

---

# SIGNIFICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DEL GEN BETA GLOBINA EN EL ORIGEN DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS EN VENEZUELA

MARTHA BRAVO-URQUIOLA, MARÍA GONZÁLEZ, SILVIA MONTILLA, MARYCARMEN CHACÍN, DALIA VELÁSQUEZ, GLORIA GARCÍA y ANABEL ARENDS

---

## RESUMEN

El presente estudio tiene por finalidad corroborar el origen de las variantes de hemoglobinas S, C y la beta talasemia en un grupo de pacientes venezolanos a través del estudio de los haplotipos del gen beta globina. A 60 pacientes no relacionados con Hb C y a 66 pacientes con beta talasemia se les determinó las variantes de hemoglobinas mediante la técnica de cromatografía líquida de alta precisión de intercambio catiónico (HPLC-CE). El ADN fue extraído por el método de salting out. El diagnóstico de las mutaciones beta talasémicas fue realizado por reverse dot blot y la determinación del haplotipo del gen beta globina por la técnica de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). El haplotipo del gen beta

globina asociado a la Hb C fue el  $\beta^{CI}$  (-+--+ ) en 65%, seguido del  $\beta^{CII}$  (----+) en 5% y el  $\beta^{CIII}$  (-----) en 3,3%. Se observó un 26,6% de haplotipos atípicos. En pacientes con beta talasemia la mutación CD 39 (C→T) estuvo asociada a los haplotipos I y II, las mutaciones IVSI-110 (G→A), Del 1,39kb y -86 (C→G) al haplotipo I, la mutación IVSI-5 (G→A) y la IVSII-745 (C→G) al haplotipo VII, la IVSI-1 (G→A) al haplotipo V, la IVSII-1 (G→A) al III y la IVSI-6 (T→C) al VI, coincidiendo estos resultados con los de la literatura. En pacientes con Hb SC, el haplotipo  $\beta^S$  CAR fue el más frecuente, seguido del haplotipo Benin y Camerún. Los resultados sugieren que el origen de las hemoglobinopatías en Venezuela es mediterráneo y africano.

Las hemoglobinopatías conocidas como variantes de hemoglobinas, la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH) y las talasemias son enfermedades de carácter au-

tosómico recesivo, producidas por alteraciones en los bloques de genes globinas. (Weatherall y Clegg, 2001). Las más frecuentes a nivel mundial son las variantes de hemoglobinas S, C y D, la alfa talasemia y la beta talase-

mia (Weatherall y Clegg, 2001). Estas son causadas por mutaciones en los genes globinas, las cuales pueden producir un efecto variable en el fenotipo. Además, de las mutaciones que producen las hemoglobinopatías, dentro del

---

**PALABRAS CLAVE /  $\beta$ -Talasemia / Haplotipos del Gen Beta Globina / Origen de las Hemoglobinopatías / Variantes de Hemoglobinas /**

---

Recibido: 28/05/2012. Modificado: 30/07/2012. Aceptado: 31/07/2012.

**Martha Bravo-Urquiola.** Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Venezuela Profesora, Instituto Anatómico "José Izquierdo" (IAJI), Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigadora, Servicio de Hematología "Dr. Tulio Arends" (SHTA) Hospital Universitario de Caracas (HUC), UCV, Venezuela. Dirección: Calle Ciudad Universitaria Los Chaguaramos, Caracas. e-mail: marthabravo@hotmail.com

**María González García.** Licenciada en Biología. Docente, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Venezuela.

**Silvia Montilla.** Licenciada en Biología y estudiante de Postgrado, UCV, Venezuela. Tesista, SHTA e IAJI, UCV, Venezuela.

**Marycarmen Chacín.** Licenciada en Biología, Universidad de Oriente, Venezuela. Estudiante de Postgrado, UCV, Venezuela. Profesional Asociado a la Investigación, SHTA e IAJI, UCV, Venezuela.

