducidos por poblaciones cuyos individuos fueran portadores de la mutación de la HbS. Esta hipótesis se basa en que dos de los haplotipos atípicos observados en nuestra muestra han sido observados en otras poblaciones africanas y en poblaciones del Mediterráneo. El haplotipo - - - - - es el segundo más frecuente en Túnez. El haplotipo atípico + - - - - es el tercero más frecuente en Túnez y también se observa en Palestina, Senegal y la ex República Centro Africana (Pagnier et al., 1984; Samarah et al., 2009; Imen et al., 2011). Dada la variada procedencia de la población de nuestro país (Vidart y Pi, 1969), no sería raro observar haplotipos de muy diversos orígenes.

Respecto a los otros dos haplotipos no han sido observados en otras poblaciones. Uno de ellos presenta un haplotipo 5' atípico (+ + - - -) y un haplotipo 3' A característico de los haplotipos Bantú y Senegal (Pagnier et al., 1983; Lapuumeroulie et al., 1992). Esta situación podría ser explicada por recombinación involucrando la porción 5' de un haplotipo típico asociado a la mutación de la HbS con un haplotipo asociado a cromosomas normales. Esta situación ya ha sido postulada para explicar la presencia de haplotipos atípicos en otras poblaciones americanas y africanas (Zago et al., 2000; Zago et al., 2001)

El otro haplotipo atípico presenta un haplotipo 5' de tipo Benín y un haplotipo 3' atípico el cual puede ser explicado por recombinación del haplotipo 3' de un cromosoma con el haplotipo Benín con otro cromosoma portando el haplotipo observado en nuestra muestra. Aunque también podría ser explicado por mutación, esta situación es menos probable, ya que es necesaria la presencia de dos eventos mutacionales involucrando los sitios IVS-II-74 e IVS-II-81. Adicionalmente, eventos de recombinación involucrando el haplotipo 5' o 3' del cluster de genes de la β -globina en cromosomas con o sin la mutación de HbS han sido previamente reportados (Old et al., 1986; Zago et al., 2000; Zago et al., 2001).

En relación a los haplotipos 5' y 3' asociados a los cromosomas sin mutación, la mayor variación observada respecto a los cromosomas con la mutación de la HbS y la presencia de haplotipos característicos de poblaciones europeas, amerindias y asiáticas muestran nuevamente la naturaleza tri-híbrida de la población uruguaya la cual ha sido demostrada previamente (Sans, 1994; Sans et al., 1997; Sans et al., 2002; Bonilla et al., 2004; Bertoni et al., 2005; Hidalgo et al., 2005). Adicionalmente, la elevada frecuencia de haplotipos no-Africanos en los cromosomas sin la mutación de la HbS en individuos heterocigotos para esta mutación podría estar indicando el mestizaje ocurrido entre descendientes de africanos y no africanos, parte del cual se puede ver en tiempos históricos en la cantidad de niños "pardos", hijos de mujeres "negras" que aparecen en los libros de bautismo de la Iglesia Católica a finales del siglo XVIII y XIX (Sans et al., 1996)

5.4.4 Región R/T

En esta región se observó una perfecta correlación entre los haplotipos de restricción (*RsaI-TaqI*) y los haplotipos de secuencia a nivel alélico. Al igual que lo observado en las poblaciones mundiales, los haplotipos divergentes + - y - + son los preponderantes en la muestra analizada. En esta región cromosómica se ha determinado la presencia de un sitio de inicio de un transcripto intergénico, por lo cual se ha postulado que la elevada frecuencia de estos dos haplotipos

puede ser debida a la existencia de alguna variante dentro de esta región que tenga un efecto fenotípico en la expresión de la transcripción y por lo tanto, ser un blanco para la selección (Calzolari et al., 1999; Gribnau et al., 2000; Webster et al., 2002). En los cromosomas asociados a la mutación de la HbS el haplotipo R (+ -) fue el más frecuente debido a que la mayoría de estos cromosomas presentaban el haplotipo Bantú el cual ha sido asociado a éste (Webster et al., 2003). En los cromosomas no asociados a la mutación de la HbS el exceso de haplotipos de tipo R es aún mayor. Las poblaciones con mayor frecuencia de haplotipos de tipo R son las poblaciones asiáticas las cuales han contribuido escasamente a la actual población uruguaya por lo que este exceso de haplotipos R podría ser debido al aporte de poblaciones amerindias las cuales derivan de las poblaciones asiáticas (Torroni et al., 1993). Anteriores estudios han mostrado que la contribución amerindia en la población afro-descendiente del Uruguay es mayor que la contribución a nivel global. De acuerdo a Hidalgo et al. (2005) la contribución amerindia en Uruguay es de 10,4% mientras que contribuciones de 15%, 20% y 25% de población amerindia fueron estimadas para las poblaciones de Melo y Afro-descendientes del Sur y Norte del Uruguay, respectivamente (Sans et al., 2002; Da Luz et al., 2010). Aunque la muestra analizada en este trabajo no ha sido clasificada como afro-descendiente, la presencia de la HbS indica la presencia de ancestralidad africana. De todas maneras no podemos descartar que esa elevada frecuencia se deba a procesos aleatorios de muestreo debido al escaso número de cromosomas no asociados a la HbS analizados.

5.4.4 HS2 LCR

El HS2 LCR presentó configuraciones atípicas solamente en los cromosomas asociados a la mutación de la HbS que presentaban el haplotipo Benín. Similares resultados fueron observados en el trabajo de Zago et al. (2001) donde se analizaron cromosomas con la mutación de la HbS que presentaban haplotipos aparentemente típicos definidos por siete sitios de restricción (los seis sitios usados aquí para definir el haplotipo 5' más un sitio

XmnI ubicado 5' del gen de la α -globina) en una muestra de individuos homocigotas para la HbS de Brasil y Benín. En ese trabajo se observó que 10 de los 15 cromosomas atípicos observados eran del tipo Benín y que presentaban configuraciones atípicas del HS2 LCR. Adicionalmente, las configuraciones atípicas asociadas al haplotipo Benín en nuestra muestra también fueron observadas en ese trabajo, la configuración tipo Bantú en tres casos de Brasil (AT₈N₁₂AT₁₁) y la configuración atípica (AT₈N₁₂AT₁₂) en un caso de Camerún. Estos datos sugieren que estas configuraciones atípicas posiblemente tengan un origen en las poblaciones originales que portaban esta mutación y no se deban a procesos de recombinación, conversión génica o mutación ocurrida en nuestra población.

De los tres cromosomas asociados a la HbS que presentaron haplotipos de restricción atípicos, sólo los que presentaron los haplotipos 2 y 22 pudieron ser analizados para el HS2 LCR y ambos presentan una configuración tipo Bantú. La configuración tipo Bantú ya había sido observada asociada al haplotipo 2, pero no al haplotipo 22 el cual había sido observado asociado a la configuración tipo Benín del HS2 LCR (Zago et al., 2000). Estos eventos pueden ser explicados por recombinación entre cromosomas con la mutación de la HbS con haplotipos típicos y cromosomas sin la mutación con haplotipos distintos los cuales en su mayoría pueden haber ocurrido en las poblaciones ancestrales aunque no podemos descartar que algunos de estos eventos puedan haber ocurrido luego de llegar a América.

Al igual que lo observado con los haplotipos 5' y 3' la muestra de cromosomas no asociados a la mutación de la HbS presenta mayor variabilidad que los asociados a la HbS. Esto posiblemente se deba a la elevada homogeneidad que presentan los cromosomas asociados a la mutación de la HbS. Como mencionamos anteriormente, se ha determinado que los cromosomas con la mutación de la HbS presentan una elevada homogeneidad haplotípica, la cual abarca aproximadamente 1,5 Mb alrededor del sitio de la mutación de la HbS (Hanchard et al., 2007; Ghansah et al., 2012).

5.4.4 Región ATxTy

Esta región pudo ser analizada solamente en 22 cromosomas portando la mutación de la HbS y no fueron observadas configuraciones atípicas lo cual es raro teniendo en cuenta que esta región se encuentra dentro de un segmento clasificado como un *hot-spot* de recombinación (Chakravarti et al., 1984; Schneider et al., 2002) y además estos repetidos o microsatélites contribuyen a la variabilidad debido a la plasticidad intrínseca que poseen (Jeffreys et al., 1988), tal cual es observado en el HS2 LCR. La falta de configuraciones atípicas podría ser explicada porque los eventos de recombinación observados en los cromosomas con la HbS se hayan dado en otras regiones del *cluster* de genes de la β -globina, como la región entre el gen de la globina ϵ y el HS2 LCR, como fue reportado previamente en poblaciones africanas y brasileñas (Zago et al., 2000; 2001).

