

## Caracterización poblacional de mutaciones relevantes para la Anemia Falciforme y su tratamiento: Un paso hacia la personalización de la enfermedad

### Population characterization of mutations for sickle cell anemia and its treatment: One step towards personalized medicine for the disease

Bernardita Cayupe<sup>a,c</sup>, Rafael Barra<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación Biomédica y Aplicada (CIBAP), Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile (USACH). Santiago, Chile.

<sup>b</sup>Bioquímico.

<sup>c</sup>Bióloga.

Recibido: 6 de abril de 2023; Aprobado: 8 de noviembre de 2023

#### ¿Qué se sabe del tema que trata este estudio?

Se ha establecido en la literatura la relevancia de haplotipos definidos asociados con el desarrollo de Anemia Falciforme. Estos haplotipos son más frecuentes en grupos étnicos específicos. Adicionalmente, se ha definido un segundo grupo de mutaciones importantes para la prognosis, diagnóstico y tratamiento farmacológico de Anemia Falciforme, aún pendiente definir si se expresará diferencialmente en diferentes grupos étnicos

#### ¿Qué aporta este estudio a lo ya conocido?

Utilizando bases de datos públicas, se analizó y comparó la distribución poblacional de mutaciones relevantes para el diagnóstico, tratamiento y prognosis de Anemia Falciforme. Utilizando un modelo automatizado de correlación logística encontramos que muchas de las mutaciones se encuentran presente con mayor frecuencia en algunos grupos étnicos. Esta información es relevante porque clarifica y apoya la importancia de la caracterización genotípica en el tratamiento de una enfermedad genética como Anemia Falciforme

#### Resumen

La anemia falciforme (AF) es la enfermedad genética más frecuente del mundo. Hay países con programas de salud pública masivos para la detección temprana esta condición. Varios haplotipos específicos y polimorfismos de una sola base (SNPs) se han asociado en la literatura con la prognosis de AF. **Objetivo:** Demostrar la correlación significativa de SNPs relevantes para el diagnóstico y prognosis de AF entre diferentes grupos étnicos. **Metodología:** se analizaron las frecuencias poblacionales y correlaciones entre varios SNPs relevantes para la prognosis de AF (ej: niveles basales de hemoglobina fetal), respuesta a tratamiento con hidroxiurea y respuesta a otras drogas utilizadas en el tratamiento de AF. Los datos fueron obtenidos de bases de datos genómicos validadas entre diferentes grupos étnicos. **Resultados:** Los cálculos del equilibrio de Hardy-Weinberg y la regresión logística fue exito-

#### Palabras clave:

Anemia Falciforme;  
Polimorfismo de una Base;  
Hemoglobina Fetal;  
Grupos Étnicos;  
Bioinformática

sa en clasificar los grupos étnicos, Africano (0 = 0,78, 1 = 0,89), y con menor eficiencia; Americano (AMR) (0 = 0,88, 1 = 0,00), Asia del Este (EAS) (0 = 0,80, 1 = 0,00), Europeo (EUR) (0 = 0,79, 1 = 0,00), y Sud-Asiático (SAS) (0 = 0,80, 1 = 0,00). **Conclusiones:** Estos resultados, extienden los trabajos previos y muestran que el perfil de mutaciones de la mayoría de los SNPs analizados, presenta distribuciones estadísticamente significativas entre grupos étnicos generales, apuntando a la necesidad de realizar programas de testeo masivo de SNPs para AF en pacientes diagnosticados con esta patología. Se concluye que la aplicación de un programa amplio de genotipificación de mutación generara una respuesta más eficiente y personalizada en el tratamiento de AF.

## Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is the most common genetic disease worldwide. There are countries with massive public health programs for early detection of this condition. In the literature, several specific haplotypes or single-base polymorphic variants (SNPs) have been associated with the SCA prognosis. **Objective:** To demonstrate the significant correlation of SNPs relevant to the diagnosis and prognosis of SCA among different ethnic groups. **Methodology:** we analyzed population frequencies and correlations of several SNPs related to the prognosis of SCA (i.e., baseline fetal hemoglobin levels), response to hydroxyurea treatment, and response to other drugs used in the SCA treatment, collected from validated genomic databases among different ethnic groups. **Results:** The calculation of the Hardy-Weinberg equilibrium and the logistic regression was successful in classifying the ethnic groups as African (0 = 0.78, 1 = 0.89), and with a lower efficiency as American (AMR) (0 = 0.88, 1 = 0.00), East Asian (EAS) (0 = 0.80, 1 = 0.00), European (EUR) (0 = 0.79, 1 = 0.00), and South Asian (SAS) (0 = 0.80, 1 = 0.00). **Conclusions:** The results extend those from previous reports and show that the profile of most of the SNPs studied presented statistically significant distributions among general ethnic groups, pointing to the need to carry out massive early screening of relevant SNPs for SCA in patients diagnosed with this disease. It is concluded that the application of a broad mutation detection program will lead to a more personalized and efficient response in the treatment of SCA.