**Dalia Velásquez de L.** Especialista en Hematología, UCV, Venezuela. Médico Jefe, SHTA, HUC, UCV, Venezuela

**Gloria García.** Licenciada en Bioanálisis, UCV, Venezuela. Bioanalista, SHTA, HUC, UCV, Venezuela.

**Anabel Arends.** Doctora en Hematología. Profesora, IAJI-UCV, Venezuela. Coordinadora, Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, SHTA, HUC, Venezuela.

---

bloque de genes  $\beta$  globina se han descrito al menos 18 mutaciones puntuales que producen un efecto silencioso, es decir, no producen alteraciones en la molécula de hemoglobina. Estas mutaciones son conocidas como polimorfismos neutrales y en su conjunto forman lo que se denomina el haplotipo del gen  $\beta$  globina, el cual ha sido definido como un patrón de secuencias polimórficas estudiadas por medio de enzimas de restricción. La combinación o patrón no aleatorio de estos sitios de restricción polimórficos en un cromosoma es lo que define el haplotipo de un gen. Estos fueron descritos por primera vez por Orkin *et al.*, (1982). Los haplotipos comúnmente estudiados en pacientes con hemoglobinopatías consisten de ocho sitios polimórficos, los cuales han sido definidos con el nombre de las enzimas de restricción que los reconocen y cada haplotipo es definido por la presencia (+) o ausencia (-) del corte de cada uno de estos sitios de restricción polimórficos. Los polimorfismos localizados en el extremo 5' del gen son nombrados de acuerdo a la enzima de restricción que los reconoce y la región del gen donde se encuentran localizados, como: *HincII/ε-gen*, *XmnI5'Gγ-gen*, *HindIII/Gγ-gen*, *HindIII/Aγ-gen*, *HincII/βψ-gen 5'*, *HincII/βψ-gen 3'*, y los del extremo 3' del bloque de genes  $\beta$  globina como *AvaII/β-gen* y *Hinf/3'gen-β* (Antonarakis *et al.*, 1982; Orkin *et al.*, 1982). El estudio del haplotipo del gen  $\beta$  globina es de interés desde el punto de vista antropológico porque se usa para definir el flujo de genes en las poblaciones (Antonarakis *et al.*, 1985; Powars *et al.*, 1990; Nagel *et al.*, 1996).

Los haplotipos del gen  $\beta$  globina asociados a la variante de hemoglobina S ( $\beta^S$ ) han sido denominados de acuerdo al área geográfica de África donde predominan y son utilizados como marcadores genéticos de origen africano en los estudios poblacionales (Pagnier *et al.*, 1984). Ellos han sido clasificados en cinco tipos diferentes: el tipo Benin (Ben), el cual ha sido asociado su origen con el medio oeste de África, el Bantú o República Central de África (CAR) asociado con el este y centro de África, el Senegal (Sen) con la costa del oeste Atlántico de África (Pagnier *et al.*, 1984), el Camerún (Cam) a lo largo de la costa oeste del África (Lapoumeroulic *et al.*, 1992) y el tipo Arab Indio que abarca el subcontinente Indio y la península de Arabia (Kulozik *et al.*, 1986).

La variante de hemoglobina C se ha observado asociada a 3

haplotipos específicos denominados como haplotipos CI, CII y CIII, determinando estos el origen africano de esta variante (Boehm *et al.*, 1985). Por otro lado, los haplotipos asociados a las mutaciones beta talasémicas han sido nombrados según la clasificación de Orkin *et al.* (1982). A través del estudio de estos haplotipos se ha podido determinar que las mutaciones beta talasémicas son regionalmente específicas debido a que algunas de ellas muestran asociaciones casi exclusivas a uno o dos haplotipos específicos. La asociación de algunas mutaciones con haplotipos únicos y diferentes a los reportados como frecuentes en algunas poblaciones, permite demostrar que estas mutaciones tienen un origen independiente en diversas poblaciones (Old, 1993).

