

Tesis de Maestría

Screening poblacional de portadores de hemoglobina S en Mendoza, Argentina

Pott Godoy, María Clara

2006

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pott Godoy, María Clara. (2006). Screening poblacional de portadores de hemoglobina S en Mendoza, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4205_PottGodoy

Cita tipo Chicago:

Pott Godoy, María Clara. "Screening poblacional de portadores de hemoglobina S en Mendoza, Argentina". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4205_PottGodoy

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

Tesis para optar por el título de
"MAGISTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA"
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

*Screening poblacional de portadores de
Hemoglobina S en Mendoza, Argentina*

María Clara Pott Godoy

77820

Dr. Luis Segundo Mayorga
Director

Dra. María Roqué
Co-Director

Laboratorio de Biología Celular y Molecular
IHEM (CONICET-UNCuyo)
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo
Mendoza.

Agradecimientos

Al **Dr. Luis Mayorga**, por haberme iniciado en el camino de la ciencia, alentado en mis momentos de dudas y confiado en mi capacidad. Por su sinceridad, por su enorme generosidad en transmitirme el pensamiento científico y por ser mi mentor.

A la **Dra. María Roqué**, quien guió mis primeros pasos en la biología molecular, por su paciencia, amistad y por la fuerza que siempre supo transmitirme.

Al **Dr. Eduardo Pusiol**, por su apoyo constante y por haberme facilitado las muestras para comenzar a realizar este trabajo.

A la **Dra. Maldonado**, quien desinteresadamente me procuró la muestra positiva que me permitió poner a punto las técnicas moleculares.

A los integrantes del **Laboratorio del Hospital Español de Mendoza y Hospital Lagomaggiore de Mendoza** por su colaboración al facilitarme las muestras para realizar el screening.

A mis **Compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular**, por su colaboración, sus palabras de aliento y por la alegría de los días compartidos.

A mis **Compañeros de los Laboratorios 106, 107 y 108**, por los buenos momentos compartidos y por los que vendrán...

A los **Profesores de la Maestría**, por la generosidad con que nos brindaron sus conocimientos y su incansable dedicación.

Al **Dr. Fernando Juan Pitossi**, por la claridad con que supo transmitir sus conocimientos y por la oportunidad de seguir haciendo ciencia.

A la **Dra. Belén Cadenas**, por su incondicional apoyo y oportunos consejos.

A **Carina** y a **Vero**, por la generosidad con la que comparten día a día sus conocimientos y por nuestra amistad.

A **Verito** y **Rodolfo**, porque fueron mis primeros amigos de la Maestría, compartimos alegrías y sinsabores, éxitos y fracasos. Porque nuestra amistad perdure...

A mi querida familia, a mis **padres**, mis **hermanos** y mi **tío Guilo**, quienes tanto me han apoyado en este proyecto y en las distintas etapas de mi vida.

A **Dios**, que siempre iluminó mi camino.

A mi Madre,
que me enseñó a no claudicar ante las
adversidades y a creer en la voluntad
humana, capaz de crear hechos
trascendentes que despierten legítimas
aspiraciones y convoquen a la acción.

Índice

Introducción	
1. Síntesis de hemoglobina	9
1.1 Síntesis del grupo hemo	9
1.2 Síntesis de la globina	10
1.2.1 Locus alfa globina	11
1.2.2 Locus beta globina	11
1.2.3 Ontogenia de la síntesis de hemoglobina	12
2. Drepanocitosis	13
2.1 Historia	13
2.2 Patogénesis molecular	15
2.2.1 Cinética de polimerización de la Hemoglobina S	16
2.2.1.1 Presencia de Hb F	19
2.2.1.2 Concentración de Hemoglobina	19
2.2.2 Interacción GR con Hb S – Endotelio	19
2.3 Tratamiento y profilaxis	21
3. Screening poblacional	22
4. Distribución poblacional	24
Objetivos	27
Materiales y métodos	29
Resultados	33
1. PCR aleloespecífica	34
2. PCR-RFLP	37
3. Estimación de la prevalencia de HbS en la población muestreada	40
Discusión	41
Bibliografía	44

Resumen

La drepanocitosis es una enfermedad autosómica recesiva que es causada por una mutación en el codón 6 del gen de la beta globina (HBB) produciendo la Hemoglobina S (Hb S). La Hb S constituye una de las hemoglobinas anormales de mayor prevalencia mundial. La frecuencia de heterocigotas varía significativamente alrededor del mundo, con elevadas tasas asociadas a zonas donde existe alta incidencia de malaria.

El objetivo del siguiente trabajo fue determinar la frecuencia alélica de esta mutación en la población de la ciudad de Mendoza, Argentina. Para ello se utilizaron 1000 muestras de sangre extraídas de tres centros bioquímicos del Gran Mendoza (dos hospitales y un laboratorio privado) que fueron combinados en 100 pooles, cada uno conteniendo 10 individuos.

La búsqueda de portadores se realizó por dos técnicas de biología molecular: PCR aleloespecífica y PCR y posterior digestión con enzimas de restricción (PCR - RFLP). No se detectaron muestras con la mutación A→T en el codón 6 del gen HBB con ninguna de las dos técnicas empleadas. Esto implica que ninguno de los 2000 cromosomas analizados tenía la variante S de la hemoglobina A. La frecuencia estimada de este alelo en la población de Mendoza es por lo tanto cero, con un límite de confianza del 95% de que el valor poblacional no sea superior al 0.15%.

Esta frecuencia alélica es similar a la reportada en un estudio poblacional llevado a cabo en dadores de sangre residentes en el Gran Buenos Aires y que hasta la ejecución de este trabajo era el único estudio poblacional de esta enfermedad realizado en nuestro país.

Abstract

Sickle Cell disease is an autosomal recessive disease caused by a mutation in the sixth codon of the beta globin gene (HBB) called sickle hemoglobin (Hb S). Hb S is among the most prevalent abnormal hemoglobin in the world. The carrier frequency varies around the world, its distribution is related to areas where malaria is or was once endemic.

Our aim was to perform a screening of this mutation in the population of Mendoza, Argentina. For the screening, 1000 blood samples were obtained from three different centers in Mendoza city and were combined in 100 pools each containing 10 different blood samples.

Our strategy to detect sickle cell carriers was based in two PCR techniques: Allele Specific Amplification and PCR combined with RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). The mutation A→ T in the sixth codon of the HBB gene was not detected in the pools with these PCR based methods. None of the 2000 chromosomes analyzed had Hb S. In this study we have obtained an allelic estimation of zero, with confidence level of 95% that the population value was not above 0.15%.

This carrier frequency is not significantly different from the frequency of Sickle Cell Trait obtained in a population study performed on blood donors from Buenos Aires city.

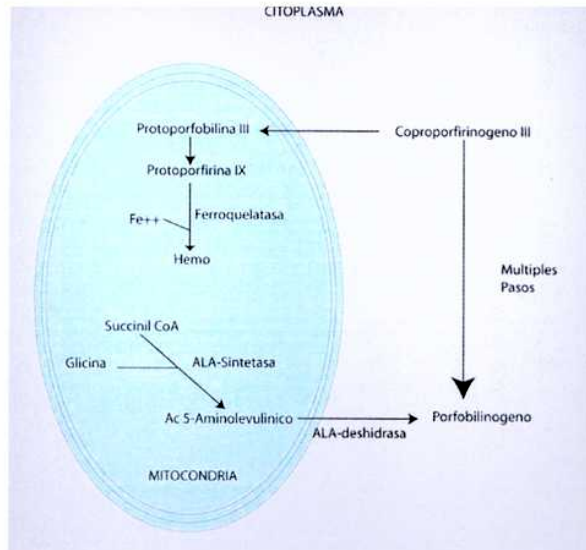
Introducción

1.Síntesis de hemoglobina

La hemoglobina es una proteína intracitoplasmática de los glóbulos rojos (GR) o eritrocitos, responsable de transportar el oxígeno a los distintos tejidos.¹ La síntesis de hemoglobina requiere la producción coordinada del grupo hem y de la globina. El hem es el grupo prostético que media la unión reversible de la hemoglobina al oxígeno. Las globinas son las proteínas que rodean y protegen a la molécula del hem.