## Keywords:

Sickle Cell Anemia;  
Single Base  
Polymorphisms;  
Fetal Hemoglobin;  
Ethnic Groups;  
Bioinformatics.

## Introducción

En la actualidad, la enfermedad de células falciformes (ECF), más conocida como anemia de células falciformes (ACF), es una enfermedad genética común distribuida por todo el mundo<sup>1</sup>. La ACF es diez veces más prevalente en África (1.125 por 100.000 nacidos vivos) que en el resto del mundo (112 por 100.000 nacidos vivos) y menos frecuente en Europa (43,12 por 100.000 nacidos vivos)<sup>2</sup>. Normalmente, en pacientes adultos, la forma más común de hemoglobina (HB) es la HbA, compuesta por dos cadenas alfa y dos cadenas beta<sup>1</sup>. La ACF ocurre debido a la sustitución de un residuo de valina por ácido glutámico en la séptima posición de la cadena beta de la HB y se debe a una mutación por sustitución nucleotídica de adenina por timina en el gen de la HB. Esta mutación genera una forma de HB denominada HbS y polimeriza en su estado desoxigenado. La polimerización de la HbS genera un cambio morfológico en el aspecto de los eritrocitos, adquiriendo forma de hoz. Cabe destacar que además de la mutación etiológicamente responsable de la ACF, existe la co-ocurrencia de otras combinaciones alélicas, generando cinco haplotipos<sup>3</sup>, los que han sido asociados a diferentes pronósticos de la ACF<sup>4,5</sup>.

Además, dentro de las alteraciones hemodinámicas de la ACF, se producen fenómenos vaso-oclusivos los que incluyen daño a órganos y dolor<sup>3</sup>. La reoxigenación de la HB recupera la forma estándar del eritrocito. Sin embargo, este proceso los daña y provoca su degradación, causando anemia. La ACF presenta un modelo de herencia autosómica recesiva lo que implica que cada célula debe tener ambas copias con mutación<sup>3</sup>. Cada uno de los padres de un paciente con ACF debe ser portador de una copia del alelo mutado, pero que no muestran ni presentan síntomas<sup>3</sup>.

Las mayores incidencias de la ACF se observan en regiones caracterizadas por infecciones endémicas de malaria. Por este motivo, algunas zonas del África subsahariana y del sudeste asiático han mostrado incidencias más elevadas de ACF<sup>3,4</sup>. Sin embargo, los procesos migratorios han modificado la matriz étnica y han generado un nuevo reto para los sistemas y proveedores de salud.

Normalmente, la ECF no se considera letal durante la infancia; sin embargo, en la edad adulta, puede causar infarto de miocardio y daño renal, entre otras enfermedades graves<sup>3</sup>. La ECF presenta un rango fenotípico muy heterogéneo y puede presentar complicaciones que van desde muy leves hasta incluso la

muerte en los pacientes pediátricos<sup>5,6</sup>. Particularmente en lo que respecta al tratamiento de la ECF, el objetivo principal es aumentar los niveles de Hemoglobina Fetal (HF) en el paciente. Actualmente, la hidroxiurea se utiliza como fármaco antineoplásico de primera línea para aumentar los niveles de HF<sup>7</sup>; sin embargo, la respuesta al tratamiento con hidroxiurea presenta una gran variabilidad entre pacientes.