5.4.4 Haplotipos atípicos

El porcentaje de haplotipos atípicos observados en este trabajo (23,5%) es de los mayores observados a nivel mundial y es similar a lo observado previamente en la población uruguaya (20%) (Da Luz et al., 2006) A diferencia de lo observado en el trabajo previo, en el presente trabajo ese porcentaje se distribuye en partes iguales entre cromosomas con haplotipos 5' y 3' atípicos (11,7%) y cromosomas con haplotipos 5' y 3' típicos pero que difieren en la configuración del HS2 LCR (11,7%). En la población de Brasil se observaron porcentajes prácticamente iguales de cromosomas atípicos con relación a cromosomas atípicos presentando una configuración aparentemente típica, pero con un porcentaje total menor (6,8%) (Zago et al., 2001).

Los cromosomas numerados de 1 a 4 de la Tabla 12 presentan una configuración tipo Benín excepto en el HS2 LCR, mientras que los cromosomas 1 a 3 presentan un HS2 LCR de tipo Bantú. Esto puede ser explicado por recombinación en la región entre el HS2 LCR y el gen de la globina ϵ en cromosomas con la mutación HbS del tipo Bantú y Benín. Sin embargo no podemos descartar que la recombinación pueda haber ocurrido entre

cromosomas con la mutación HbS y cromosomas sin la mutación debido a que la configuración AT₈N₁₂AT₁₁ también ha sido observada en cromosomas sin la mutación. Por otra parte, aunque menos probable no se puede descartar que esa diferencia se deba a mutaciones en un haplotipo de tipo Benín, ya que como mencionamos anteriormente los microsatélites presentan una plasticidad y/o inestabilidad intrínseca (Jeffreys et al., 1988). La configuración del HS2 LCR observada en el cromosoma 4 ha sido observada en cromosomas con la mutación de la HbS y haplotipos del tipo Benín atípicos en la población de Brasil (Zago et al., 2001), por lo que, como mencionamos anteriormente, este cromosoma puede ser originario de las poblaciones africanas ancestrales. En estas poblaciones puede haber surgido por recombinación entre cromosomas de tipo Benín con cromosomas sin la mutación.

El cromosoma atípico denominado 5 de la Tabla 12 presenta un haplotipo 5' tipo Benín y un haplotipo 3' atípico el cual puede ser explicado por recombinación en la porción 3' del gen de la β -globina. Sin embargo, en Camerún (21,2%) y en Brasil (6,7%) se ha observado un haplotipo 3' de la mutación HbS que difiere del haplotipo 3' tipo Benín solamente por la presencia de sitio de corte para la enzima de restricción *HpaI* 3' del gen de la β -globina, el cual es ausente en el haplotipo Benín (Zago et al., 1992; 2000). Aunque no hemos analizado este polimorfismo en nuestra muestra datos de otras poblaciones muestran que la presencia de T en el sitio IVS-II-81, como hemos observado en el cromosoma 5, se encuentra asociado en el 100% de los casos a la presencia del sitio de corte para la enzima de restricción *HpaI* (Fullerton et al., 1994). Por esta razón es probable que el cromosoma denominado 5 presente el mismo haplotipo que el observado en Camerún y Brasil.

Respecto a los otros tres cromosomas que presentan un haplotipo 5' atípico, el 6 presenta también un haplotipo 3' atípico y el HS2 LCR de tipo Bantú por lo que puede ser explicado por recombinación entre cromosomas con la mutación de la HbS y el haplotipo Bantú con cromosomas sin la mutación en la región entre el HS2 LCR y el gen de la globina ϵ . El cromosoma denominado

7 puede ser explicado por recombinación entre cromosomas con la mutación y el haplotipo Benín y cromosomas sin la mutación en la región del hot-spot de recombinación ubicado entre el gen de la δ y β -globina ya que presenta el haplotipo 3' y la región AT_xT_y de tipo Benín, el haplotipo 5' atípico y el HS2 LCR de tipo Bantú. Aunque presenta la configuración Bantu en el HS2 LCR, esta configuración también se observa en cromosomas sin la mutación por lo que es más probable que la recombinación involucra cromosomas sin la mutación. Por último el cromosoma denominado 8 puede ser explicado por recombinación al igual que los anteriores pero también por una sola mutación en el sitio ϵ -HincII de un haplotipo de tipo Bantú o por eventos de conversión génica.

En suma, aunque hemos observado una elevada frecuencia de haplotipos atípicos en nuestra población, con excepción del denominado 8 de la Tabla 12, todos los demás ya han sido observados en otras poblaciones americanas y africanas. Este hecho refuerza la idea de que las frecuencias de haplotipos atípicos observados previamente es real y no debido a problemas de muestreo o de errores de genotipado. La interrogante entonces es determinar a qué se debe esta elevada frecuencia de haplotipos atípicos, que podría deberse a la acción de distintos factores genéticos y no genéticos como el origen de los esclavos, la acción de factores micro-evolutivos como deriva génica y/o efectos fundadores y en menor medida, a mutación.

Es importante destacar que a principios del siglo XIX aproximadamente el 30% de la población de Montevideo (Sans y Barreto, 1988) era de origen africano pero se fue reduciendo que con el transcurso del siglo debido a las migraciones de poblaciones europeas y posiblemente también a la participación de los africanos en diversos actos bélicos, sea para obtener la libertad o aumentar el prestigio social. Por ejemplo se ha mencionado una baja en el índice de masculinidad, de 119 a 78 por cada 100 mujeres en Montevideo, que podría relacionarse a las guerras de independencia. El mismo fenómeno se observa en otras partes del país a lo largo de la primer mitad del siglo XIX

(Frega et al., 2004). Esta situación no sólo genera la baja de hombres sino una reducción poblacional general, la cual puede haber favorecido procesos como la deriva génica que aumentan o disminuyen las frecuencias de variantes genéticas.

5.4.4 Comparación con otras poblaciones

Debido a que la mayoría de los estudios de los haplotipos asociados a la mutación de la HbS involucran solamente los sitios que definen el haplotipo 5', hemos únicamente considerado este haplotipo, definido por los primeros cinco sitios de restricción para compararlo con otras poblaciones.

Las distancias genéticas F_{ST} calculadas a partir de las frecuencias haplotípicas muestran que con respecto a las poblaciones africanas las menores distancias son observadas con la población de la ex República Centro Africana, relacionado a la elevada frecuencia del haplotipo Bantú observado en nuestra muestra y en esta población africana (Pagnier et al., 1984). Nuevamente, esto está de acuerdo con los datos históricos que indican que la mayoría de los esclavos introducidos al Uruguay provenían de regiones de África donde el haplotipo Bantú es el más frecuente (Centro y Sudeste de África) y en menor medida provenían de la zona del golfo de Guinea donde predomina el haplotipo Benín y Senegal (Isola, 1975). Las poblaciones en las que predominan otros haplotipos, como Benín, Senegal, o Árabe-Indio (Pagnier et al., 1984; Imen et al., 2011; Vetten et al., 2012), son las que presentan las mayores distancias.

Respecto a las poblaciones americanas analizadas, las menores distancias son observadas con las poblaciones que presentan elevadas frecuencias del haplotipo Bantú [Colombia (región oeste), Panamá, Venezuela 2 (Sucre-Anzoategui y las poblaciones brasileñas con la excepción de Amazonia)] (Zago et al., 1992; Figueredo et al., 1994; Goncalvez et al., 1994; Pante de Sousa et al., 1999; Cuellar-Ambrosi et al., 2000; Vivenes de Lugo et al., 2003; Rusanova et al., 2011). Estas distancias se ven reflejadas en el dendrograma, observándose un gradiente de acuerdo a la ancestría. La excepción a esta situación es dada por la

población Afro-brasileña de Amazonia y por una de las muestras de Colombia (Colombia 2), las cuales presentan las mayores frecuencias del haplotipo Senegal y se encuentran agrupadas en una rama del árbol con las poblaciones de Senegal, Mauritania y las poblaciones de Arabia e India, reflejando el aporte de poblaciones africanas de la región donde el mismo es frecuente (Senegal, Gambia, Guinea-Bissau, Cabo Verde), como ya fue previamente observado por Pante de Sousa et al. (1999).

Aunque las distancias observadas con los haplotipos asociados a la mutación de la HbS puede estar indicando un origen del Centro y Sudeste de África a la población uruguaya, estos resultados pueden en realidad explicar solamente el origen de esta mutación y no el origen de la población afro-descendiente. Por esta razón analizamos también los haplotipos asociados a cromosomas sin la mutación con poblaciones africanas, europeas y afro-americanas.