En tal sentido, si las hemoglobinopatías fueron introducidas en Venezuela durante el proceso de colonización y las posteriores migraciones, atribuyéndose a estas un origen mediterráneo y africano, entonces el estudio del haplotipo del gen  $\beta$  globina permitirá corroborar este origen. Por tal motivo, la presente investigación tiene como objetivo corroborar el origen de las variantes de hemoglobinas S, C y la beta talasemia en un grupo de pacientes venezolanos.

## Materiales y Métodos

La muestra poblacional consistió de 60 pacientes no relacionados con diagnóstico de Hb C, de los cuales 27 pacientes fueron portadores de Hb AC, 30 pacientes fueron dobles heterocigotos con Hb SC y tres pacientes fueron doble heterocigotos con Hb CA<sub>2</sub>. Así mismas se estudiaron 66 pacientes no relacionados con diagnóstico de beta talasemia, de los cuales 62 fueron portadores y cuatro fueron homocigotos. Ambos grupos de pacientes fueron referidos al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Hospital Universitario de Caracas e Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela. A cada paciente, previa autorización, se le extrajo 10ml de sangre periférica en un tubo con EDTA como anticoagulante. La determinación de las variantes de hemoglobinas fue realizada mediante la técnica de cromatografía líquida de alta precisión de intercambio catiónico (HPLC-CE) de acuerdo a los procedimientos descritos por Tan *et al.* (1993). El ADN fue extraído utilizando el método de *salting out* (Muller *et al.*, 1988). El diagnóstico de las mutaciones

beta talasémicas presente fue realizado por *reverse dot blot* (Maggio *et al.*, 1993). El haplotipo del gen  $\beta$  globina fue determinado utilizando la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP; Sutton *et al.*, 1989). Cada haplotipo es definido por la presencia (+) o ausencia (-) del corte de cada uno de estos sitios de restricción polimórficos estudiados. Siete sitios de restricción fueron analizados utilizando las siguientes enzimas de restricción: *HincII (5'ε-gene)*, *HindIII (Gγ-gene)*, *HindIII (Aγ-gene)*, *HincII (5'ψβ-gene)*, *HincII (3'ψβ-gene)*, tanto para los pacientes con Hb AC, Hb SC y beta talasemia. Adicionalmente, para los pacientes con mutaciones beta talasémicas se estudiaron los sitios polimórficos *AvaII (β-gene)* y el *HinfI (3'β-gene)*. La asignación de los haplotipos y su asociación a la variante de Hb C fue realizada por estudio familiar y siguiendo la clasificación propuesta por Bohem *et al.* (1985) y Talacki *et al.* (1990); en pacientes con beta talasemia los haplotipos del gen  $\beta$  globina fueron asignados según la clasificación propuesta por Orkin *et al.* (1982) y Old (1993), y en paciente con Hb S los haplotipos fueron clasificados siguiendo la clasificación propuesta por Pagnier *et al.* (1984) y Nagel *et al.* (1985).

## Resultados

Los polimorfismos dentro del bloque de genes  $\beta$  globina en pacientes con beta talasemia fueron estudiados en 70 alelos pertenecientes a 66 pacientes no relacionados. Los haplotipos asociados a las mutaciones beta talasémicas fueron asignados según la clasificación de Orkin *et al.* (1982) y Old (1993). Los haplotipos fueron asignados por estudio familiar y se observó que cada mutación beta talasémica se encuentra asociada a uno o dos haplotipos específicos en la mayoría de los casos (Tabla I). Los haplotipos asociados a las mutaciones de origen mediterráneo Cd39 (C→T), IVSI-1 (G→A), IVSI-5 (G→A), IVSI-6 (T→C), IVS1-110 (G→A), IVSII-1 (G→A), IVSII-745 (C→G) demostraron concordancia con este origen en un 68,6% en la población estudiada. De igual forma, los haplotipos asociados a las mutaciones de origen africano tales como 29 (A→G), -88 (C→T), la delección de 1.39 Kb, IVSII-1 (G→T), IVSII-849 (A→G) coinciden con el origen africano descrito para estas mutaciones en un 28,6% (Tabla I).