1.1 Síntesis del hemo

La síntesis del hem se lleva a cabo a través de una compleja serie de pasos que involucra a enzimas mitocondriales y citosólicas de los GR. El primer paso en la síntesis tiene lugar dentro de la mitocondria, donde se produce la condensación de la succinil CoA y la glicina por la ALA sintetasa para formar el ácido 5 aminolevulínico (ALA). Esta molécula es luego transportada al citosol donde una serie de reacciones produce una estructura cíclica llamada coproporfirinógeno III la cual vuelve a ingresar a la mitocondria donde se forma la protoporfirina IX. Por último, una enzima llamada ferroquelatasa inserta la molécula de hierro dentro de la estructura cíclica para formar el grupo hem.



Figural. Esquema de la síntesis del hemo

1.2 Síntesis de la globina

La combinación de cuatro cadenas de globina, cada una con su grupo hem, se combinan para formar la estructura tetramérica de hemoglobina. Dos de las cadenas son alfa (α ó ζ) y las otras se denominan “no alfa” (β , ϵ , γ ó δ). Con excepción de las primeras semanas de gestación, durante la embriogénesis, siempre se encuentran presentes dos cadenas alfa. Distintas variables son las responsables de la naturaleza de las cadenas “no alfa” y se corresponde con los requerimientos de oxígeno y la afinidad por el mismo de la molécula de hemoglobina. Durante la vida fetal la cadena alfa se combina con la cadena gamma constituyendo lo que se denomina Hemoglobina Fetal (Hb F) que posee una mayor afinidad por el oxígeno lo que permite una correcta transferencia de oxígeno a través de la placenta desde la circulación materna a la fetal. Después del nacimiento, se combina con la cadena beta, constituyendo la Hemoglobina del Adulto (Hb A) que se convierte en la principal hemoglobina desde las 18 a 24 semanas de vida en adelante.

1.2.1 Locus alfa globina

Cada cromosoma 16 tiene dos genes de alfa globina alineados uno a continuación del otro en el cromosoma. Estos genes son idénticos pero se los denomina alfa 1 y alfa 2 para fines prácticos. Como cada célula tiene dos cromosomas (uno materno y otro paterno), existen cuatro genes alfa destinados a producir cada uno aproximadamente un cuarto de las cadenas de alfa globina necesarias para la síntesis de hemoglobina. No se conoce el mecanismo que lleva a cabo esta coordinación. Está descrita la presencia de un promotor 5' (río arriba) en cada gen y además existe una región enhancer llamada LCR (locus control region) que se requiere para la óptima expresión génica. Este enhancer LCR se encuentra varias kilobases río arriba de los genes alfa.

Existen también dos genes en este locus designados zeta que son expresados en la embriogénesis temprana y son los sustitutos de los genes alfa durante esta etapa.

1.2.2 Locus beta globina

La secuencia de genes en este locus es : epsilon, gamma, delta y beta. Existen dos copias de genes gamma en cada cromosoma 11, mientras que de los demás genes existe solo una copia. Estos genes “no alfa” se expresan en las cantidades necesarias para formar el tetrámero con las cadenas alfa. El mecanismo de este balance proteico preciso no está claro todavía.

El gen epsilon es expresado sólo inicialmente en la embriogénesis durante las primeras semanas. Luego comienza la expresión de los dos genes gamma que unido a las cadenas de alfa globina forman la Hb F presente durante el desarrollo fetal. Esta producción de cadenas gamma comienza a declinar cerca del nacimiento

junto con el aumento de la síntesis de cadenas beta. En la infancia, sólo se encuentran trazas de Hb F.

El gen delta, que se encuentra entre los genes gamma y beta, produce una pequeña proporción de delta globina en niños y adultos. La unión de dos cadenas delta y dos alfa constituyen la Hemoglobina A₂ que constituye menos del 3% de la hemoglobina en el adulto.

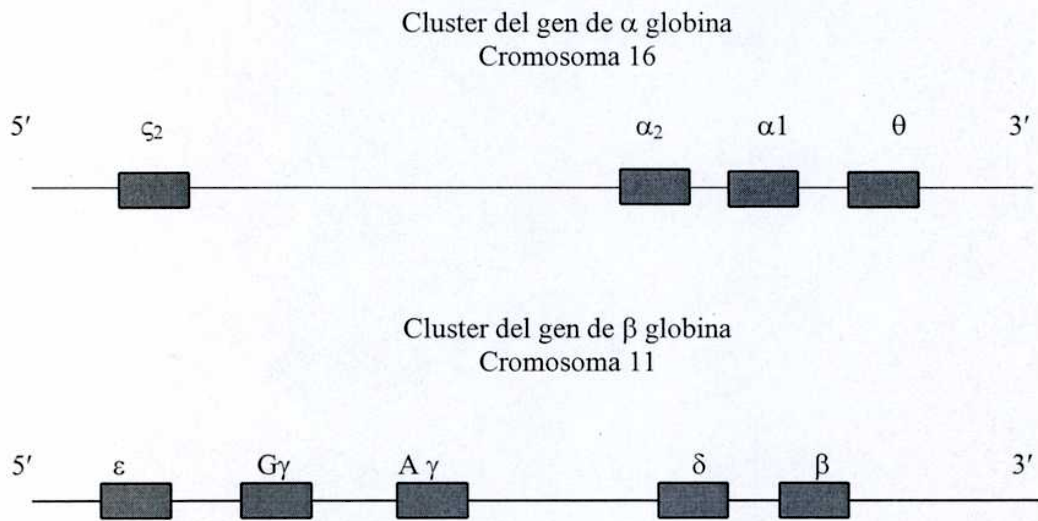


Figura 2. Esquema del locus de α y β globina

1.2.3 Ontogenia de la síntesis de hemoglobina

Durante el desarrollo los genes de la α y β globina son activados secuencialmente.

Los genes involucrados están ubicados en dirección 5'→ 3' en ambos cromosomas de acuerdo al orden cronológico en el que son expresados. Mientras que en las cadenas tipo alfa existe un solo cambio desde la embriogénesis hasta la etapa adulta, las cadenas tipo "no alfa" sufren dos cambios, el primero desde

la embriogénesis hasta la etapa fetal y el segundo desde esta última hasta la etapa adulta.

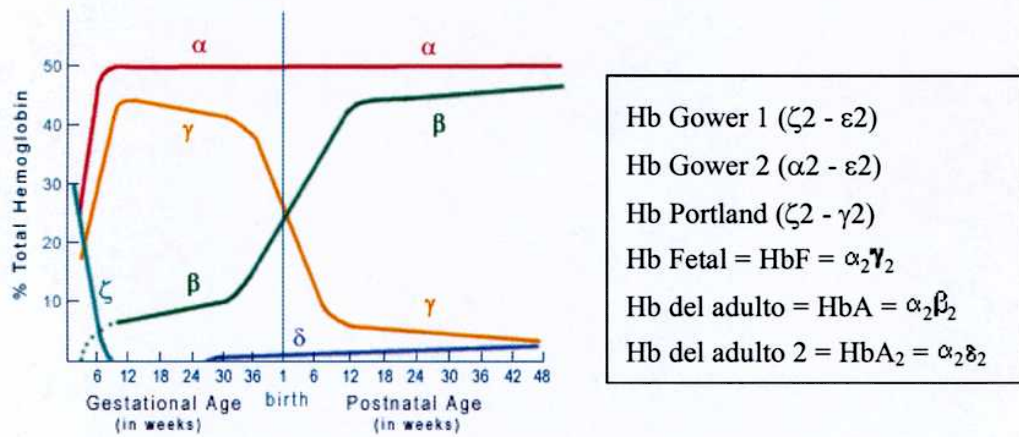


Figura 3. Esquema temporal de la síntesis de los distintos tipos de hemoglobina

1. Drepanocitosis

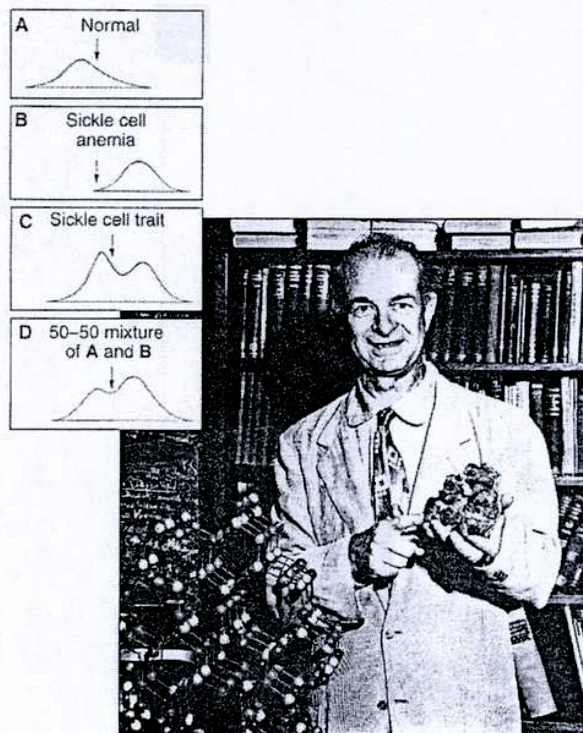
La drepanocitosis es una enfermedad autósomica recesiva que produce niveles bajos de hemoglobina, anemia hemolítica, episodios recurrentes de dolor e infecciones severas que generalmente comienzan a temprana edad.