Al igual que lo observado con los haplotipos asociados a la mutación de la HbS, las menores distancias con las poblaciones africanas sub-saharianas son observadas con la población Bantú y la población de Kenia la cual presenta un componente importante de la etnia Bantú (Webster et al., 2003). Esta misma relación se observa con las otras poblaciones Afro-uruguayas analizadas (Sur y Norte) como ya fue observado previamente (Da Luz et al., 2010) y también es observada en los cromosomas sin mutación de portadores de β -talasemias indicando que las poblaciones africanas introducidas al Uruguay provenían de las regiones del Centro y Sudeste de África donde el haplotipo Bantú predomina.

En este caso, las poblaciones afro-americanas con las que se observan las menores distancias son las originadas por grupos de origen Bantú, como Sucre-Anzoategui y México (Magana et al., 2002; 2007). También se observan distancias intermedias con poblaciones europeas y algunas asiáticas y amerindias, lo que demuestra la conformación compleja de la población uruguaya. Aunque no tenemos datos acerca de la auto-percepción o ancestría

de los individuos analizados en el presente trabajo, la presencia de la HbS indica la presencia de ancestría africana, por lo cual se puede concluir que los afro-uruguayos presentan una conformación tri-híbrida al igual que el resto de la población uruguaya (Da Luz et al., 2010)

5.5 Conclusiones

Los cromosomas con la mutación de la HbS tienen fundamentalmente origen en regiones donde predomina el haplotipo Bantú, seguido por regiones donde predomina el haplotipo Benín. Esto es corroborado por los haplotipos no asociados a esta mutación.

Se ha corroborado la elevada frecuencia de haplotipos atípicos observados en un estudio previo, aunque aproximadamente la mitad de estos presentan una configuración típica de su haplotipo 5'. Posiblemente hayan sido introducidos por las poblaciones ancestrales y no hayan sido generados luego de llegados al Uruguay, puesto ya han sido reportados en otras poblaciones de África y Afro-americanas.

La elevada frecuencia de estos haplotipos atípicos probablemente sea debida a la acción de factores genéticos micro-evolutivos como deriva génica, efectos fundadores, cuellos de botella ocurridos en la o las poblaciones de esclavos luego de ser introducidos al Uruguay.

5.6 Bibliografía

- Abreu, M.S. and Peñalver, J.A. Hemoglobinotías en la Argentina. *Medicina*. 52: 341-346. *Medicina* **52** (1983), pp. 341-346.
- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J.G., Coulibaly, D., Kone, A., Kayentao, K., Djimde, A., Plowe, C.V., Doumbo, O., Wellems, T.E. and Diallo, D. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* **96** (2000), pp. 2358-63.
- Allison, A.C. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **48** (1954), pp. 312-8.
- Amselem, S., Nunes, V., Vidaud, M., Estivill, X., Wong, C., d'Auriol, L., Vidaud, D., Galibert, F., Baiget, M. and Goossens, M. Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *Am J Hum Genet* **43** (1988), pp. 95-100.
- Angastiniotis, M., Modell, B., Englezos, P. and Boulyjenkov, V. Prevention and control of haemoglobinopathies. *Bull World Health Organ* **73** (1995), pp. 375-86.
- Antonarakis, S.E., Boehm, C.D., Serjeant, G.R., Theisen, C.E., Dover, G.J. and Kazazian, H.H., Jr. Origin of the beta S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (1984), pp. 853-6.
- Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H., Jr. and Orkin, S.H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* **69** (1985), pp. 1-14.
- Antonarakis, S.E., Orkin, S.H., Kazazian, H.H., Jr., Goff, S.C., Boehm, C.D., Waber, P.G., Sexton, J.P., Ostrer, H., Fairbanks, V.F. and Chakravarti, A. Evidence for multiple origins of the beta E-globin gene in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (1982), pp. 6608-11.
- Araujo, A.S., Silva, W.A., Leao, S.A., Bandeira, F.C., Petrou, M., Modell, B. and Zago, M.A. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin* **27** (2003), pp. 211-7.
- Arends, T., Garlin, G., Perez-Bandez, O. and Anchustegui, M. Hemoglobin variants in Venezuela. *Hemoglobin* **6** (1982), pp. 243-6.
- Barreto, I. Estudio biodemográfico de la población de Villa Soriano, Depto. de Soriano, Uruguay. *Montevideo: UDELAR – CSIC (Colección Biblioteca Plural)*. (2011).
- Bertoni, B., Jin, L., Chakraborty, R. and Sans, M. Directional mating and a rapid male population expansion in a hybrid Uruguayan population. *Am J Hum Biol* **17** (2005), pp. 801-8.
- Bevilaqua, L.R., Mattevi, V.S., Ewald, G.M., Salzano, F.M., Coimbra, C.E.J., Santos, R.V. and Hutz, M.H. Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five Brazilian Indian tribes. *Am J Phys Anthropol* **98** (1995), pp. 395-401.

- Bonilla, C., Bertoni, B., Gonzalez, S., Cardoso, H., Brum-Zorrilla, N. and Sans, M. Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *Am J Hum Biol* **16** (2004), pp. 289-97.
- Bravo-Urquiola, M., Arends, A., Gomez, G., Montilla, S., Gerard, N., Chacin, M., Berbar, T., Garcia, O., Garcia, G., Velasquez, D., Castillo, O. and Krishnamoorthy, R. Molecular spectrum of beta-thalassemia mutations in the admixed Venezuelan population, and their linkage to beta-globin gene haplotypes. *Hemoglobin* **36** (2012), pp. 209-18.
- Cabeda, J.M., Correia, C., Estevinho, A., Simoes, C., Amorim, M.L., Pinho, L. and Justica, B. Unexpected pattern of beta-globin mutations in beta-thalassaemia patients from northern Portugal. *Br J Haematol* **105** (1999), pp. 68-74.
- Calvo-Villas, J.M., Zapata, M.F., Cuestatovar, J., De la Iglesia, S., Roperó, P., Carreter, E. and Sicilia, F. Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *An.Med.Interna* **23** (2006), pp. 206-212.
- Calzolari, R., McMorrow, T., Yannoutsos, N., Langeveld, A. and Grosveld, F. Deletion of a region that is a candidate for the difference between the deletion forms of hereditary persistence of fetal hemoglobin and deltabeta-thalassemia affects beta- but not gamma-globin gene expression. *EMBO J* **18** (1999), pp. 949-58.
- Callegari-Jacques, S.M., Crossetti, S.G., Kohlrausch, F.B., Salzano, F.M., Tsuneto, L.T., Petzl-Erler, M.L., Hill, K., Hurtado, A.M. and Hutz, M.H. The beta-globin gene cluster distribution revisited-patterns in Native American populations. *Am J Phys Anthropol* **134** (2007), pp. 190-7.
- Cao, A., Saba, L., Galanello, R. and Rosatelli, M.C. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. *JAMA* **278** (1997), pp. 1273-7.
- Carvalho-Silva, D.R., Santos, F.R., Rocha, J. and Pena, S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* **68** (2001), pp. 281-6.
- Castro De Guerra, D., Hutz, M.H., Bortolini, M.C. and Salzano, F.M. Beta-globin gene cluster haplotypes in an admixed Venezuelan population. *American Journal of Human Biology* **9** (1997), pp. 323-327.
- Cavalli-Sforza, L.L. and Bodmer, W.F., *Genética de las poblaciones humanas*. Editorial Omega, Barcelona (1981).
- Colah, R., Gorakshakar, A. and Nadkarni, A. Global burden, distribution and prevention of beta-thalassemias and hemoglobin E disorders. *Expert Rev Hematol* **3** (2010), pp. 103-17.
- Cuellar-Ambrosi, F., Mondragon, M.C., Figueroa, M., Prehu, C., Galacteros, F. and Ruiz-Linares, A. Sick cell anemia and beta-globin gene cluster haplotypes in Colombia. *Hemoglobin* **24** (2000), pp. 221-5.
- Curnow, B.N. Probability Models and Statistical Methods in Genetics. . *Annals of Human Genetics* **37** (1973), p. 117.