La variante de hemoglobina C (HbC) es producida por una

ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES BETA TALASÉMICAS CON EL HAPLOTIPO DEL GEN  $\beta$  GLOBINA

Mutaciones	Nº de alelos	HincII 5'- $\epsilon$	HindIII $\gamma$ G	HindIII $\gamma$ A	HincII $\psi\beta$	HincII 3'- $\psi\beta$	AvaII $\beta$	HinfI 3'- $\beta$	Clasificación
Cd39(C→T)	11	+	-	-	-	-	+	+	I
	8	-	+	+	-	+	+	+	II
IVSI-1 (G→)	7	+	-	-	-	-	+	-	V
IVSI-6(T→C)	5	-	+	+	-	-	-	+	VI
	2	+	-	-	-	+	-	+	
	1	-	+	-	-	+	-	+	
IVSI-110 (G→A)	7	+	-	-	-	-	+	+	I
IVSII- 849 (A→G)	2	-	-	+	-	+	-	+	
	1	-	+	+	-	+	-	+	
-88 (C→T)	5	-	-	-	-	+	+	+	
	1	+	-	-	-	+	+	+	
-29 (A→G)	3	-	-	-	+	+	+	+	
	1	-	+	-	+	+	+	+	IX
	1	-	-	-	-	-	+	+	
	1	-	-	-	-	+	+	+	
IVSI-5 (G→A)	3	+	-	-	-	-	-	+	VII
IVSII-1 (G→A)	3	-	+	-	+	+	+	-	III
1.393bp deleción	4	+	-	-	-	-	+	+	I
-86 (C→G)	2	+	-	-	-	-	+	+	I
IVSII-1 (G→T)	1	-	-	-	-	+	+	+	
IVSII- 745 (C→G)	1	+	-	-	-	-	-	+	VII
Total	70								

$\beta^{CIII}$ . Estos haplotipos en el gen  $\beta^C$  han sido descritos en los individuos originarios del oeste de África, noreste de Ghana, territorio Volta y el oeste de Nigeria. Por lo tanto, su presencia en la población local corrobora los hallazgos de los registros históricos acontecidos en Venezuela durante el proceso de colonización y el posterior mestizaje que ocurrió en este país. Igualmente, concuerda con la teoría de Boehm *et al.* (1985), quienes reportan que el gen  $\beta^C$  tiene un simple origen geográfico que surgió de un cromosoma  $\beta^A$  común en el oeste de África, debido a que se encuentra en una frecuencia <10% asociado al gen  $\beta^A$  y sugiere que los haplotipos menos comunes  $C^{II}$  y  $C^{III}$  surgieron como resultado de eventos de recombinación en el extremo 5' del gen  $\beta$  globina. Los haplotipos del gen  $\beta^C$  son idénticos en el extremo 3' del gen  $\beta$  globina pero diferentes en el extremo 5'.

mutación en el codón 6 de la cadena  $\beta$  globina, donde el ácido glutámico es sustituido por lisina ( $\alpha_2 \beta_2^{glu \rightarrow lis}$ ); después de las variantes de hemoglobinas S y la E, representa la tercera hemoglobinopatía más frecuente en el mundo y en Venezuela es la segunda en frecuencia. El haplotipo del gen  $\beta$  globina asociado a la variante de hemoglobina C fue estudiado en 60 pacientes, siendo el haplotipo  $\beta^{CI}$  el más frecuente, seguido del  $\beta^{CII}$  y del  $\beta^{CIII}$ . El haplotipo  $\beta^{CI}$  (-+--+ ) se observó en una frecuencia de 65%, seguido del haplotipo  $\beta^{CII}$  (----+) en un 5% y el haplotipo  $\beta^{CIII}$  (-----) en un 3,3%. El grupo restante presentó otras variantes atípicas de haplotipo  $\beta^C$  (TablaII). En los pacientes con Hb SC, el haplotipo  $\beta^S$  CAR fue el de mayor frecuencia, seguido de los haplotipos Benin y Camerún (Tabla III).