1.1 Historia

En Noviembre de 1949 apareció un trabajo en el vol 110 de Science que se tituló "Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease". En este artículo, Linus Pauling y colaboradores mostraban que la hemoglobina de los pacientes que padecían drepanocitosis tenía distinta carga eléctrica que la hemoglobina de los individuos sanos. Este artículo fue la semilla inicial que demostró por un lado que la causa de una enfermedad puede deberse a cambios en la estructura molecular de una proteína abriendo la posibilidad que más enfermedades puedan ser explicadas de este modo. Y por otro lado, como se conocía que la drepanocitosis era una

enfermedad hereditaria, se demostró que los genes determinan precisamente la estructura de una proteína.

Linus Pauling no sólo fue capaz de demostrar que los pacientes con drepanocitosis (homocigotas para la mutación) tenían otro tipo de hemoglobina que los individuos normales sino que también demostró que los pacientes con rasgo drepanocítico o portadores (heterocigotas para la mutación) contenían en partes casi iguales hemoglobina normal y drepanocítica, concluyendo que el rasgo drepanocítico correspondía a una condición heterocigota mientras que la drepanocitosis correspondía a homocigosis.²



Hegemonic hemoglobins. Linus Pauling with a model and sample of beryl silicate. (Inset) Figure 3 from Pauling's seminal paper (1) showing that normal and sickle cell hemoglobin have different electrophoretic mobilities.

Figura 4. Foto de Linus Pauling tomada de la revista Science, volumen 286, 1999 al cumplirse 50 años de la publicación de "Sickle Cell Anemia, a molecular disease" por Linus Pauling en la misma revista en el año 1949. En los gráficos A-D se puede observar la diferencia de movilidad electroforética de la hemoglobina extraída de pacientes normales, heterocigotas y homocigotas.

2.2 Patogénesis molecular

La drepanocitosis es causada por una variante del gen de la β globina (HBB) produciendo una hemoglobina anormal llamada Hemoglobina S (Hb S). La única mutación conocida relacionada con la enfermedad es una mutación puntual que resulta en una transversión A \rightarrow T en el sexto codón del gen produciendo una sustitución de Acido Glutámico por Valina (Glu \rightarrow Val) en la proteína resultante. El empaquetamiento de altas concentraciones de hemoglobina en los glóbulos rojos requiere que la proteína sea extremadamente soluble. Cuando la Hb S se desoxigena, este reemplazo de aminoácidos Glu \rightarrow Val, resulta en una interacción hidrofóbica con otra molécula de hemoglobina llevando a la agregación en largos polímeros. Esta polimerización produce un cambio en la forma del eritrocito, de disco bicóncavo a forma curva o de hoz, y una disminución en la flexibilidad de la membrana celular. Es así como estos glóbulos, deformados y rígidos, quedan atrapados en los pequeños vasos sanguíneos y son los responsables del fenómenos de vaso oclusión.³

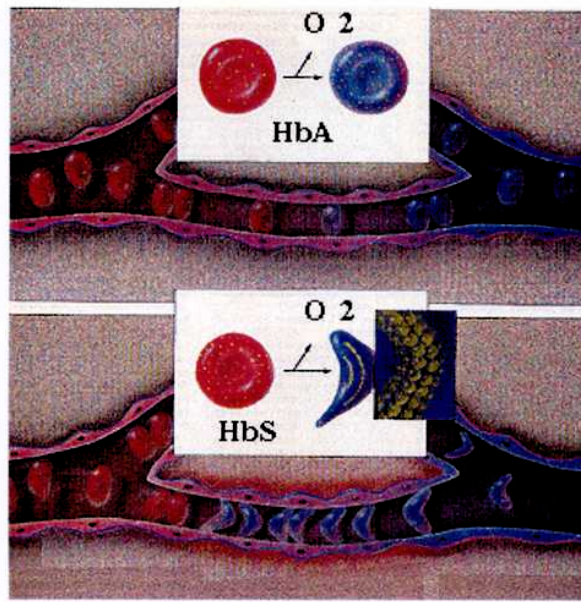


Figura 5. El esquema muestra los cambios que ocurren cuando un eritrocito normal y uno con HbS liberan el oxígeno en la microcirculación. La parte superior del diagrama muestra la conservación de la forma bicóncava del GR. En la parte inferior se observa la polimerización de la hemoglobina en el GR falciforme cuando éste libera el oxígeno en los capilares.

2.2.1 Cinética de polimerización de la Hemoglobina S

La polimerización de la hemoglobina S es un evento extremadamente dinámico. La cinética de formación del polímero es un determinante crítico de la forma y morfología del GR.⁴ Cuando la desoxigenación es rápida, existen múltiples eventos independientes de polimerización que resultan en la formación de una textura granular que no altera la forma disco bicóncava del GR. Pero cuando los GR que poseen Hb S son parcial o lentamente desoxigenados, se forma un núcleo de agregación de moléculas desoxigenadas que luego va creciendo y en el que se van alineando las fibras, transformando al GR en la clásica forma de hoz de la drepanocitosis⁵. Esta deformación del GR producido por el alineamiento de las fibras de Hb S tiene un rol crítico en la perturbación de la estructura y función de la membrana del GR, producida en parte por el stress oxidativo.⁵

La tasa de formación del polímero en los GR circulantes depende de tres variables independientes:

- el grado de desoxigenación del GR
- la concentración intracelular de hemoglobina
- la presencia o ausencia de Hb F

Debido a que el tiempo de tránsito en la microcirculación es pequeño con respecto al tiempo necesario para la formación de los núcleos de agregación, éstos no se forman en la mayoría de las GR (alrededor de 80%) durante el pasaje por las arteriolas y los capilares.

La polimerización y cambio de forma del GR no es el único problema en la drepanocitosis sino que son los continuos episodios de polimerización/despolimerización durante la oxigenación y desoxigenación del GR que vuelve a las membranas del mismo muy rígidas. Esta rigidez de membrana no le permite al GR moverse a través de la microcirculación, bloqueando de alguna manera el flujo de sangre local. Ésto amplificado varias veces produce hypoxia tisular con el consiguiente dolor y daño de órganos (<http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html>)