- Curat, M., Trabuchet, G., Rees, D., Perrin, P., Harding, R.M., Clegg, J.B., Langaney, A. and Excoffier, L. Molecular analysis of the beta-globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the beta(S) Senegal mutation. *Am J Hum Genet* **70** (2002), pp. 207-23.
- Chakravarti, A., Buetow, K.H., Antonarakis, S.E., Waber, P.G., Boehm, C.D. and Kazazian, H.H. Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet* **36** (1984), pp. 1239-58.
- Chen, L.Z., Easteal, S., Board, P.G. and Kirk, R.L. Evolution of beta-globin haplotypes in human populations. *Mol Biol Evol* **7** (1990), pp. 423-37.
- Da Luz, J., Kimura, E.M., Costa, F.F., Sonati Mde, F. and Sans, M. Beta-globin gene cluster haplotypes in Afro-Uruguayans from two geographical regions (South and North). *Am J Hum Biol* **22** (2010), pp. 124-8.
- Da Luz, J., Sans, M., Kimura, E.M., Albuquerque, D.M., Sonati, M.F. and Costa, F.F. alpha-thalassemia, HbS, and beta-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* **29** (2006), pp. 595-600.
- da Silveira, Z.M., das Vitorias Barbosa, M., de Medeiros Fernandes, T.A., Kimura, E.M., Costa, F.F., de Fatima Sonati, M., Rebecchi, I.M. and de Medeiros, T.M. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol* **34** (2011), pp. 425-8.
- Diaz-Chico, J.C., Yang, K.G., Stoming, T.A., Efremov, D.G., Kutlar, A., Kutlar, F., Aksoy, M., Altay, C., Gurgey, A., Kilinc, Y. and et al. Mild and severe beta-thalassemia among homozygotes from Turkey: identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood* **71** (1988), pp. 248-51.
- Duran, C.L., Morales, O.L., Echeverri, S.J. and Isaza, M. [Beta globin haplotypes in hemoglobin S carriers in Colombia]. *Biomedica* **32** (2012), pp. 103-11.
- Efremov, D.G., Dimovski, A.J., Baysal, E., Ye, Z., Adekile, A.D., Ribeiro, M.L., Schiliro, G., Altay, C., Gurgey, A., Efremov, G.D. and et al. Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with beta-thalassaemia due to a homozygosity for the IVS-I-6 (T-->C) mutation. *Br J Haematol* **86** (1994), pp. 824-30.
- Esteves, L., Zechmaister, D., Portal, L., Camargo, E., da Rocha, L. and Giugliani, R. Neonatal screening for hemoglobinopathies: a pilot study in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad. Saúde Pública* **18** (2002), pp. 833-841.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1** (2005), pp. 47-50.
- Excoffier, L. and Slatkin, M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* **62** (1998), pp. 171-80.

- Falchi, A., Giovannoni, L., Vacca, L., Latini, V., Vona, G. and Varesi, L. beta-globin gene cluster haplotypes associated with beta-thalassemia on Corsica island. *Am J Hematol* **78** (2005), pp. 27-32.
- Faustino, P., Pacheco, P., Loureiro, P., Nogueira, P.J. and Lavinha, J. The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the Portuguese population. *Br J Haematol* **107** (1999), pp. 903-4.
- Figueiredo, M.S., Silva, M.C., Guerreiro, J.F., Souza, G.P., Pires, A.C. and Zago, M.A. The heterogeneity of the beta s cluster haplotypes in Brazil. *Gene Geogr* **8** (1994), pp. 7-12.
- Foglietta, E., Deidda, G., Graziani, B., Modiano, G. and Bianco, I. Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* **81** (1996), pp. 387-96.
- Frega, A., Borucki, A., Chagas, K. and Stalla, N.: Esclavitud y abolición en el Río de la Plata en tiempos de revolución y república. In: UNESCO (UNESCO)UNESCOs), *Memoria del Simposio La ruta del esclavo en el Río de la Plata: Su historia y sus consecuencias* Logos, Montevideo (2004), pp. 115-148.
- Fullerton, S.M., Harding, R.M., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. Molecular and population genetic analysis of allelic sequence diversity at the human beta-globin locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994), pp. 1805-9.
- Gascue, C., Mimbacas, A., Sans, M., Gallino, J.P., Bertoni, B., Hidalgo, P. and Cardoso, H. Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Hum Biol* **77** (2005), pp. 873-8.
- Ghansah, A., Rockett, K.A., Clark, T.G., Wilson, M.D., Koram, K.A., Oduro, A.R., Amenga-Etego, L., Anyorigiya, T., Hodgson, A., Milligan, P., Rogers, W.O. and Kwiatkowski, D.P. Haplotype analyses of haemoglobin C and haemoglobin S and the dynamics of the evolutionary response to malaria in Kassena-Nankana District of Ghana. *PLoS One* **7** (2012), p. e34565.
- Gimenez, O.G., Torrealba, M.C., Urquiola, M.B., Ortiz, G.G., Fonseca, S.M., Merzon, R., de Donato, M., Castillo, O. and Arends de Perez, A. [Diagnosis of hemoglobinopathies in newborns in Venezuela hospitals]. *An Pediatr (Barc)* **71** (2009), pp. 314-8.
- Goh, S.H., Lee, Y.T., Bhanu, N.V., Cam, M.C., Desper, R., Martin, B.M., Moharram, R., Gherman, R.B. and Miller, J.L. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood* **106** (2005), pp. 1466-72.
- Gomes, M.P., da Costa, M.G., Braga, L.B., Cordeiro-Ferreira, N.T., Loi, A., Pirastu, M. and Cao, A. Beta-thalassemia mutations in the Portuguese population. *Hum Genet* **78** (1988), pp. 13-5.
- Goncalves, M.S., Nechtman, J.F., Figueiredo, M.S., Kerbauy, J., Arruda, V.R., Sonati, M.F., Saad, S.O., Costa, F.F. and Stoming, T.A. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. *Hum Hered* **44** (1994), pp. 322-7.
- Gonzalez-Redondo, J.M., Stoming, T.A., Lanclos, K.D., Gu, Y.C., Kutlar, A., Kutlar, F., Nakatsuji, T., Deng, B., Han, I.S., McKie, V.C. and et al. Clinical and genetic heterogeneity in black

- patients with homozygous beta-thalassemia from the southeastern United States. *Blood* **72** (1988), pp. 1007-14.
- Gribnau, J., Diderich, K., Pruzina, S., Calzolari, R. and Fraser, P. Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus. *Mol Cell* **5** (2000), pp. 377-86.
- Hanchard, N., Elzein, A., Trafford, C., Rockett, K., Pinder, M., Jallow, M., Harding, R., Kwiatkowski, D. and McKenzie, C. Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. *BMC Genet* **8** (2007), p. 52.
- Harding, R.M., Fullerton, S.M., Griffiths, R.C., Bond, J., Cox, M.J., Schneider, J.A., Moulin, D.S. and Clegg, J.B. Archaic African and Asian lineages in the genetic ancestry of modern humans. *Am J Hum Genet* **60** (1997), pp. 772-89.
- Hardison, R.C., Chui, D.H., Giardine, B., Riemer, C., Patrinos, G.P., Anagnou, N., Miller, W. and Wajcman, H. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* **19** (2002), pp. 225-33.
- Hardison, R.C., Chui, D.H., Riemer, C., Giardine, B., Lehvaslaiho, H., Wajcman, H. and Miller, W. Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. *Hemoglobin* **25** (2001), pp. 183-93.
- Hardison, R.C., Chui, D.H., Riemer, C.R., Miller, W., Carver, M.F., Molchanova, T.P., Efremov, G.D. and Huisman, T.H. Access to a syllabus of human hemoglobin variants (1996) via the World Wide Web. *Hemoglobin* **22** (1998), pp. 113-27.
- Hidalgo, P.C., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A. and Alvarez, I. Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetic* **5** (2005), pp. 217-222.
- Hughey, J.R., Du, M., Li, Q., Michalodimitrakis, M. and Stamatoyannopoulos, G. A search for beta thalassemia mutations in 4000 year old ancient DNAs of Minoan Cretans. *Blood Cells Mol Dis* **48** (2012), pp. 7-10.
- I.N.E.: Ascendencia etnico-racial. Instituto Nacional de Estadísticas (2011), pp. <http://www.ine.gub.uy/censos2011/resultadosfinales/pais%20poblacion.html>.
- Imen, M., Ikbél, B.M., Leila, C., Fethi, M., Amine, Z., Mohamed, B. and Salem, A. Restriction mapping of betaS locus among Tunisian sickle-cell patients. *Am J Hum Biol* **23** (2011), pp. 815-9.
- Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178** (1956), pp. 792-4.
- Ingram, V.M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* **180** (1957), pp. 326-8.