### Discusión

Por más de 20 años el análisis de los haplotipos del genes  $\beta$  globina ha sido una exitosa herramienta para investigar el origen de las mutaciones que causan las hemoglobinopatías en el mundo, particularmente las ligados al gen  $\beta^S$ , al  $\beta^C$  y a la beta talasemia.

Los estudios realizados en Venezuela han demostrado que el gen  $\beta^S$  se encuentra asociado a los haplotipos Benin, Bantú (CAR), Sene-

gal y Camerún con frecuencias variables, dependiendo de la región del país de donde provengan los individuos (Arends *et al.*, 2000, Moreno, 2002, Vivenes-Lugo *et al.*, 2003). En este estudio, en los pacientes con hemoglobina SC se encontró que el gen  $\beta^S$  está asociado a los haplotipos CAR, Benin y Camerún. El gen  $\beta^C$  se observó asociado al haplotipo  $\beta^{CI}$  en mayor frecuencia, seguido del  $\beta^{CII}$  y el

Estudios de la frecuencia de los haplotipos del gen  $\beta^C$  en las poblaciones de Reconcavo Baiano y Pernambuco, Brasil, reportan su asociación a los haplotipo  $\beta^{CI}$  en mayor frecuencia, seguido al  $\beta^{CII}$  y el  $\beta^{CIII}$  aunque en una frecuencia variable, coincidiendo este hallazgo a lo observado en la población estudiada (Bezerra *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2010).

Las mutaciones Cd39 (C→T), IVSI-1 (G→A), IVSI-5 (G→A), IVSI-6

TABLE II  
HAPLOTIPOS DEL GEN  $\beta$  GLOBINA EN PACIENTES CON HB AC, SC Y CA<sub>2</sub>

Haplotipos	Pacientes Hb AC	Pacientes Hb SC	Pacientes Hb CA <sub>2</sub>	Total	%
CI (-+--+)	19	17	3	39	65
CII (----+)	2	1		3	5
CIII (-----)	2			2	3,3
Atípico	4	12		16	26,6
Total	27	30	3	60	100

TABLE III  
HAPLOTIPOS DEL GEN  $\beta$  GLOBINA EN PACIENTES CON HB SC

Haplotipo $\beta^C$	Haplotipo $\beta^S$				Total	%
	Benin	CAR	Camerún	No caracterizado		
CI (-+--+)	8	6	1	4	19	63,4
CII (----+)	1				1	3,3
CIII (-----)	1				1	3,3
No caracterizado	1	6		2	9	30
Total	11	12	1	6	30	100

(T→C), IVS1-110 (G→A), IVSII-1 (G→A) e IVSII-745 (C→G) encontradas en los pacientes beta talasémicos en el presente estudio fueron mutaciones descritas previamente en poblaciones de origen mediterráneo y el estudio de sus haplotipos demostró concordancia con este origen en un 68% de los alelos. En este sentido, en los estudios de Falchi *et al.* (2005) sobre la asociación del haplotipo del gen  $\beta$  globina a la mutación CD39 en la población de Córcega se encontró a esta mutación asociada al haplotipo II en un 18% y al haplotipo I en un 2,3%. De igual forma, Piras *et al.* (2005) en un estudio de la frecuencia de los haplotipos asociados a la mutación CD39 en la población de Cerdeña observó que esta mutación se encuentra asociada al haplotipo II en un 52% y al haplotipo I en un 29%. Schiliro *et al.* (1995) en un estudio sobre la heterogeneidad genética de la beta talasemia en el sur-este de Sicilia encontraron a la mutación CD39 asociada exclusivamente a los haplotipos I y II, a la mutación IVS1-110 asociada al haplotipo I, a la IVSII-745 asociada al haplotipo VII, a la IVS1-1 asociada al haplotipo V y a la IVS1-6 asociada al VI, coincidiendo con este hallazgo lo encontrado en el presente estudio. La asociación de las distintas mutaciones encontradas en este estudio con los haplotipos permite concluir que la mayoría de ellas fueron introducidas en Venezuela como producto de las migraciones.