La literatura resalta la importancia del diagnóstico precoz y la identificación de mutaciones asociadas al pronóstico de la ECF para prevenir o reducir sus efectos dañinos<sup>8</sup>. Asimismo, se ha destacado la importancia de personalizar el tratamiento de la ACF, incluida la posibilidad de realizar un *screening* neonatal<sup>7</sup>. Se han identificado diferentes mutaciones puntuales (SNP) relacionadas con el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento. Principalmente, los niveles de HF son cruciales para determinar la gravedad de la ACF<sup>9,10</sup>. La identificación de los SNPs es un avance en el desarrollo de la medicina personalizada, específicamente en la ACF, donde recientemente se ha destacado la importancia de los modificadores genéticos de la variabilidad<sup>11,12</sup>.

En este trabajo se analizaron bases de datos para una recopilación de mutaciones identificadas como relevantes para el tratamiento personalizado de la ACF. Posteriormente, utilizando herramientas bioinformáticas para el análisis de datos, pudimos reconocer los SNPs relevantes como predictores en diversas poblaciones o grupos étnicos. Las bases de datos dinámicas generadas estarán disponibles en el sitio web <https://github.com/barralabusach> y nos permitirán caracterizar y guiar el desarrollo de tratamientos personalizados para la ACF en diferentes poblaciones.

## Objetivo

Demostrar la correlación significativa de SNPs relevantes para el diagnóstico y pronóstico de ACF con diferentes grupos étnicos.

## Metodología

### Flujo de trabajo general

Se revisó la literatura y se seleccionaron SNPs significativos tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de la ACF. Para cada SNP seleccionado, se descargó la información genómica individual para cada población estudiada de la base de datos “1000 Genomes”<sup>13</sup>. Utilizando esta información, se generó una nueva base de datos en la que se destacaron los alelos y la información del genotipo. Una vez creada la base de datos, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg

(HWE) y se creó un modelo de regresión logística caracterizando el perfil de los SNPs.

### Selección y búsqueda de los SNPs

Para la búsqueda de los SNPs, estos fueron seleccionados de acuerdo con descripciones en la literatura, estrechamente relacionados con los niveles de HF y la respuesta al tratamiento con hidroxiurea. Los SNPs seleccionados fueron validados de forma consistente en un ensayo clínico, identificando el SNP de mayor correlación con la condición clínica<sup>14</sup>.

Los criterios de inclusión utilizados para este ensayo clínico fueron similares a los publicados previamente en la literatura: la presencia de HbS o HbS-B0 (talasemia) y rango etario entre 5 y 21 años. Los criterios de exclusión fueron: embarazo, crisis de dolor actual o reciente, fiebre o enfermedad aguda en las tres semanas previas a la evaluación, transfusión en los 100 días previos o terapia transfusional activa y creatinina sérica o transaminasas hepáticas anormalmente elevadas. Los hermanos fueron excluidos para garantizar la independencia genética<sup>14</sup>.

También se analizaron las frecuencias poblacionales de los SNPs significativos para el tratamiento farmacológico y la caracterización de los haplotipos en la ECF (Tablas Suplementarias 1, 2 y 3 disponibles para su descarga). Tablas 1 y 2 muestran la asignación de las categorías discretas (diagnóstico, pronóstico y niveles de HF). Estos SNPs fueron identificados en la base de datos gratuita “1000 Genomes” y con esta información se generó una nueva base de datos dinámica. Luego de seleccionar los SNPs de interés, se accedió a la base de datos “1000 Genomes” (1000 Genomes Project Phase 3), disponible en la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/>).

Posteriormente, se realizó la búsqueda de cada SNP y se recolectó la información correspondiente a sus frecuencias alélicas observadas en 5 categorías ya descritas por el proyecto “1000 Genomes”, que corresponden a poblaciones humanas: (i) población africana, (ii) población americana, (iii) población de Asia oriental, (iv) población europea y (v) población de Asia del sur. Se obtuvieron dos bases de datos; ambos conjuntos fueron preprocesados con el lenguaje de programación Python 3.8.5. La primera base de datos se basó en la frecuencia de alelo y genotipo para obtener un conjunto de datos que contiene 80 filas y 28 columnas (Tabla suplementaria 4 disponible para descargar a pedido). La segunda base de datos, que incorpora observaciones individuales, se creó utilizando la biblioteca “get\_dummies Pandas Library” para convertir una variable categórica en variables “ficticias/indicadoras” para aplicar un modelo de regresión logística. El conjunto de datos generado contiene 87597 filas × 43 columnas (Cuadro suplementario 5, disponible para su descarga).