- Isola, E. La esclavitud en el Uruguay desde sus comienzos hasta su extinción, 1743-1852. *Comisión Nacional de Homenaje del Sesquicentenario de los hechos históricos de 1825. Talleres Gráficos Monteverde y Cia.* (1975).
- Jeffreys, A.J., Royle, N.J., Wilson, V. and Wong, Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* **332** (1988), pp. 278-81.
- Kalaydjieva, L., Eigel, A. and Horst, J. The molecular basis of beta thalassaemia in Bulgaria. *J Med Genet* **26** (1989), pp. 614-8.
- Keclard, L., Ollendorf, V., Berchel, C., Loret, H. and Merault, G. beta S haplotypes, alpha-globin gene status, and hematological data of sickle cell disease patients in Guadeloupe (F.W.I.). *Hemoglobin* **20** (1996), pp. 63-74.
- Kimura, E.M., Grignoli, C.R., Pinheiro, V.R., Costa, F.F. and Sonati, M.F. Thalassemia intermedia as a result of heterozygosis for beta 0 -thalassemia and alpha alpha alpha anti-3,7 genotype in a Brazilian patient. *Braz J Med Biol Res* **36** (2003), pp. 699-701.
- Kukreti, R., Dash, D., E, V.K., Chakravarty, S., Das, S.K., De, M. and Talukder, G. Spectrum of beta-thalassemia mutations and their association with allelic sequence polymorphisms at the beta-globin gene cluster in an Eastern Indian population. *Am J Hematol* **70** (2002), pp. 269-77.
- Kulozik, A.E., Wainscoat, J.S., Serjeant, G.R., Kar, B.C., Al-Awamy, B., Essan, G.J., Falusi, A.G., Haque, S.K., Hilali, A.M., Kate, S. and et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* **39** (1986), pp. 239-44.
- Lam, K.W. and Jeffreys, A.J. Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006), pp. 8921-7.
- Lam, K.W. and Jeffreys, A.J. Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007), pp. 10950-5.
- Latini, V., Vacca, L., Ristaldi, M.S., Marongiu, M.F., Memmi, M., Varesi, L. and Vona, G. Beta-globin gene cluster haplotypes in the Corsican and Sardinian populations. *Hum Biol* **75** (2003), pp. 855-71.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X. and Stamatoyannopoulos, G. Locus control regions. *Blood* **100** (2002), pp. 3077-86.
- Long, J.C., Chakravarti, A., Boehm, C.D., Antonarakis, S. and Kazazian, H.H. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am J Phys Anthropol* **81** (1990), pp. 113-30.
- Maeda, N., Bliska, J.B. and Smithies, O. Recombination and balanced chromosome polymorphism suggested by DNA sequences 5' to the human delta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** (1983), pp. 5012-6.

- Magana, M.T., Ongay, Z., Tagle, J., Bentura, G., Cobian, J.G., Perea, F.J., Casas-Castaneda, M., Sanchez-Lopez, Y.J. and Ibarra, B. Analysis of betaS and betaA genes in a Mexican population with African roots. *Blood Cells Mol Dis* **28** (2002), pp. 121-6.
- Magana, M.T., Perea, F.J., Gonzalez, J.R. and Ibarra, B. Genetic relationship of a Mexican Afromestizo population through the analysis of the 3' haplotype of the beta globin gene in betaA chromosomes. *Blood Cells Mol Dis* **39** (2007), pp. 169-77.
- Marrero, A.R., Das Neves Leite, F.P., De Almeida Carvalho, B., Peres, L.M., Kommers, T.C., Da Cruz, I.M., Salzano, F.M., Ruiz-Linares, A., Da Silva Junior, W.A. and Bortolini, M.C. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* **17** (2005), pp. 496-506.
- Martins, C.S., Ramalho, A.S., Sonati, M.F., Goncalves, M.S. and Costa, F.F. Molecular characterisation of beta thalassaemia heterozygotes in Brazil. *J Med Genet* **30** (1993a), pp. 797-8.
- Martins, M.C., Olim, G., Melo, J., Magalhaes, H.A. and Rodrigues, M.O. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet* **30** (1993b), pp. 235-9.
- Mattevi, V.S., Fiegenbaum, M., Salzano, F.M., Weiss, K.M., Moore, J., Monsalve, M.V., Devine, D.V. and Hutz, M.H. Beta-globin gene cluster haplotypes in two North American indigenous populations. *Am J Phys Anthropol* **112** (2000), pp. 311-7.
- Miranda, S.R., Fonseca, S.A., Figueiredo, M., Yamamoto, M., Grotto, H.Z., Saad, S.T. and Costa, F.F. Hb Köln [a2b298(FG5) val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Genet* **20** (1997).
- Modiano, D., Luoni, G., Sirima, B.S., Simpore, J., Verra, F., Konate, A., Rastrelli, E., Olivieri, A., Calissano, C., Paganotti, G.M., D'Urbano, L., Sanou, I., Sawadogo, A., Modiano, G. and Coluzzi, M. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **414** (2001), pp. 305-8.
- Moreno, N., Martínez, J., Blanco, Z., Osorio, L. and Hackshaw Beta-globin gene cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the State of Aragua. *Genetics and Molecular Biology* **25** (2002), pp. 21-24.
- Muniz, A., Corral, L., Alaez, C., Svarch, E., Espinosa, E., Carbonell, N., di Leo, R., Felicetti, L., Nagel, R.L. and Martinez, G. Sickle cell anemia and beta-gene cluster haplotypes in Cuba. *Am J Hematol* **49** (1995), pp. 163-4.
- Muniz, A., Martinez, G., Lavinha, J. and Pacheco, P. Beta-thalassaemia in Cubans: novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. *Am J Hematol* **64** (2000), pp. 7-14.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E. and Steinberg, M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev* **17** (2003), pp. 167-78.

- Naoum, P.C., Alvarez, F., Domingos, C.R., Ferrari, F., Moreira, H.W., Sampaio, Z.A., Mazieiro, P.A. and Castilho, E.M. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prêvalencia e distribuição geográfica. . *Rev. Bras.Pat.Clin* **23** (1987), pp. 68-79.
- Noguera, N.I., Bragos, I.M., Morisoli, L. and Milani, A.C. Screening for hemoglobinopathies in neonates in Argentina. *Haematologica* **84** (1999), pp. 468-70.
- Old, J.M., Heath, C., Fitches, A., Thein, S.L., Jeffreys, A.J., Petrou, M., Modell, B. and Weatherall, D.J. Meiotic recombination between two polymorphic restriction sites within the beta globin gene cluster. *J Med Genet* **23** (1986), pp. 14-8.
- Old, J.M., Petrou, M., Modell, B. and Weatherall, D.J. Feasibility of antenatal diagnosis of beta thalassaemia by DNA polymorphisms in Asian Indian and Cypriot populations. *Br J Haematol* **57** (1984), pp. 255-63.
- Oner, C., Dimovski, A.J., Altay, C., Gurgey, A., Gu, Y.C., Huisman, T.H. and Lanclos, K.D. Sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region of beta S chromosomes are associated with different levels of fetal globin in hemoglobin S homozygotes. *Blood* **79** (1992), pp. 813-9.
- Pagnier, J., Mears, J.G., Dunda-Belkhodja, O., Schaefer-Rego, K.E., Beldjord, C., Nagel, R.L. and Labie, D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (1984), pp. 1771-3.
- Pante-De-Sousa, G., Mousinho-Ribeiro, R.C., Dos Santos, E.J. and Guerreiro, J.F. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Ann Hum Biol* **26** (1999), pp. 365-73.
- Pante de Sousa, G., Mousinho-Ribeiro, R., Santos, E., Zago, M. and JF., G. Origin of the hemoglobin S in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. . *Genetics and Molecular Biology* (1998), pp. 427-430.
- Patrinos, G.P., Giardine, B., Riemer, C., Miller, W., Chui, D.H., Anagnou, N.P., Wajcman, H. and Hardison, R.C. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* **32** (2004), pp. D537-41.
- Pauling, L., Itano, H.A. and et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* **110** (1949), pp. 543-8.
- Pearson, H.A., Ehrenkranz, R.A., Rinder, H.M. and Riely, C.A. Hemosiderosis in a normal child secondary to oral iron medication. *Pediatrics* **105** (2000), pp. 429-31.
- Perea, F.J., Magana, M.T., Cobian, J.G., Sanchez-Lopez, J.Y., Chavez, M.L., Zamudio, G., Esparza, M.A., Lopez-Guido, B. and Ibarra, B. Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Mexican population. *Blood Cells Mol Dis* **33** (2004), pp. 150-2.
- Pereira, M.d.I., Dalmau, A.C. and Corrons, J.L. Molecular heterogeneity of beta-thalassemia alleles in Spain and its importance in the diagnosis and prevention of beta-thalassemia major and sickle cell disorders. *Hemoglobin* **33** (2009), pp. 226-34.