La mutación IVS1-6 estuvo asociada al haplotipo VI (-+---+), en 5 alelos beta talasémicos, tal como lo describieran Orkin *et al.* (1982) y Old (1993). Esta misma mutación estuvo asociada al haplotipo -+---+++ en un alelo y al haplotipo +---++ en dos alelos. La asociación de la mutación IVS1-6 con el haplotipo -+---+++ permitió inferir que se trata de una mutación que ocurrió *de novo*, debido al origen indígena del padre, determinado por estudio familiar, también portador de la misma mutación y cuyo haplotipo no concuerda con el haplotipo VI que relaciona el origen portugués de esta mutación.

Por otro lado, las mutaciones de origen africano, tales como 29 (A→G), -88 (C→T), la delección de 1,39kb, IVSII-1 (G→T) y la IVSII-849 (A→G) se encontraron asociadas a haplotipos de origen africano en un 28,6% de los alelos (Tabla I). La mutación -29 (A→G) se observó asociada al haplotipo -+---+++ como lo describiera Old *et al.* (1993) en poblaciones de origen africano, confirmando este hallazgo

el origen africano de esta mutación y no el origen chino de la misma.

El análisis de los haplotipos en estas mutaciones corrobora el origen mediterráneo y africano de las mismas, las cuales han sido descritas en la población original reforzando el flujo de genes desde estas regiones.

La explicación de estos hallazgos se relaciona con la historia del poblamiento de Venezuela, país que recibió una gran inmigración de países como España, Italia, Portugal y Alemania en la última parte del siglo XIX y en los comienzos del siglo XX (Arends, 1971). Los estudios realizados por Tulio Arends y colaboradores durante treinta años (1960-1990) demostraron esta diversidad racial, encontrando una alta incidencia de las variantes de Hb S y C y de la beta talasemia entre los grupos con ancestros de origen mediterráneo y africano, no así en amerindios. Además, observaron la beta talasemia asociada a las variantes de Hb S y C (Arends *et al.*, 1982). El presente estudio permite confirmar el origen de las mutaciones que producen tanto defectos estructurales como defectos de síntesis en la población venezolana. El mestizaje evidente de la población hace de los haplotipos y de las variantes hemoglobínicas, en especial la Hb S, la Hb C y las mutaciones beta talasémicas una herramienta útil para corroborar la información histórica de Venezuela.

#### AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen el financiamiento del FONACIT a través de los proyectos PG-2005000373, MC-2007001066, MC-2008001053 y del CDCH-UCV a través de los proyectos PI-09-7302-2008-1 y PI 09-00-6451-2006.

#### REFERENCIAS

Antonarakis SE, Boehm CD, Giardinia PJV, Kazazian HHJr (1982) Non-random association of polymorphic restriction sites in the  $\beta$ -globin gene clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 137-141.

Antonarakis S, Kazazian HHJr, Orkin S (1985) DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Human Genet.* 69: 1-14.

Arends A, Álvarez M, Velázquez D, Bravo M, Salazar R, Guevara JM, Castillo O (2000) Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alfa-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. *Am. J. Haematol.* 64: 87-90.

Arends T (1971) Hemoglobinopathies and enzymes deficiencies in Latin American population. En *The Ongoing Evolution of La-*

*tin American Populations.* Charles C. Thomas. Springfield, IL, EEUU. pp. 509-559.

Arends T, Garlin G, Pérez-Bandes O, Anchustegui M (1982) Hemoglobin variants in Venezuela. *Hemoglobin* 6: 243-246.

Bezerra MA, Santos MNN, Araújo AS, Gomes YM, Abath FGC, Bandeira FMGC (2007) Molecular variations linked to the grouping of  $\beta$ - and  $\alpha$ -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin* 31: 83-88.

Boehm CD, Dowling CE, Antonarakis SE, Honig GR, Kazazian HHJr (1985) Evidence supporting a single origin of the  $\beta$ C-globin gene in blacks. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 771-777.