Tabla 1. Valores de Chi cuadrado y significancia de p en cada uno de los SNPs y poblaciones analizadas

| SNP               | Población  | Descripción                               | Valor de chi    | Valor de p      |
|-------------------|------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| rs10128556        | SAS        | Niveles basales de HF                     | 354,4552        | 1,07E-77        |
| rs10128556        | AMR        | Niveles basales de HF                     | 246,7468        | 2,63E-54        |
| rs10128556        | AFR        | Niveles basales de HF                     | 566,0709        | 1,2E-123        |
| rs10128556        | EAS        | Niveles basales de HF                     | 462,1858        | 4,3E-101        |
| rs10128556        | EUR        | Niveles basales de HF                     | 316,4231        | 1,95E-69        |
| rs10189857        | EAS        | Niveles basales de HF                     | 20,06321        | 4,4E-05         |
| rs10189857        | AMR        | Niveles basales de HF                     | 92,1718         | 9,66E-21        |
| rs10189857        | EUR        | Niveles basales de HF                     | 179,5613        | 1,02E-39        |
| rs10189857        | AFR        | Niveles basales de HF                     | 447,1257        | 8,09E-98        |
| rs10189857        | SAS        | Niveles basales de HF                     | 7,021048        | 0,029881        |
| rs10494225        | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 517,4806        | 4,3E-113        |
| rs10494225        | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 327,2085        | 8,86E-72        |
| rs10494225        | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 432,2749        | 1,36E-94        |
| rs10494225        | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 448,2387        | 4,64E-98        |
| rs10494225        | EAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 528,2404        | 2E-115          |
| <b>rs11886868</b> | <b>AMR</b> | <b>Niveles basales de HF</b>              | <b>80,34456</b> | <b>3,58E-18</b> |
| <b>rs11886868</b> | <b>AFR</b> | <b>Niveles basales de HF</b>              | <b>28,48313</b> | <b>6,53E-07</b> |
| <b>rs11886868</b> | <b>EAS</b> | <b>Niveles basales de HF</b>              | <b>511,0362</b> | <b>1,1E-111</b> |
| <b>rs11886868</b> | <b>SAS</b> | <b>Niveles basales de HF</b>              | <b>210,5475</b> | <b>1,91E-46</b> |
| rs172652          | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 49,54167        | 1,75E-11        |
| rs172652          | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 312,4771        | 1,4E-68         |
| rs172652          | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 207,1368        | 1,05E-45        |
| rs172652          | EAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | inf             | 0               |
| rs172652          | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 171,1094        | 6,98E-38        |
| rs17599586        | EAS        | % de cambio de HF                         | inf             | 0               |
| rs17599586        | SAS        | % de cambio de HF                         | 477,6657        | 1,9E-104        |
| rs17599586        | EUR        | % de cambio de HF                         | 481,9601        | 2,2E-105        |
| rs17599586        | AFR        | % de cambio de HF                         | 615,3077        | 2,4E-134        |
| rs17599586        | AMR        | % de cambio de HF                         | 356,733         | 3,44E-78        |
| <b>rs2182008</b>  | <b>EUR</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>inf</b>      | <b>0</b>        |
| <b>rs2182008</b>  | <b>SAS</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>inf</b>      | <b>0</b>        |
| <b>rs2182008</b>  | <b>AFR</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>201,9845</b> | <b>1,38E-44</b> |
| <b>rs2182008</b>  | <b>AMR</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>283,9491</b> | <b>2,19E-62</b> |
| rs2295644         | SAS        | % de cambio de HF                         | 205,8865        | 1,96E-45        |
| rs2295644         | EUR        | % de cambio de HF                         | 224,6866        | 1,62E-49        |
| rs2295644         | EAS        | % de cambio de HF                         | 252,7167        | 1,33E-55        |
| rs2295644         | AMR        | % de cambio de HF                         | 201,1632        | 2,08E-44        |
| rs2295644         | AFR        | % de cambio de HF                         | 384,9919        | 2,51E-84        |
| <b>rs2310991</b>  | <b>EAS</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>9,728914</b> | <b>0,007716</b> |
| <b>rs2387634</b>  | <b>EAS</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>inf</b>      | <b>0</b>        |
| rs2693430         | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 369,1575        | 6,89E-81        |
| rs2693430         | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 52,07308        | 4,93E-12        |
| rs2693430         | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 227,9695        | 3,14E-50        |
| rs2693430         | EAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 235,4426        | 7,49E-52        |
| rs2693430         | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 188,1194        | 1,41E-41        |
| <b>rs334</b>      | <b>AMR</b> | <b>Anemia de células falciformes</b>      | <b>inf</b>      | <b>0</b>        |