- Peschle, C., Mavilio, F., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Russo, G., Mastroberardino, G. and Marinucci, M. Erythropoietic development and hemoglobin switching in human embryos: cellular and molecular aspects. *Prog Clin Biol Res* **191** (1985), pp. 383-96.
- Pi, R. and Vidart, D., *El legado de los inmigrantes, I Nuestra Tierra*, Montevideo (1969).
- Piel, F.B., Patil, A.P., Howes, R.E., Nyangiri, O.A., Gething, P.W., Williams, T.N., Weatherall, D.J. and Hay, S.I. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* **1** (2010), p. 104.
- Pignataro, M., Soares, E.S., Pereira, W.A. and Dantas, T.M. Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Cad. Saúde Pública* **20** (2004), pp. 123-128.
- Piras, I., Vona, G., Falchi, A., Latini, V., Ristaldi, S., Vacca, L., Varesi, L. and Calo, C.M. Beta-globin cluster haplotypes in normal individuals and beta(0)39-thalassemia carriers from Sardinia, Italy. *Am J Hum Biol* **17** (2005), pp. 765-72.
- Pirastu, M., Galanello, R., Doherty, M.A., Tuveri, T., Cao, A. and Kan, Y.W. The same beta-globin gene mutation is present on nine different beta-thalassemia chromosomes in a Sardinian population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987), pp. 2882-5.
- Pritchard, J.K. and Przeworski, M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* **69** (2001), pp. 1-14.
- Rahimi, Z., Muniz, A., Akramipour, R., Tofieghzadeh, F., Mozafari, H., Vaisi-Raygani, A. and Parsian, A. Haplotype analysis of beta thalassemia patients in Western Iran. *Blood Cells Mol Dis* **42** (2009), pp. 140-3.
- Reichert, V.C., de Castro, S.M., Wagner, S.C., de Albuquerque, D.M., Hutz, M.H. and Leistner-Segal, S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol* **87** (2008), pp. 381-4.
- Rigoli, L., Meo, A., Miceli, M.R., Alessio, K., Caruso, R.A., La Rosa, M.A., Salpietro, D.C., Ricca, M. and Barberi, I. Molecular analysis of beta-thalassaemia patients in a high incidence area of southern Italy. *Clin Lab Haematol* **23** (2001), pp. 373-8.
- Rodriguez, W.E., Saenz, G.F. and Chaves, M.A. Hemoglobin S haplotypes: their epidemiologic, anthropologic and clinical importance. *Rev. Panam. Salud Pública* **3** (1998), pp. 1-8.
- Roldan, A., Gutierrez, M., Cygler, A., Bonduel, M., Sciuccati, G. and Torres, A.F. Molecular characterization of beta-thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* **54** (1997), pp. 179-82.
- Rossetti, L.C., Targovnik, H.M. and Varela, V. The molecular basis of beta-thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin. *Haematologica* **89** (2004), pp. 746-7.
- Rusanova, I., Cossio, G., Moreno, B., Javier Perea, F., De Borace, R.G., Perea, M., Escames, G. and Acuna-Castroviejo, D. beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am J Hum Biol* **23** (2011), pp. 377-80.

- Samarah, F., Ayesha, S., Athanasiou, M., Christakis, J. and Vavatsi, N. beta(S)-Globin gene cluster haplotypes in the West Bank of Palestine. *Hemoglobin* **33** (2009), pp. 143-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. . Ed 2da. Cold Spring Harbor Laboratory press. United States of America. (1989).
- Sans, M., *Estudio genético e histórico de la población del departamento de Tacuarembó, Uruguay*. (1994).
- Sans, M. and Barreto, I. El problema de la integración de los negros a la sociedad general. . *En L.E. Behares y O. Cures (Organizadores). Sociedad y Cultura en el Montevideo Colonial (pp. 265-280). Montevideo*. (1997), pp. 265-280.
- Sans, M., Barreto, I. and Portas, M. The evolution of the Uruguayan population: integration ways. *International Journal of Anthropology* **11** (1996), pp. 19-32.
- Sans, M., Salzano, F.M. and Chakraborty, R. Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* **69** (1997), pp. 161-70.
- Sans, M., Weimer, T.A., Franco, M.H., Salzano, F.M., Bentancor, N., Alvarez, I., Bianchi, N.O. and Chakraborty, R. Unequal contributions of male and female gene pools from parental populations in the African descendants of the city of Melo, Uruguay. *Am J Phys Anthropol* **118** (2002), pp. 33-44.
- Schneider, J.A., Peto, T.E., Boone, R.A., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. Direct measurement of the male recombination fraction in the human beta-globin hot spot. *Hum Mol Genet* **11** (2002), pp. 207-15.
- Shen, S.H., Slightom, J.L. and Smithies, O. A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell* **26** (1981), pp. 191-203.
- Shimizu, K., Hashimoto, T., Harihara, S., Tajima, K., Sonoda, S. and Zaninovic, V. Beta-globin gene haplotype characteristics of Colombian Amerinds in South America. *Hum Hered* **51** (2001), pp. 54-63.
- Song, G., Hsu, C.H., Riemer, C., Zhang, Y., Kim, H.L., Hoffmann, F., Zhang, L., Hardison, R.C., Green, E.D. and Miller, W. Conversion events in gene clusters. *BMC Evol Biol* **11** (2011), p. 226.
- Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R. and Nagel, R.L., *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge University Press (2001).
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28** (2011), pp. 2731-9.
- Torrioni, A., Schurr, T.G., Cabell, M.F., Brown, M.D., Neel, J.V., Larsen, M., Smith, D.G., Vullo, C.M. and Wallace, D.C. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* **53** (1993), pp. 563-90.

- Trabuchet, G., Elion, J., Baudot, G., Pagnier, J., Bouhass, R., Nigon, V.M., Labie, D. and Krishnamoorthy, R. Origin and spread of beta-globin gene mutations in India, Africa, and Mediterranean: analysis of the 5' flanking and intragenic sequences of beta S and beta C genes. *Hum Biol* **63** (1991), pp. 241-52.
- Varawalla, N.Y., Fitches, A.C. and Old, J.M. Analysis of beta-globin gene haplotypes in Asian Indians: origin and spread of beta-thalassaemia on the Indian subcontinent. *Hum Genet* **90** (1992), pp. 443-9.
- Veten, F.M., Abdelhamid, I.O., Meiloud, G.M., Ghaber, S.M., Salem, M.L., Abbes, S. and Houmeida, A.O. Hb S [beta6(A3)Glu-->Val, GAG>GTG] and beta-globin gene cluster haplotype distribution in Mauritania. *Hemoglobin* **36** (2012), pp. 311-5.
- Vidart, D. and Pi, R. El legado de los inmigrantes II. *Montevideo: Colección Nuestra Tierra*, 39. (1969).
- Villalobos-Arambula, A.R., Bustos, R., Casas-Castaneda, M., Gutierrez, E., Perea, F.J., Thein, S.L. and Ibarra, B. Beta-thalassaemia and beta[A] globin gene haplotypes in Mexican mestizos. *Hum Genet* **99** (1997), pp. 498-500.
- Villegas, A., Porres, A., Sanchez, J., Gonzalez, F.A., Perez-Clausell, C., Martinez, M., Murga, M.J., Cacha, J., Lozano, M., Fernandez-Fuertes, I., Del Arco, A., Arrizabalaga, B., Perez de Mendiguren, B., San Juan, I., Saavedra, R., Ricart, P., Sainz, C., Guerra, J.L., Munoz, J.A., Lago, C. and Anso, V.M. Red blood cell phenotypes in alpha-thalassems in the Spanish population. *Haematologica* **83** (1998), pp. 99-103.
- Villegas, A., Ropero, P., González, F.A., Anguita, E. and Espinos, D. The thalassaemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* **25** (2001), pp. 273-283.
- Vivenes De Lugo, M., Rodriguez-Larralde, A. and Castro De Guerra, D. Beta-globin gene cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the northeastern coast of Venezuela. *Am J Hum Biol* **15** (2003), pp. 29-37.
- Weatherall, D.J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* **115** (2001), pp. 4331-6.
- Webster, M.T., Clegg, J.B. and Harding, R.M. Common 5' beta-globin RFLP haplotypes harbour a surprising level of ancestral sequence mosaicism. *Hum Genet* **113** (2003), pp. 123-39.
- Webster, M.T., Wells, R.S. and Clegg, J.B. Analysis of variation in the human beta-globin gene cluster using a novel DHPLC technique. *Mutat Res* **501** (2002), pp. 99-103.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* **79** (2001a), pp. 704-712.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* **79** (2001b), pp. 704-712.
- Wheaterall, D.J. and Clegg, J.B.: *The Thalassaemia Syndromes*. Wiley-Blackwell (2001c).

- Wood, E.T., Stover, D.A., Slatkin, M., Nachman, M.W. and Hammer, M.F. The beta -globin recombinational hotspot reduces the effects of strong selection around HbC, a recently arisen mutation providing resistance to malaria. *Am J Hum Genet* **77** (2005), pp. 637-42.
- Zago, M.A., Figueiredo, M.S. and Ogo, S.H. Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol* **88** (1992), pp. 295-8.
- Zago, M.A., Silva, W.A., Jr., Dalle, B., Gualandro, S., Hutz, M.H., Lapoumeroulie, C., Tavella, M.H., Araujo, A.G., Krieger, J.E., Elion, J. and Krishnamoorthy, R. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol* **63** (2000), pp. 79-84.
- Zago, M.A., Silva, W.A., Jr., Gualandro, S., Yokomizu, I.K., Araujo, A.G., Tavela, M.H., Gerard, N., Krishnamoorthy, R. and Elion, J. Rearrangements of the beta-globin gene cluster in apparently typical betaS haplotypes. *Haematologica* **86** (2001), pp. 142-5.
- Zhang, W., Cai, W.W., Zhou, W.P., Li, H.P., Li, L., Yan, W., Deng, Q.K., Zhang, Y.P., Fu, Y.X. and Xu, X.M. Evidence of gene conversion in the evolutionary process of the codon 41/42 (-CTTT) mutation causing beta-thalassemia in southern China. *J Mol Evol* **66** (2008), pp. 436-45.