Dos Santos Silva W, de Nazaré Klautau-Guimarães M, Grisolia CK (2010)  $\beta$ -globin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, State of Bahia, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 33: 411-417.

Falchi A, Giovannoni L, Vacca L, Latini V, Vona G, Varesi L (2005)  $\beta$  globin gene cluster haplotype associated with  $\beta$  thalassemia on Corsica Island. *Am. J. Hematol.* 78: 27-32.

Kulozik AE, Wainscoat SS, Serjeant BE, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJF, Falusi AG, Ilaque SK, Hiladi AM, Kate S, Rapasinghe WA, Weatherall DJ (1986) Geographic survey of  $\beta^s$  globin gene haplotypes: evidence for the independent Asian origin of the sickle cell mutation. *Am. J. Human Genet.* 39: 239-244.

Lapoumeroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobe M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Ellion J, Krishnamoorthy R (1992) A novel sickle gene of yet another origin in Africa: The Cameroon type. *Human Genet.* 89: 333-337.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucl. Ac. Res* 1: 1215.

Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kann YW, Chehab FF (1993) Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, Hemoglobin C and seven Mediterranean beta thalassemia mutation by covalent reverse dot blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 81: 239-242.

Moreno N, Martínez JA, Blanco Z, Osorio J, Hackshaw P (2002) Beta globin gene cluster haplotype in Venezuela Sickle Cell patients from the state of Aragua. *Genet. Mol. Biol.* 25: 21-24.

Nagel RL (1996) The sickle haplotypes in Guadeloupe and the African gene flow. *Hemoglobin* 20: 5-7.

Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, Labie D (1985) Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *New Engl. J. Med.* 312: 880-884.

Old JM (1993) Investigation and diagnosis of hematological defects. En Rapley R, Walker MR (Eds.) *Molecular Diagnostics.* Blackwell. Oxford, RU. pp. 169:

Orkin SH, Kazazian HHJr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber

- PG, Giardinia PJV (1982) Linkage of beta thalassaemic mutation and beta globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in the human beta globin gene cluster. *Nature* 296: 627-631.
- Piras I, Vona G, Falchi A, Latini V, Ristaldi S, Vacca L, Varesi L, Calo CM (2005) Beta-globin cluster haplotypes in normal individuals and beta(0)39-thalassemia carriers from Sardinia, Italy. *Am. J. Human Biol.* 17: 765-772.
- Powars DR, Chan L, Schroeder WA (1990)  $\beta^s$  gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: Clinical implications. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* Fall 12: 367.
- Pagnier T, Dunda-Belkoudja O, Zohoum I (1984)  $\alpha$ -Thalassemia among sickle cell anemia patients in various African populations. *Human Genet.* 68: 318-319.
- Schiliro G, Di Gregorio F, Samperi P, Mirabile E, Liang R, Curul MA, Yr Z, Huisman THJ (1995) Genetic heterogeneity of  $\beta$  thalassemia in Southeast Sicily. *Am. J. Hematol.* 48: 5-11.
- Talacki CA, Rappaport E, Schwartz E, Surrey S, Ballas SK (1990) Beta-globin gene cluster haplotypes in Hb C heterozygotes. *Hemoglobin* 14: 229-240.
- Tan GB, Aw TC, Dunstan RA, Lee SH (1993) Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A<sub>2</sub> and F. *J. Clin. Pathol.* 46: 852-856.
- Sutton M, Boushassira EE, Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta globin gene cluster haplotypes. *Am. J. Hematol.* 32: 66-69.
- Vivenes-Lugo M, Rodríguez-Larralde A, Castro-Guerra D. (2003). Beta-globin gene cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the northeastern coast of Venezuela. *Am. J. Human Biol.* 15: 1-9.
- Weatherall DJ, Clegg JB (2001) *The Thalassemia Syndrome*. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell. Londres, RU. 846 pp.