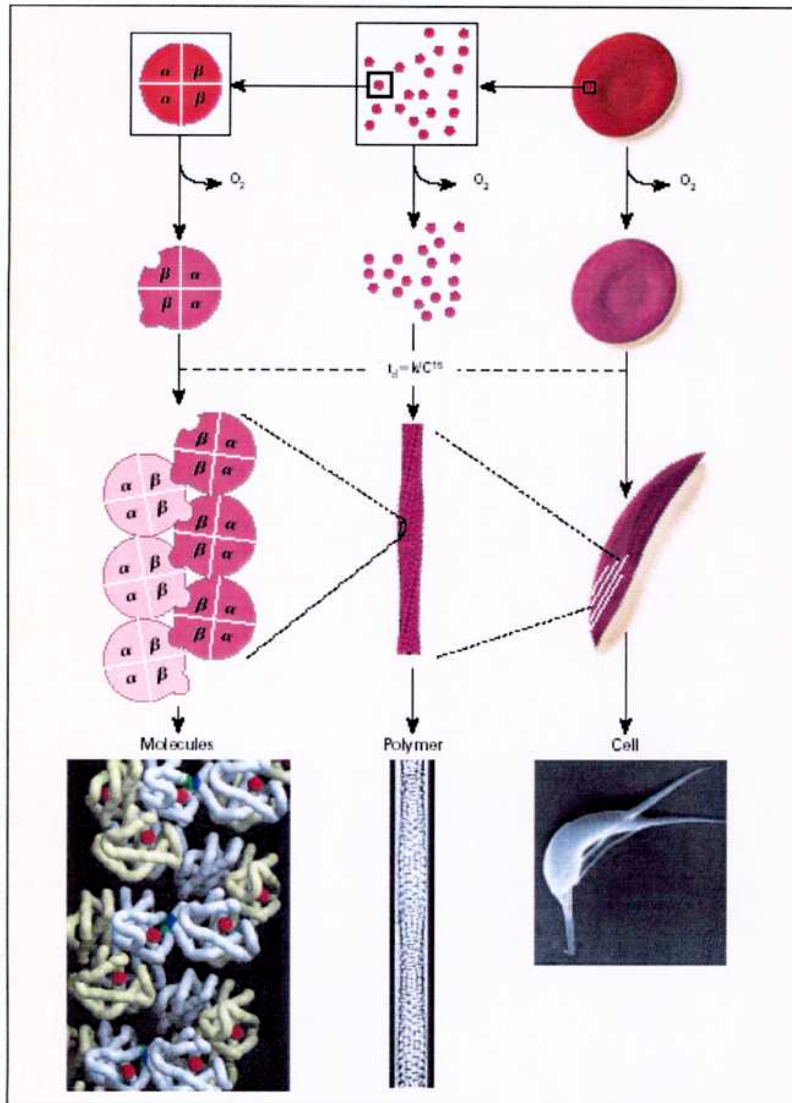


Figura 6. A medida que el GR atraviesa la microcirculación, se libera el oxígeno de la oxihemoglobina (rojo) generando desoxihemoglobina (rosa). El diagrama de la izquierda muestra moléculas de Hb S con su estructura tetramérica. La desoxigenación induce un cambio de conformación donde las subunidades beta se alejan entre sí. El patrón hidrofóbico en el sitio del reemplazo Glu → Val se une al sitio complementario hidrofóbico de la otra cadena beta. Esta interacción es necesaria para la formación del polímero. Abajo se muestra un modelo de interacción de tres moléculas de Hb S desoxigenada de un lado y otro. Las subunidades alfa se muestran en verde y las subunidades beta en gris. El grupo hem se muestra en rojo. También se identifican los contactos entre una subunidad beta que involucra la mutación (azul) con el residuo hidrofóbico aceptor (verde oscuro). Solamente uno de los dos sitios Valina en cada Hb S hace contacto. A medida que la desoxihemoglobina S se polimeriza y las fibras se alinean, el GR se distorsiona adquiriendo la forma de hoz como se muestra en el diagrama de la derecha.

2.2.1.1 Presencia de Hb F

La evidencia bioquímica de que la Hb F es un potente inhibidor de la polimerización de la desoxihemoglobina S está basada en la observación de pacientes. Hace más de 50 años que Janet Watson se dio cuenta de que los niños con rasgo drepanocítico no daban positivo el sickling test a diferencia de sus madres que también eran portadoras del mismo. Además observó que los niños con drepanocitosis tenían muy pocos síntomas. Ella postuló que esta diferencia radicaba en los niveles de Hb F en los GR y que la Hb F interfiere con la polimerización de la Hb S. Gracias a la evidencia clínica y bioquímica de que la Hb F inhibe el cambio de forma del GR, se comenzó la terapéutica con drogas que aumenten la producción de Hb F como la 5 azacitidina, una droga antineoplásica que produce hipometilación del DNA ya que se comprobó que en tejido fetal los genes de gamma globina se encuentran hipometilados ⁶. Otra droga antineoplásica ampliamente usada en el tratamiento de la drepanocitosis es la hidroxiaurea que estimula la producción de Hb F. El mecanismo molecular de este aumento aún no está claro.⁷

2.2.1.2 Concentración de Hemoglobina

La tasa de polimerización de la Hb S depende de la concentración de la misma en el GR. El tiempo entre la desoxigenación de la Hb S y la formación del polímero es inversamente proporcional a la concentración intracelular de hemoglobina.⁸

2.2.2 Interacción GR con Hb S – Endotelio

Una característica importante de la drepanocitosis son los eventos de vaso-oclusión que producen episodios recurrentes de dolor. Décadas de investigación sobre la polimerización de la Hb S han culminado en la elucidación de la contribución del fenómeno de polimerización en la manifestación de la fisiopatología de la anemia de

las células falciformes. Sin embargo, es razonable suponer que la polimerización no es suficientemente responsable por sí sola de los episodios de vaso-oclusión. Existe actualmente un consenso que indica que los GR con Hb S tendrían una mayor tendencia a adherirse al endotelio vascular.⁵ Los fenómenos de vaso-oclusión pueden ocurrir cuando el tránsito a través de los capilares es mayor que el tiempo necesario para la polimerización de la Hb S. Como la adherencia al endotelio vascular impide el flujo de sangre y de esta manera aumentaría el tiempo en la microcirculación, se ha propuesto que el aumento de la adherencia celular puede iniciar y propagar los fenómenos de vaso-oclusión. Diversos factores o mediadores de inflamación, que pueden activar las células endoteliales y aumentar de este modo la adhesividad endotelial de los GR con Hb S, podrían iniciar la vaso-oclusión. Un ejemplo de ellos incluye a TNF- α , IFN γ , IL-1 β , factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), trombina, histamina, y los efectos de la hipoxia y la reperfusión.⁹

Estudios realizados en condiciones estáticas y dinámicas han demostrado que la superficie de los GR con Hb S son más pegajosas y se unen más fácilmente al endotelio vascular que los GR normales. Los reticulocitos de los pacientes con drepanocitosis tienen en su superficie una integrina compleja $\alpha_4\beta_1$ que se une a la fibronectina¹⁰ y a VCAM-1, una molécula de adhesión que se expresa en el endotelio vascular¹¹, particularmente después de la activación por citoquinas proinflamatorias como el TNF- α . Además, tanto el endotelio vascular como los reticulocitos con Hb S expresan CD36, que se une a la trombospondina que es secretada por las plaquetas activadas¹². La trombospondina también se uniría a los sulfoglicanos de estos GR¹³. Existen además otras proteínas plasmáticas como las moléculas del factor de von Willebrand que también contribuiría a la mayor adhesión celular.

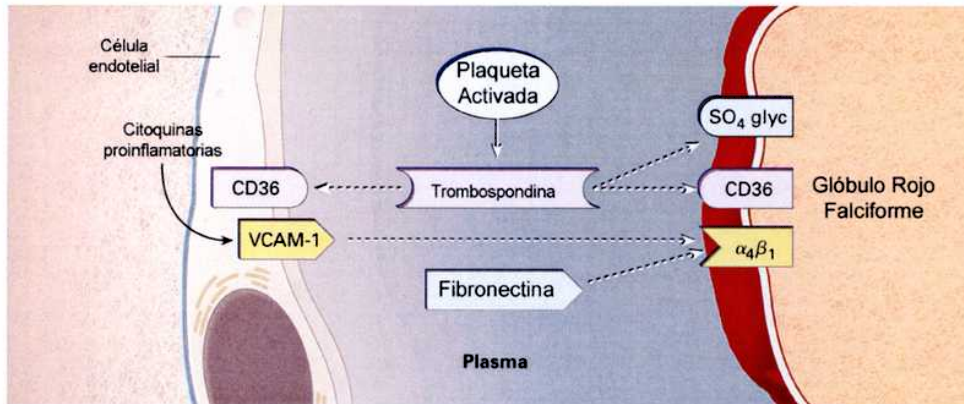


Figura 7. Principales interacciones responsables de la adhesión de GR con Hb S al endotelio de la microcirculación.

La activación de las plaquetas produce la liberación de trombospondina, que actúa como una molécula puente para unir a CD 36 presente en el endotelio vascular y CD 36 o sulfoglicanos en el GR. Las citoquinas proinflamatorias inducen la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 sobre el endotelio vascular. Esta molécula puede unirse directamente a la integrina $\alpha_4\beta_1$ en el GR con Hb S.

Sin embargo, todavía hay que probar el modelo de la adherencia del GR con Hb S *in vivo*. Uno de los mayores inconvenientes por resolver es la falta de un modelo animal de laboratorio apropiado para el estudio de la drepanocitosis. Es probable que con el desarrollo de ratones transgénicos knockout que expresen exclusivamente la Hb S humana y exhiban muchas características de la enfermedad, se podrá evaluar el rol de la adherencia en los fenómenos de vaso-oclusión ¹⁴.

2.3 Tratamiento y profilaxis

El tratamiento se dirige a la prevención de la crisis, evitando las infecciones, la deshidratación y la estasis circulatoria.

La principal causa de muerte es la infección por organismos encapsulados como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Esto se debe a la asplenia

funcional que se desarrolla en los primeros dos años en estos pacientes. El “Sickle Cell Disease Guideline Panel” recomienda el uso de la profilaxis con penicilina a los dos meses de edad en los niños drepanocíticos así como la vacunación antineumocócica cuando tienen 2 años de edad¹⁵.