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

Este es el primer estudio que abarca la mayor parte de las alteraciones que causan hemoglobinopatías en nuestra población. Aunque parte de las conclusiones y perspectivas han sido expuestas en los capítulos correspondientes pretendemos realizar una conclusión general del trabajo realizado y plantear las perspectivas hacia el futuro.

En primer lugar queremos destacar que aunque no tan frecuente como lo observado en otras poblaciones americanas, las hemoglobinopatías y en particular las alfa-talasemias explican un porcentaje importante de las anemias microcíticas observadas en la población pediátrica del Uruguay, factor que hasta el momento no había sido tenido en cuenta y que no puede ser abordado con las estrategias actuales de salud pública. También, la mayor importancia de las alfa talasemias en individuos con ancestría africana puede ayudar a la implementación de políticas de salud focalizadas, más teniendo en cuenta que de acuerdo a datos del Instituto de Nacional de Estadísticas la población con ancestría africana presenta indicadores socio-económicos por debajo de la media de la población uruguaya.

El perfil de mutaciones de hemoglobinopatías en nuestra población remarca el carácter de población mezclada, que recibió el aporte de poblaciones europeas, africanas y amerindias siendo las hemoglobinopatías presentes en el Uruguay de origen europeo y africano. Estas características influyen en la heterogeneidad de patologías que pueden ser observadas, ya que europeos y africanos cuentan con mutaciones distintas pero en poblaciones como la nuestra puede estar presentes en un mismo individuo. Esta situación dificulta el asesoramiento genético e incluso el adecuado tratamiento, ya que las técnicas de diagnóstico utilizadas de rutina en los servicios de salud no contemplan estas especificidades. Por otra parte, constatamos la presencia de hemoglobinopatías raras, como la Hb Southampton observada en este trabajo, que no pueden ser diagnosticadas con las técnicas actualmente usadas.

La distribución de mutaciones de β -talasemias así como los haplotipos asociados a la mutación de la HbS observadas en nuestra población indican que además del aporte diferencial de las poblaciones ancestrales, la distribución de mutaciones y haplotipos está influida por factores micro-evolutivos como deriva génica, efectos fundadores, cuellos de botella, etc. Esta situación hace que aunque similar a lo observado en los países de la región y en algunas poblaciones ancestrales, el perfil de mutaciones y haplotipos observados en nuestro país sea único y producto de la interacción de factores históricos, genéticos y demográficos. En este sentido hemos confirmado la elevada frecuencia de haplotipos atípicos asociados a la mutación de la HbS y hemos aportado evidencia de que esta elevada frecuencia se debe a factores micro-evolutivos ocurridos en nuestra población. Asimismo, hemos determinado que estos haplotipos atípicos ya estaban presentes en las poblaciones africanas ancestrales y no fueron generados en nuestra población por mecanismos como la recombinación o conversión génica.

Los resultados obtenidos abren una oportunidad de profundizar el estudio epidemiológico de las hemoglobinopatías en la población uruguaya en muestras mayores y más representativas del país. Por ejemplo, aunque fue estimada la frecuencia de β -talasemias en una muestra pediátrica del CHPR, esta frecuencia posiblemente esté subestimada ya que la muestra usada se presentaba una mayor ancestría africana que la observada en la población general. Por otra parte, la muestra usada, aunque presentaba individuos de todo el país, fue obtenida en Montevideo y la población del Uruguay presenta cierta heterogeneidad geográfica respecto a las poblaciones que lo conformaron. En el Norte del país hay un mayor aporte de poblaciones portuguesas, brasileñas y con ancestría africana lo cual puede incidir en las frecuencias globales y regionales de hemoglobinopatías en el Uruguay. Además en las regiones antes mencionadas la distribución de mutaciones de β -talasemias pueden llegar a ser distintas. Sería interesante corroborar la baja frecuencia

observada de las mutaciones IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-1 (G→A) las cuales son frecuentes en España y Portugal así como en Argentina y Brasil.

El estudio de polimorfismos adicionales en los cromosomas con mutaciones de β -talasemias, así como en los haplotipos atípicos asociados a la mutación de la HbS, puede contribuir al conocimiento de los factores que influyeron en la actual distribución de estos en el Uruguay; asimismo, puede colaborar a inferir los mecanismos genéticos que contribuyeron a moldear la actual estructura de la población uruguaya.

Anexo 1. Cebadores de y condiciones de PCR utilizadas

Alfa talasemias delecionales

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Desnaturalización	Programa Ciclado	Extensión final
LIS1-F	GTCGTCACTGGCAGCGTAGATC	2503pb	95° 5 minutos	97° 45 segundos	72° 5 minuto
LIS1-R	GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG		Con Taq Hot-start	59° 75 segundos	
α2/3,7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	2022/2029pb	Betaina 1mmol/mL	72° 150 segundos	
3,7/20,5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG				
α2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	1800pb (con α2/3,7-F)			
4,2-F	GGTTTACCCATGIGGTGCCTC	1628 pb			
4,2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTC				
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	1349pb			
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC				
20,5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	1007pb (con 3,7/20,5-R)			
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACAGTAC				
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	807 pb			
FIL-F	TGCAAATATGTTTCTCTCATTCTGTG	1116 pb			
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC				

Alfa talasemias no delecionales

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Desnaturalización	Programa Ciclado (30 ciclos)	Extensión final
C1-F	TGGAGGGTGGAGACGTCCTG	1073pb (gen HBA1)	94° 10 minutos	94° 45 segundos	72° 10 minutos
C2-R	CCATGCTGCCACGTTTCTGA		Con DMSO 10%	56° 60 segundos	
C3-R	CCATGCTGGCACGTTTCTGAGG	1073pb (gen HBA2)		72° 60 segundos	

Mutaciones de beta talasemia, HbS y polimorfismos del haplotipo 3'

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Programa		
			Desnaturalización	Ciclado (30 ciclos)	Extensión final
P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	720pb	94° 5 minutos	94° 45 segundos	72° 5 minutos
P5	TCATTCGTCGTGTTCCCATTC			56° 45 segundos	
P58	AATCCAGCTACCATTCTGC	*334pb		72° 60 segundos	
P7	TCCAGATGCTCAAGGCCCTTC			*72° 30 segundos	

Haplotipos 5'

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Programa		
			Desnaturalización	Ciclado (30 ciclos)	Extensión final
ϵ -HincII-F	CCTTCCCAGTGAGAAGTATAAGCAG	*710pb	94° 5 minutos	94° 45 segundos	72° 5 minutos
ϵ -HincII-R	AGTCATTGGTCAAGGCTGACCTGTG			56° 45 segundos	
$\zeta\gamma$ -HindIII-F	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	781pb		72° 60 segundos	
$\zeta\gamma$ -HindIII-R	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA			*60° 45 segundos	
$\Lambda\gamma$ -HindIII-F	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	761pb			
$\Lambda\gamma$ -HindIII-R	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA				
$\Psi\beta$ -HincII-F	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	700pb			
$\Psi\beta$ -HincII-R	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT				
3' $\Psi\beta$ -HincII-F	TCTGCATTTGACTCTGTAGC	770pb			
3' $\Psi\beta$ -HincII-R	GGACCCTAACTGATATAACTA				
5' β -Hinfl-F	CTACGCCTGACCTCATAAATG	386pb			
5' β -Hinfl-R	CTAATCTGCAAGAGTGTCT				