## SIGNIFICANCE OF BETA GLOBIN HAPLOTYPE IN THE ORIGIN OF HEMOGLOBINOPATHIES IN VENEZUELA

Martha Bravo-Urquiola, María González, Silvia Montilla, Marycarmen Chacín, Dalia Velásquez, Gloria García and Anabel Arends

### SUMMARY

In the present study, the significance of the beta globin gene haplotypes in the origin of the hemoglobinopathies was determined in 60 unrelated patients with Hb C and 66 patients with beta thalassemia. Quantitation of Hb A, Hb A<sub>2</sub> and Hb F was performed by ion exchange HPLC-CE. Genomic DNA was isolated from white blood cells by the salting-out procedure. Analysis of the  $\beta$  globin gene mutations was done by polymerase chain reaction (PCR) - based reverse dot blot (RDB) technique. The  $\beta$  globin gene cluster haplotype was characterized by a PCR-based restriction enzyme analysis (PCR-RFLP). The beta globin gene haplotype associated with Hb C was the  $\beta^{CI}$  (-+--+ ) in 65%, followed  $\beta^{CII}$  (----+) in 5% and  $\beta^{CIII}$  (----) in 3.3%. The atypical

haplotypes were 26.6%. Different haplotypes linked to the  $\beta$  thalassaemia chromosomes were found and each mutation was associated to a few specific haplotypes. The chromosomes carrying CD 39 (C→T) mutation was associated to I and II haplotypes. The IVSI-110 (G→A), del 1.39 Kb and -86 (C→G) mutations were associated to haplotype I, the IVSI-5 (G→A) and IVSII-745 (C→G) mutations to haplotype VII, IVSI-1 (G→A) to haplotype V, IVSII-1 (G→A) to haplotype III and the IVSI-6 (T→C) mutation to haplotype VI. In patients with Hb SC,  $\beta^s$  CAR haplotype was the most frequent, followed by haplotypes Benin and Cameroon. These results suggest that the origin of hemoglobinopathies in Venezuela is Mediterranean and African.

## SIGNIFICÂNCIA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE BETA GLOBINA NA ORIGEM DAS HEMOGLOBINOPATIAS NA VENEZUELA

Martha Bravo-Urquiola, María González, Silvia Montilla, Marycarmen Chacín, Dalia Velásquez, Gloria García e Anabel Arends

### RESUMO

O presente estudo pretende corroborar a origem das variantes de hemoglobinas S, C e a beta talassemia em um grupo de pacientes venezuelanos através do estudo dos haplótipos do gene beta globina. Em 60 sessenta pacientes não relacionados com Hb C e em 66 pacientes com beta talassemia foram determinadas as variantes de hemoglobinas mediante a técnica de cromatografia líquida de alta precisão de intercâmbio catiônico (HPLC-CE). O ADN foi extraído pelo método de salting out. O diagnóstico das mutações beta talassêmicas foi realizado por reverse dot blot e a determinação do haplótipo do gen beta globina a técnica dos polimorfismos de longitude dos fragmentos de restrição (RFLP). O haplótipo do gene beta globina asso-

ciado à Hb C foi o  $\beta^{CI}$  (-+--+ ) em 65%, seguido do  $\beta^{CII}$  (----+) em 5% e o  $\beta^{CIII}$  (----) em 3,3%. Observou-se um 26,6% de haplótipos atípicos. Em pacientes com beta talassemia a mutação CD 39 (C→T) esteve associada aos haplótipos I e II, as mutações IVSI-110 (G→A), Do 1,39kb e -86 (C→G) ao haplótipo I, a mutação IVSI-5 (G→A) e a IVSII-745 (C→G) ao haplótipo VII, a IVSI-1 (G→A) ao haplótipo V, la IVSII-1 (G→A) ao III e a IVSI-6 (T→C) ao VI, coincidindo estes resultados com os da literatura. Em pacientes com Hb SC, o haplótipo  $\beta^s$  CAR foi o mais frequente, seguido do haplótipo Benin e Camarões. Os resultados sugerem que a origem das hemoglobinopatias na Venezuela é mediterrâneo e africano.