Deben administrarse suplementos de ácido fólico. Los fármacos que aumentan la síntesis de Hb F, como la hidroxiurea, parecen tener un papel en el tratamiento de fondo de la drepanocitosis.

Otros tratamientos como la transfusión sanguínea, son requeridos según el curso clínico de la enfermedad.

3. Screening poblacional

Los principios del screening poblacional desarrollado en 1968 por Wilson y Jungner sentaron las bases para usar la genética en los estudios poblacionales¹⁶. Estos principios enfatizan la importancia o el impacto de una determinada patología en la salud pública, la disponibilidad de un test diagnóstico efectivo y la disponibilidad de un tratamiento para prevenir o mitigar la enfermedad.

Muchos países se han valido de estos principios para desarrollar políticas en lo que respecta a tests genéticos poblacionales.

En el caso de la anemia de células falciformes, es imperativo el diagnóstico precoz para comenzar la profilaxis con penicilina y el uso de antibióticos para prevenir infecciones.

En la población argentina no se ha organizado un estudio de frecuencias de hemoglobinopatías. La frecuencia de las hemoglobinopatías reflejan las características de la población de nuestro país, originada en diferentes corrientes inmigratorias. Su composición actual se vincula estrechamente con el aporte colonizador español y con la influencia de inmigraciones posteriores procedentes de países de la cuenca del

Mediterráneo, de Italia en primer término. Con el transcurrir del tiempo la integración de estos diferentes grupos étnicos y la mestización ha aportado a la heterogeneidad genética de la Argentina. También contribuye a esta variabilidad la manera desigual en que se encuentra distribuido en nuestro país el componente amerindio (47% en el noroeste rural a un 20% en los centros satélites más industrializados) manteniéndose aún desconocidos en algunas ciudades.^{17,18} Todas estas características hacen de la Argentina un país con una población particular. Estas peculiaridades se vieron reflejadas en diferentes estudios poblacionales realizados en nuestro país, especialmente en el caso de enfermedades genéticas como fibrosis quística e hiperplasia adrenal congénita^{19,20} como así también en el estudio de distribución de frecuencias alélicas del receptor CCR-5 y su asociación a la transmisión vertical de la infección con HIV²¹, donde la distribución de frecuencias de mutaciones muestra diferencias significativas con otras poblaciones caucásicas.

La Hb S constituye una de las hemoglobinas anormales de mayor prevalencia mundial, relacionándose su distribución con las áreas donde la malaria es o ha sido endémica. Por este motivo no parece posible extrapolar directamente las frecuencias encontradas para otras poblaciones a nuestra población y surge la necesidad de conocer su distribución en individuos argentinos.

En Argentina se cuentan con dos estudios sobre frecuencias de hemoglobiopatías realizados por el Servicio de Hematología del Hospital Gutierrez, en el que se analizaron los casos que concurrieron al servicio con una hemopatología de base²² y las personas que concurrieron a donar sangre y que habitaban en el gran Buenos Aires²³. Es por esto que consideramos de interés analizar la frecuencia poblacional de individuos de la población en general sin el sesgo dado por la enfermedad hematológica de base y en una población distinta al Gran Buenos Aires.

4. Distribución poblacional

Esta enfermedad está principalmente confinada a las personas de raza negra, especialmente descendientes africanos, pero también se encuentra en personas del mediterráneo, medio este y de la India. Esta mutación tenía una ventaja selectiva que era que aquellos portadores de la mutación tenían una menor probabilidad de padecer de malaria en las zonas endémicas como por ejemplo África.^{24,25} Las bases de la toxicidad de la Hb S para el parásito son desconocidas. Una posibilidad es que el Plasmodium produzca una extrema hipoxia en los glóbulos rojos de las personas con el rasgo drepanocítico. Estos glóbulos se deforman y son eliminados (con el parásito en su interior) por el sistema reticuloendotelial.^{26,27} Otro posible mecanismo es que se forman bajos niveles de hemicromos en los eritrocitos con rasgo drepanocítico. Los hemicromos son complejos que contienen el grupo hemo pero se han dissociado de la hemoglobina. Los hemicromos catalizan la formación de especies reactivas de oxígeno, como por ejemplo radical hidroxilo, que puede dañar o aún matar al parásito.²⁸

La hipótesis de la protección frente a la malaria proviene de la antigua observación de que las personas que no tenían el rasgo drepanocítico morían de malaria. Por otro lado, aquellos que tenían drepanocitosis fallecían a causa de la enfermedad hematológica. En contraste, los heterocigotas eran más resistentes a la malaria que los individuos normales y no sufrían los efectos de la enfermedad. Estudios epidemiológicos en regiones endémicas de malaria en África arrojaron una menor frecuencia de heterocigotas que acudían a tratamiento para la malaria que la frecuencia observada en la población general de África.²⁹

Según el último boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS-EB117/34 del 22 de Diciembre de 2005) la prevalencia del rasgo drepanocítico (heterocigotas) va

desde un 10-40% en Africa ecuatorial a un 1-2% en el norte de Africa y <1% en el sur de Africa. En el oeste de Africa como por ejemplo Nigeria, la prevalencia es del 15 al 30%.

En los Estados Unidos la prevalencia de la drepanocitosis es de 1 cada 500 afroamericanos y 1 cada 1000-1400 hispanoamericanos. Se calcula que 1 cada 12 afroamericanos es portador en Estados Unidos.

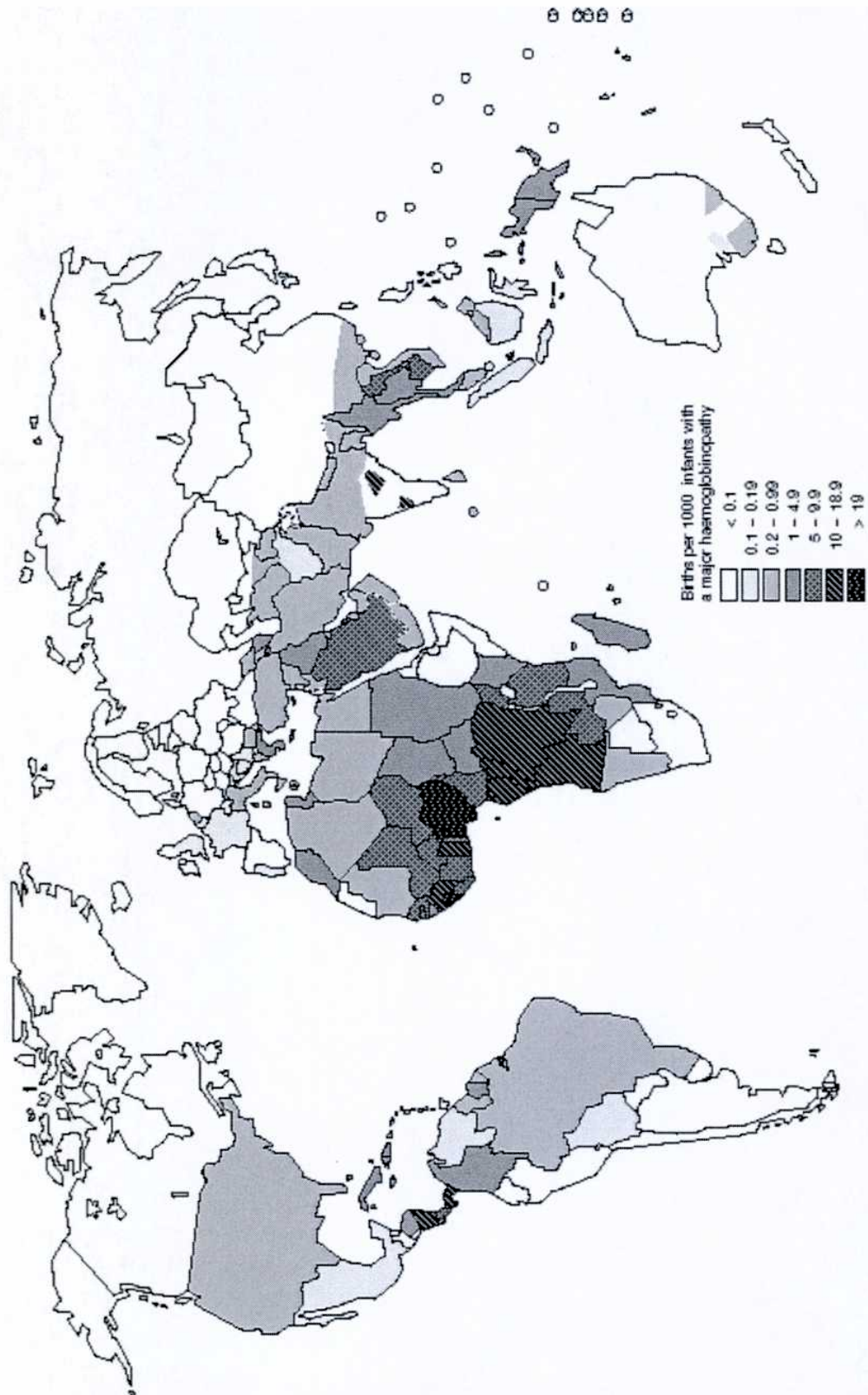


Figura 8. Distribución global de hemoglobinopatías (niños nacidos con la hemoglobinopatía cada 1000 nacimientos).