Región R/T

Sitios de restricción RsaI y TaqI					
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Programa		
<i>RsaI</i> -F	AGGGTGAGGAAACCTGGGAAATGTCAGTTC	875pb	Desnaturalización 94° 2 minutos	Ciclado (35 ciclos) 94° 60 segundos	Extensión final 72° 7 minutos
<i>RsaI</i> -R	ACTTGCTGTTGGTTTCAGAGCAGGTAGGAG		60° 60 segundos		
<i>TaqI</i> -F	ATTTCTAACCTCTGACCTCCAACCTCAGTG	1179pb		72° 60 segundos	
<i>TaqI</i> -R	CGGTGATGTCAGTCGTGAACACAAGAATAG				
Secuencias R y T					
RT-F	TGTGAATTTTGTAGAAGGATATAACCCATA	454pb	Desnaturalización 95° 30 segundos	Ciclado (37 ciclos) 95° 30 segundos	Extensión final 72° 5 minutos
RTG-R	AGGTGGAGGTCAGAGGTTAGAAATCAAAC		62°-56° 30 segundos		
RTC-R*	AGGTGGAGGTCAGAGGTTAGAAATCAAAG		72° 60 segundos *60°-56° 30 segundos		
Disminución 0,5° por ciclo en el paso de hibridación					
Región HS2 LCR					
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Programa		
<i>HS2</i> -F	CAGGGCAGATGGCAAAAA	459pb	Desnaturalización 94° 5 minutos	Ciclado (30 ciclos) 94° 30 segundos	Extensión final 72° 10 minutos
<i>HS2</i> -R	CTGACCCCGTATGTGAGCA		62° 75 segundos 72° 15 segundos		
Región ATxTy					
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Amplicon	Programa		
5'β-HinfI-F	CTACGCCTGACCTCATAAATG	1322pb	Desnaturalización 94° 5 minutos	Ciclado (35 ciclos) 94° 30 segundos	Extensión final 72° 10 minutos
HbS-R	CAGTAACGGCAGACTTCTACA		56° 45 segundos		
HbA-R	CAGTAACGGCAGACTTCTACT		72° 90 segundos		
Seq	GGTGTCTGTTTGAGGTT		Primer para secuenciación		

Anexo 2. Secuencias de la región R/T

>49-1R_RTJDL

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>50-2R_RTJDL

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>51-3R_RTJDL

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>52-4R_RTJDL

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>25_RTJ

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>26_RTJ

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>27_RTJ

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGATTTCACAGTTATATCTAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCTCAAGTTTGATT

>16_RTJ

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCACCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAA

>18_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCCAAGTTTGATT

>12_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCCAAGTTTGATT

>15_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCCAAGTTTGATT

>23_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCCAAGTTTGATT

>24_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCCAAGTTTGATT

>22_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGTGTCAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTG
ACTTCCATTCTAACCCACATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCTGG
GATTTTGGGGACTATGTCTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTA
AGGTCCTTCATTTAACTTTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTATATA
TAGCCTGTATAATCCCAATTCCCAAGTTTGATT

>53-1T_RTF_JDL
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>7_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACCTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTAATAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>8_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>1_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>2_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>5_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>3_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>10_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>11_RTF
ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTC
AGCTTTTCACTGTGT--
CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>4_RTF

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGT--

CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

>6_RTF

ATACCATGTGGCTCATCCTCCTTACATACATTTCCCATCTTTCACCCTACCTTTTCCTTTTTGTTTC
AGCTTTTCACTGTGT--

CAAAATCTAGAACCTTATCTCCTACCTGCTCTGAAACCAACAGCAAGTTGACTTCCATTCTAACCCA
CATTGGCATTACACTAATTAAAATCGATACTGAGTTCTAAAATCATCGGGGATTTGGGGACTATGT
CTTACTTCATACTTCCTTGAGATTTACATTAAATGTTGGTGTTCATTAAAGGTCCTTCATTTAACT
TTGTATTCATCACACTCTTGGATTCACAGTTATATCTAAACTCTTAAATACAGCCTGTATAATCCCA
ATTCCCAACTTTGATT

Anexo 3. Secuencias de la región AT_xT_y

>815

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTNCNCNCATNCNTATACATATATATGCATTCNTTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCTCANG
CANGCTAATAAATTATGTCTAAAAATANAATAAATACAAATCAANGNG

>830

GCGNCNCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTGATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAATATA-
TATATATATATATGTATATATACACACANACATATACATATATATGCATTCATTTGNTGTTGTTTT
CTTAATTTGCTCANGCATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAGAATAAANACNNNTTTNTNT

>3

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTKATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAANANANTATNTNTNNNNNTNN
NTNNNNCCCCNCNNNCNTANNCNTNNNNNNGCNTTNNTTTGTGTTGTTTTNTNANTTNNNNNNNG
NNNNNNANNAANTNNNNNNNAAAANNANAANAANNANAANNANNGNN

>4

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATNTNTNTGTGT
ATATGTNCNCNCNTACATNTNCNTATATNTGCNTTCNTTTGTNGTTGTTTTCTTAATTTGCTCATG
CNTGNTAATAANTTATGTCTAAAAATANAAWAANTNCAANTNNNTNTN

>5

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTGATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAATATA-
TATATATATATNTGTATATAYACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTT
CTTAATTTGCTCATGCTAATAANNTATGTCTAAAAATANAATANATANNNNNNN-TGTG

>6

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATNTGTGT
NTATGTACNCNCATACATATACATATATANGCATTTCATTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCNCANG
CANGCTAANAATTATGTCTAAAAATANAANAATAAATACAAATCAANGNG

>7

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTTCTNAATTTGCTCATG
CATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATANAATAAATACAAATCAATGTG

>8

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTTCTNAATTTGCTCATG
CATGCTAATAAATTANGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCAATGTG

>9

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATNTNTNTGTGT
ATNTGTACNCNCATACNTATACATATATNNGCATTTCNTTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCTCANG
CANGCTAATAAATTNTGTCTAAAAATANAANAANACAAATCAANGNG

>10

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTGATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAATATA-
TATATATATATATGTATATATACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTT
CTTAATTTGCTCATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCANTGTG

>11

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCTCATG
CATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCAATGTG

>12

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTKATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAANANANTNNNTNTANTNGTGT
NTTNTCCCCCNNTNCNTNNNCNTATNNNNCNTNNTTTNTTGNTGTTTTTNTTANTTNNCNNNN
NNNNNNANNAANTNNNNNNNAAAANNANAAAAANNCAANNNTNNN

>13

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCTCATG
CATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATANAATAAATACAAATCAATGTG

>14

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTACACACATACATATACATATATATNCATTCATTTGTTGTTGTTTTCTNAATTTGCTCANG
CATGCTAATAAATTANGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCANTGTG

>15

GNNCTNCNGAATNNGCNAAAATACTTACNNNACANAANGGATGAAAACCTCTANNNCNTTCTNANCN
NATCTTNCNTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAANAGAANGAAAAANTNTNTATNTNNGNGT
ATATGTACACACNTACNTATNCATANATATGCATTCNTTTGTTGTTGTTTTNCTNANTTNGCNCANG
NATGCNAATAANTTANGTCTNAAAANTANAATAAANACAANTCANTGTG

>16

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTGATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAATATA-
TATATATATATATGTATATATACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTT
CTTAATTTGCTCATGCATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCAATGTG

>17

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTGATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAATATA-
TATATATATATATGTATATATACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGNTGTTGTTTT
CTTAATTTGCTCNTGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCANTGTG

>18

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTGATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAATATA-
TATATATATATATGTATATATACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTT
CTTAATTTGCTCATGCNTGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAGAATAAATACAAATCAATGTG

>19

GNGTCTNCAGAATATGCNAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACNCNACCTCAGTNCTAAGCA
TATCTTCTCNTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAANAAAAAATNTNTATNTATGTGT
ATANGTNCACACNNACNTATNCATANATANGCATTCTNTTTGTTGTTGTTNTNCTNANTTNGCNCANG
NATGCNAATAANNANGTCTNAAAANTNGAATNAANACNAATCANTGTG

>20

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATNTNTNTGTGT
ATNTGTNCNCNCATACNTATACNTATATATGCATTCNTTTGTTGTTGTTTTCTNAATTTNGCNCANG
CANGCTAANAATTTATGTCTAAAAATANAANAATAAATACAAATCANNNG

>21

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTNCNGGACANAANGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATANGTGN
ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATTCATTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCTCATG
CATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATANAATAAATACAAATCAATGTG

>22

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTAAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGTGT
ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATCCATTTGTTGTTGTTTTCTTAATTTGCTCATG
CATGCTAATAAATTATGTCTAAAAATAAATAAATAAATACAAATCAATGTG

>23

GCGTCTCCAGAATATGCAAAATACTTACAGGACAGAATGGATGAAAACCTCTACCTCAGTTCTNAGCA
TATCTTCTCCTTATTTGGATTAAAACCTTCTGGTAAGAAAAGAAAAAATATATATATATGNNT

ATATGTACACACATACATATACATATATATGCATTCNNTTGGTTGGTTTTCTTAATTTGTCATG
CATGCTAATAANTTATGTCTAAAAATANAATAAATACAAATCAATGTG

Anexo 4. Beta-Globin Gene Cluster Haplotypes in Afro-Uruguayans from Two Geographical Regions (South and North). Da Luz et al, Am. J. Hum. Biol 2010 22:124-128