Objetivos

- Determinar mediante técnicas de Biología Molecular la frecuencia de portadores de la mutación del codón 6 del gen de la β globina (HBB) relacionado con drepanocitosis en la población de Mendoza, Argentina.

- Comparar la reproducibilidad de los resultados con dos variantes de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):
 - PCR aleloespecífica
 - PCR y análisis por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

Materiales y Métodos

Muestras

Se utilizaron 1000 muestras de ADN agrupadas en 100 pooles, cada uno de los cuales se obtuvo de 10 muestras de sangre entera periférica. Las muestras fueron obtenidas a partir de 1000 individuos que concurrieron a tres centros del Gran Mendoza, ubicados en distintas zonas de la misma para asegurarse de obtener una muestra heterogénea. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las personas que participaron en este screening. Estos pooles habían sido utilizados previamente para determinar la frecuencia de portadores de la mutación DF508 en el gen CFTR asociado con Fibrosis Quística.³⁰

Para comprobar la sensibilidad de las distintas técnicas que deberían ser capaces de detectar la presencia de un alelo mutado entre 19 alelos normales, se generaron dos pooles controles, uno negativo formado por 10 individuos que no poseían la mutación en el codón 6 del gen HBB y un pool positivo, formado por 9 individuos normales y un individuo portador de la mutación (La sangre del paciente portador de la mutación fue gentilmente cedido por la Dra. Maldonado del Servicio de Hematología del Hospital Central de la Ciudad de Mendoza)

Preparación del ADN

Se obtuvo ADN genómico a partir de 3 ml de sangre total extraída con EDTA como anticoagulante mediante la técnica de extracción salina.³¹ Brevemente, a 3 ml de sangre se le agregó 3 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl and 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2). Los lisados celulares fueron digeridos toda la noche a 37°C con 0.2 ml of 10% SDS and 0.5 ml de una solución de proteinasa K (1 mg protease K en 1% SDS y 2 mM Na₂EDTA). Luego de la digestión se agregó 1 ml de una solución saturada de cloruro de sodio (aproximadamente 6M) y se agitó vigorosamente por 15 segundos seguido de una

centrifugación a 2500rpm por 15 minutos. Se le agregó 2 volúmenes de alcohol absoluto a temperatura ambiente al sobrenadante y se invirtió el tubo hasta observar el DNA precipitado el cual fue removido y colocado en un tubo de 1.5 ml con 300 µl de agua miliQ.

PCR aleloespecífica

El ADN resuspendido en agua fue amplificado mediante los siguientes cebadores: para el extremo F 5' accatggtgcacctgactcctct 3' y para el extremo R 5' cctctgggtccaagggtagacc 3' y como control interno de amplificación se utilizaron los siguientes cebadores: para el extremo 5' F 5' cctctgcgggtccaagcctc 3' y para el extremo 3' R 5' gtcgatgaggagaaggccac 3' que amplifican una región del gen *ret* en el cromosoma 10. El programa de amplificación comenzó con 3 minutos de incubación a 95°C, se prosiguió con 29 ciclos de 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 62°C y 3 minutos a 72°C y se finalizó con una incubación final de 3 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación se corrieron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 12% con una diferencia de potencial de 120V durante 120 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 10 minutos y observados bajo luz ultravioleta. En todos los ensayos se incluyeron un pool positivo y otro negativo como controles.

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

El ADN resuspendido en agua fue amplificado mediante los siguientes cebadores: para el extremo 5' F5' ggttgccatctactcccaggagc 3' y para el extremo 3' R 5' cctctgggtccaagggtagacc 3'. El programa de amplificación comenzó con 3 minutos de incubación a 95°C, se prosiguió con

29 ciclos de 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 64°C y 3 minutos a 72°C y se finalizó con una incubación final de 3 minutos a 72°C.

Para la digestión enzimática, una alícuota de 5 µl del producto de amplificación se incubó con 14 µl de agua miliQ, 5µl de buffer 10X correspondiente a la enzima y 0.5µl de enzima de restricción Bsu 361 (10 U/µl, Promega) bajo una gota de aceite mineral a 37°C por 2 horas. Como control se realizó la misma incubación reemplazando la enzima por 0.5 µl de agua miliQ.

Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 12% con una diferencia de potencial de 120V durante 120 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 10 minutos y observados bajo luz ultravioleta. En todos los ensayos se incluyeron un pool positivo y otro negativo como controles.

Análisis estadístico

El análisis estadístico es simple, y para el mismo se utilizó el programa desarrollado por John C. Pezzullo Kissimmee, Florida, para análisis de una distribución binomial, disponible en <http://members.aol.com/johnp71/confint.html>, USA)³²

Resultados

PCR aleloespecífica

Este método se basa en la eficiencia de amplificación de un cebador complementario al templado con respecto a uno que presenta falta de complementariedad o mismatch.

Es una variante de la técnica de PCR donde se utilizan oligonucleótidos (primers o cebadores) específicos a la región de interés. Con esta técnica se pretende realizar una amplificación diferencial del alelo mutado dentro de una amplia proporción de alelos que difieren en una única base. Debido a la naturaleza molecular de la drepanocitosis (A → T) el extremo 3' del cebador aleloespecífico (5' o forward), correspondiente al nucleótido del medio del codón 6 del gen HBB, estaría inevitablemente involucrado en una complementariedad de bases T:N tanto en el alelo normal como en el alelo mutado. Por lo tanto, se tuvo en cuenta en la estrategia, la utilización de un cebador 5' con un cambio puntual en la penúltima base del extremo 3'. Este cambio se introdujo deliberadamente para desestabilizar el cebador y así aumentar la especificidad del mismo. Se seleccionaron los siguientes cebadores: F 5' accatggtgcacctgactcctct 3' y R 5' cctctgggtccaaggtagacc 3' ³³. Para tener la certeza de que la ausencia de la banda correspondiente al alelo mutado no se debía a una falla en la reacción de PCR, se utilizaron un par de cebadores (correspondientes al exón 11 del RET protooncogen) como control interno de amplificación.

Secuencia del exón 1 cercano al codon 6 del gen HBB

Normal: 5' ACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA 3'
Drepanicitosis: 5' ACCATGGTGCACCTGACTCCTGTGGA 3'
Cebador aleloespecífico: F 5' ACCATGGTGCACCTGACTCCTCT 3'

Resultados

Con esta herramienta se esperaba ver una banda de amplificación de 256 pares de bases correspondiente al producto de amplificación que incluye al codón 6 donde se encuentra la mutación en la anemia falciforme y otra banda de 230 pb correspondientes al exón 11 del RET protooncogén (control de amplificación interno) en aquellos pools donde se encontrara al menos un portador de la mutación. Mientras que en los pools sin portadores o homocigotas sanos se esperaba ver solamente la banda correspondiente al control de amplificación (230 pb).

Para comprobar la sensibilidad del método se incluyó un pool positivo (9 muestras de sangre de individuos no portadores de la mutación mezclada con sangre de un individuo heterocigota que porta la mutación para HbS) y un pool negativo (10 muestras de sangre de individuos no portadores de la mutación) en cada reacción de PCR.

El análisis de los 100 pools de DNA reveló la ausencia de la mutación A>T en los 100 pools correspondientes a 1000 ADNs de individuos de la Ciudad de Mendoza.

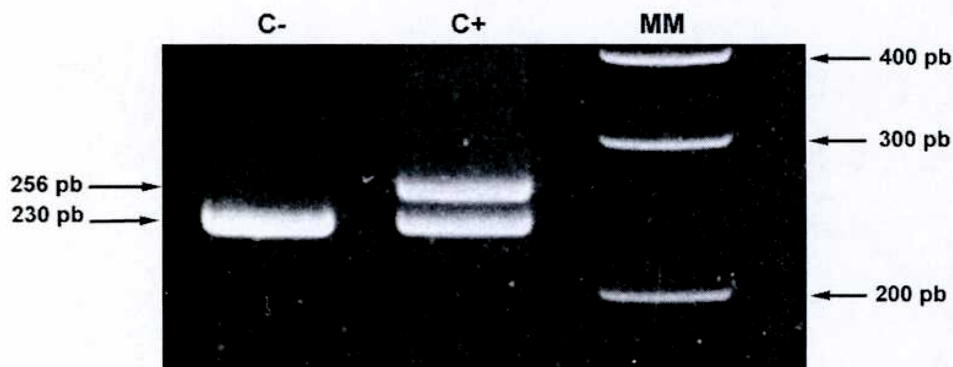


Foto representativa de la puesta a punto de la PCR aleloespecífica. Se observa la diferencia en el patrón de corrida de los controles (pool control positivo y pool control negativo)
C-: Control negativo; C+: Control positivo; MM: Marcador de Peso Molecular

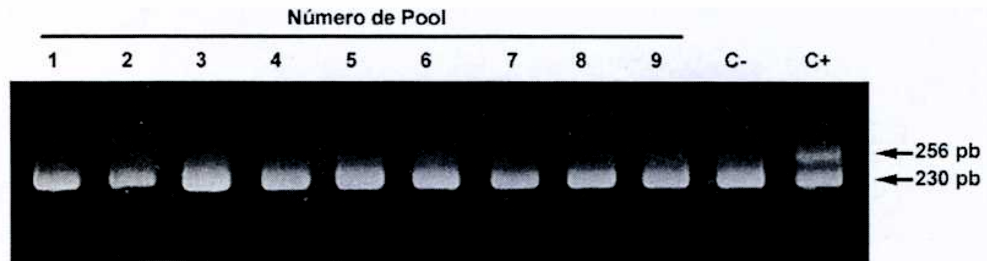


Foto representativa de un gel diagnóstico. Se observa el patrón de bandas obtenido de 9 pools diagnósticos. En todos los ensayos se incluyeron un pool positivo y otro negativo como controles.

Conclusión metodológica

Esta variante de la técnica de PCR provee un método rápido, sencillo y económico para ser usado como screening de mutaciones sin necesidad de digestiones posteriores y con una sensibilidad de detección de un heterocigota en un pool de 9 homocigotas normales.

PCR - RFLP (restriction fragment length polymorphisms)

Para confirmar los datos obtenidos con la PCR aleloespecífica se decidió abordar otra estrategia ya que la técnica de PCR alelo específica puede dar falsos negativos si por alguna razón no amplifica la muestra o falsos positivos, si no se eligen las condiciones adecuadas que permitan que el cebador aleloespecífico pueda amplificar sólo el alelo mutado.

Se eligió amplificar el fragmento en cuestión y luego proceder a la digestión con una endonucleasa de restricción y su posterior análisis por RFLP. En esta variante ambos alelos amplifican y se los distingue por diferencias en el patrón de corte de la enzima de restricción, que reconoce secuencias de DNA específicas y posee una excelente capacidad para distinguir cambios en una única base.

La estrategia diseñada consistió en amplificar una región de 385 pares de bases (pb) que incluye el sitio de la mutación y luego proceder al corte con la enzima de restricción Bsu 361.³⁴ La presencia de la mutación anula el sitio de corte para la enzima [CCTGAGG]. Para el extremo 3' se buscó un cebador que permita abarcar en el producto de amplificación, un sitio de corte constitutivo de la enzima para que sirva como control interno de la actividad de la enzima de restricción.

Secuencia del exón 1 cercano al codon 6 del gen HBB

Normal: 5' ACCATGGTGCACCTGACTCCTG**A**GGA
Drepanicitosis: 5' ACCATGGTGCACCTGACTCCTG**T**GGA

Productos de PCR incubados con Bsu361

Producto normal (385bp)



Producto con la mutación en el codón 6



Esquema de la estrategia utilizada y de los sitios de corte de la enzima de restricción Bsu361.

Resultados

Para comprobar la sensibilidad del método se incluyó un pool positivo y un pool negativo en cada reacción de PCR que luego también fueron digeridos con la enzima de restricción. De esta manera se corroboró el patrón de bandas en la corrida electroforética correspondiente a la presencia de una muestra positiva dentro de un pool.

El análisis de los 100 pools mediante PCR-RFLP confirmó la ausencia de la mutación A>T en la muestra poblacional.

Foto representativa de la puesta a punto de la técnica PCR-RFLP. La figura muestra la foto de un gel de acrilamida al 12% teñida con bromuro de etidio. Se observa el patrón de bandas de corte del pool control positivo, pool control negativo y 2 pools diagnósticos.

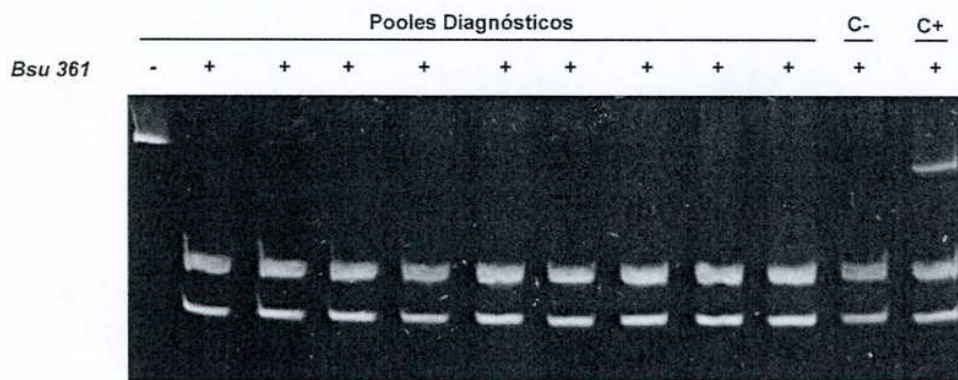


Foto representativa de un gel diagnóstico. Se observa el patrón de bandas obtenido de 9 pools diagnósticos. En todos los ensayos se incluyeron un pool positivo y otro negativo como controles.

Conclusión metodológica

Aunque requiere un paso de digestión enzimática posterior a la amplificación (a diferencia de la PCR aleloespecífica), la estrategia utilizada PCR-RFLP es un método de bajo costo, de alta sensibilidad y especificidad y con baja probabilidad de falsos positivos y falsos negativos.

Estimación de la prevalencia de portadores en la población muestreada

No se detectaron muestras con la mutación A→ T con ninguna de las dos técnicas empleadas sobre un total de 100 pools de sangre. Esto implica que ninguno de los 2000 cromosomas analizados tenía la variante S de la hemoglobina A. La frecuencia estimada de este alelo en la población de Mendoza es por lo tanto cero, con un límite de confianza del 95% de que el valor poblacional no sea superior al 0.15% (calculado mediante el programa desarrollado por John C. Pezzullo Kissimmee, Florida, disponible en <http://members.aol.com/johnp71/confint.html>, USA) ³²

Discusión

Las estrategias desarrolladas para detectar y estimar la frecuencia de portadores de la Hemoglobina S han sido eficaces. Si bien han sido usados varios protocolos para el análisis de la mutación de la HbS,³⁵⁻⁴² el análisis por el patrón de restricción del producto de PCR (PCR – RFLP) y la PCR aleloespecífica son procedimientos simples para el análisis de esta patología y muy sensibles para permitir la detección de un portador de la mutación en un pool de 10 individuos homocigotas sanos. El haber tomado pooles de a 10 aceleró el trabajo sin disminuir la sensibilidad de los ensayos ni la confianza estadística de los resultados. La realización de pooles es una herramienta genética muy eficiente que permite el análisis concomitante de varias personas a la vez con la gran ventaja de que una vez que el DNA está extraído, el costo de reactivos y el trabajo del operador es relativamente bajo.

Este tipo de estudio poblacional ha sido realizado en otros países principalmente en aquellos en los cuales se observan serios problemas clínicos producidos por la presencia de la Hb S. La práctica del screening neonatal de drepanocitosis en poblaciones prevalentes está sustentada por numerosos trabajos⁴³⁻⁴⁵ y tiene como objetivo la detección precoz de la enfermedad para comenzar con las medidas profilácticas como por ejemplo, el aporte de penicilina, la información sobre el manejo adecuado del niño y la vacunación antineumocócica a partir de los 2 años entre otras medidas, y así modificar las complicaciones infecciosas y vasooclusivas que pueden ser mortales.⁴⁶

El screening universal (independiente del fenotipo) es utilizado para estudios de prevalencia en muchos países con importante inmigración africana y elevado mestizaje. Diversos autores han estudiado el costo-beneficio del screening neonatal de la anemia falciforme, concluyendo que si la frecuencia es menor de 16 portadores y

0.5 enfermos cada 1000 nacimientos, el screening neonatal no está justificado en lo que respecta a costo-beneficio.⁴⁷⁻⁴⁹ Con el siguiente trabajo hemos demostrado que el uso de pools de DNA puede ser una opción válida para la realización del screening en lugares donde la frecuencia de la enfermedad es relativamente baja pero con la sensibilidad requerida para la detección de la mutación.

La Argentina es un país con características propias conferidas por el aporte inmigratorio internacional y la posterior mestización con individuos nativos, es por ésto que creímos importante la realización de este estudio poblacional. En nuestro país sólo se ha reportado un estudio de 4000 dadores de sangre con residencia en el Gran Buenos Aires donde la frecuencia alélica de la mutación A>T fue del 0.11%.²³ En este mismo estudio, el screening se llevó a cabo por electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa donde se reportaron 9 portadores en 3980 individuos (20 individuos tuvieron que ser excluidos del screening). El resultado obtenido en nuestro estudio arrojó una frecuencia estimada de este alelo en la población de Mendoza de cero, con un límite de confianza del 95% de que el valor poblacional no es superior al 0.15%. Este resultado no presenta diferencia significativa con el estudio poblacional mencionado anteriormente.

Como se desprende de los resultados obtenidos en el presente trabajo, esta mutación tiene una frecuencia muy baja pero que hasta el momento no había sido reportada en otra población distinta a la del Gran Buenos Aires.

Bibliografía

1. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS: Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000, 151:839-845
2. Pauling L, Itano HA, et al.: Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 1949, 110:543-548
3. Bunn HF: Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997, 337:762-769
4. Mozzarelli A, Hofrichter J, Eaton WA: Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. *Science* 1987, 237:500-506
5. Hebbel RP: Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 1991, 77:214-237
6. Ley TJ, DeSimone J, Noguchi CT, Turner PH, Schechter AN, Heller P, Nienhuis AW: 5-Azacytidine increases gamma-globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. *Blood* 1983, 62:370-380
7. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG: Hydroxyurea increases fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1984, 97:268-274
8. Rosa RM, Bierer BE, Thomas R, Stoff JS, Kruskall M, Robinson S, Bunn HF, Epstein FH: A study of induced hyponatremia in the prevention and treatment of sickle-cell crisis. *N Engl J Med* 1980, 303:1138-1143
9. Rosse WF, Narla M, Petz LD, Steinberg MH: New Views of Sickle Cell Disease Pathophysiology and Treatment. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000:2-17
10. Kumar A, Eckman JR, Swerlick RA, Wick TM: Phorbol ester stimulation increases sickle erythrocyte adherence to endothelium: a novel pathway involving alpha 4 beta 1 integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. *Blood* 1996, 88:4348-4358
11. Gee BE, Platt OS: Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1. *Blood* 1995, 85:268-274
12. Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA, Howard RJ, Wick TM: Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood* 1993, 81:2137-2143
13. Hillery CA, Du MC, Montgomery RR, Scott JP: Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood* 1996, 87:4879-4886
14. Paszty C, Brion CM, Mancini E, Witkowska HE, Stevens ME, Mohandas N, Rubin EM: Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science* 1997, 278:876-878
15. Selekmán J: Update: new guidelines for the treatment of infants with sickle cell disease. *Agency for Health Care Policy and Research. Pediatr Nurs* 1993, 19:600-605
16. Wald NJ: The definition of screening. *J Med Screen* 2001, 8:1
17. Macció GA ED: La población no Nativa de la Argentina. Buenos Aires, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 1996
18. Palatnik M: [Argentinian seroanthropology]. *Sangre (Barc)* 1966, 11:395-412
19. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A: Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with

- classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997, 10:55-61
20. Visich A, Zielenski J, Castanos C, Diez G, Grenoville M, Segal E, Barreiro C, Tsui LC, Chertkoff L: Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 2002, 61:207-213
 21. Mangano A, Kopka J, Batalla M, Bologna R, Sen L: Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-delta32 and SDF1-3'A in pediatric HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000, 23:52-57
 22. Abreu MS, Penalver JA: [S hemoglobinopathies in Argentina]. *Medicina (B Aires)* 1992, 52:341-346
 23. Abreu de Miani MS, Penalver JA: [Incidence of beta-thalassemia carriers and those deficient in erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase in the greater Buenos Aires area]. *Sangre (Barc)* 1983, 28:537-541
 24. Gendrel D, Kombila M, Nardou M, Gendrel C, Djouba F, Richard-Lenoble D: Protection against *Plasmodium falciparum* infection in children with hemoglobin S. *Pediatr Infect Dis J* 1991, 10:620-621
 25. Carlson J, Nash GB, Gabutti V, al-Yaman F, Wahlgren M: Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* 1994, 84:3909-3914
 26. Roth EF, Jr., Friedman M, Ueda Y, Tellez I, Trager W, Nagel RL: Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 1978, 202:650-652
 27. Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P: Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against *falciparum* malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* 2004, 104:3364-3371
 28. Anastasi J: Hemoglobin S-mediated membrane oxidant injury: protection from malaria and pathology in sickle cell disease. *Med Hypotheses* 1984, 14:311-320
 29. Willcox M, Bjorkman A, Brohult J, Pehrson PO, Rombo L, Bengtsson E: A case-control study in northern Liberia of *Plasmodium falciparum* malaria in haemoglobin S and beta-thalassaemia traits. *Ann Trop Med Parasitol* 1983, 77:239-246
 30. Roque M, Pott Godoy C, Castellanos M, Pusiol E, Mayorga LS: Population screening of F508del (DeltaF508), the most frequent mutation in the CFTR gene associated with cystic fibrosis in Argentina. *Hum Mutat* 2001, 18:167
 31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16:1215
 32. Clopper C, and ES Pearson: "The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial." *Biometrika* 1934, 26:404-413
 33. Birikh KR, Plutalov OV, Schwartz EI, Devi PS, Berlin YA: A modified approach to identification of the sickle cell anemia mutation by means of allele-specific polymerase chain reaction. *Hum Mutat* 1992, 1:417-419
 34. Husain SM, Kalavathi P, Anandaraj MP: Analysis of sickle cell gene using polymerase chain reaction & restriction enzyme Bsu 361. *Indian J Med Res* 1995, 101:273-276
 35. Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB: Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80:278-282

36. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230:1350-1354
37. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986, 324:163-166
38. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH, Jr., Erlich HA: Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988, 319:537-541
39. Chehab FF, Doherty M, Cai SP, Kan YW, Cooper S, Rubin EM: Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias. *Nature* 1987, 329:293-294
40. Chehab FF, Kan YW: Detection of sickle cell anaemia mutation by colour DNA amplification. *Lancet* 1990, 335:15-17
41. Postnikov Yu V, Molchanova TP, Huisman TH: Allele-specific amplification for the identification of several hemoglobin variants. *Hemoglobin* 1993, 17:439-452
42. Alter BP: Advances in the prenatal diagnosis of hematologic diseases. *Blood* 1984, 64:329-340
43. Lee A, Thomas P, Cupidore L, Serjeant B, Serjeant G: Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study. *Bmj* 1995, 311:1600-1602
44. Gray A, Anionwu EN, Davies SC, Brozovic M: Patterns of mortality in sickle cell disease in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1991, 44:459-463
45. Samuels-Reid JH: Common problems in sickle cell disease. *Am Fam Physician* 1994, 49:1477-1480, 1483-1476
46. Wang W, Day S, Turner E, Bhakta M, Erickson S: Medical management and prevention guidelines for children with sickle cell disease. *J Tenn Med Assoc* 1992, 85:209-214
47. Lane PA, Eckman JR: Cost-effectiveness of neonatal screening for sickle cell disease. *J Pediatr* 1992, 120:162-163
48. Sprinkle RH, Hynes DM, Konrad TR: Is universal neonatal hemoglobinopathy screening cost-effective? *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994, 148:461-469
49. Tsevat J, Wong JB, Pauker SG, Steinberg MH: Neonatal screening for sickle cell disease: a cost-effectiveness analysis. *J Pediatr* 1991, 118:546-554