|                   |            |                                           |                 |                 |
|-------------------|------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>rs334</b>      | <b>AFR</b> | <b>Anemia de células falciformes</b>      | <b>669,7165</b> | 3,7E-146        |
| rs380620          | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 29,99445        | 3,07E-07        |
| rs380620          | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 53,55173        | 2,35E-12        |
| rs380620          | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 248,4805        | 1,1E-54         |
| rs380620          | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 106,0345        | <b>9,44E-24</b> |
| rs4671393         | EAS        | Niveles basales de HF                     | 27,43307        | 1,1E-06         |
| rs4671393         | AFR        | Niveles basales de HF                     | 24,83807        | 4,04E-06        |
| rs4671393         | SAS        | Niveles basales de HF                     | 179,2484        | 1,19E-39        |
| rs4671393         | AMR        | Niveles basales de HF                     | 32,2236         | 1,01E-07        |
| rs4671393         | EUR        | Niveles basales de HF                     | 136,5117        | 2,27E-30        |
| rs4895441         | EAS        | Niveles basales de HF                     | 351,4358        | 4,86E-77        |
| rs4895441         | EUR        | Niveles basales de HF                     | 367,4829        | 1,59E-80        |
| rs4895441         | SAS        | Niveles basales de HF                     | 463,6068        | 2,1E-101        |
| rs4895441         | AMR        | Niveles basales de HF                     | 305,5343        | 4,51E-67        |
| rs4895441         | AFR        | Niveles basales de HF                     | 661,9941        | 1,8E-144        |
| rs5006884         | SAS        | Regulación de niveles de HbA2             | 354,6249        | 9,87E-78        |
| rs5006884         | AFR        | Regulación de niveles de HbA2             | 407,6082        | 3,08E-89        |
| rs5006884         | EUR        | Regulación de niveles de HbA2             | 372,5312        | 1,28E-81        |
| rs5006884         | AMR        | Regulación de niveles de HbA2             | 268,4789        | 5,02E-59        |
| rs5006884         | EAS        | Regulación de niveles de HbA2             | 461,0498        | 7,7E-101        |
| <b>rs61743453</b> | <b>AFR</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>728,4883</b> | <b>6,5E-159</b> |
| <b>rs61743453</b> | <b>AMR</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>inf</b>      | <b>0</b>        |
| rs7309163         | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 225,011         | 1,38E-49        |
| rs7309163         | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 44,29208        | 2,41E-10        |
| rs7309163         | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 268,9595        | 3,95E-59        |
| rs7309163         | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 234,6203        | 1,13E-51        |
| rs7309163         | EAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 272,7217        | 6,01E-60        |
| <b>rs7557939</b>  | <b>EAS</b> | <b>Niveles basales de HF</b>              | <b>511,0362</b> | <b>1,1E-111</b> |
| <b>rs7557939</b>  | <b>AMR</b> | <b>Niveles basales de HF</b>              | <b>14,76837</b> | 0,000621        |
| rs7599488         | AMR        | Niveles basales de HF                     | 87,10243        | 1,22E-19        |
| rs7599488         | AFR        | Niveles basales de HF                     | 451,5556        | 8,8E-99         |
| rs7599488         | EUR        | Niveles basales de HF                     | 184,4137        | 9,02E-41        |
| rs7599488         | EAS        | Niveles basales de HF                     | 18,26966        | <b>0,000108</b> |
| rs816361          | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 508,6557        | 3,5E-111        |
| rs816361          | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 251,5265        | 2,41E-55        |
| rs816361          | EAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 316,4722        | 1,9E-69         |
| rs816361          | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 378,6624        | 5,95E-83        |
| rs816361          | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 339,2567        | 2,14E-74        |
| <b>rs9319428</b>  | <b>AFR</b> | <b>HF y HF en respuesta a Hidroxiurea</b> | <b>6,132478</b> | <b>0,046596</b> |
| rs9693712         | EAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 323,1362        | 6,79E-71        |
| rs9693712         | AFR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 470,8223        | 5,8E-103        |
| rs9693712         | AMR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 104,695         | 1,84E-23        |
| rs9693712         | SAS        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 48,71858        | 2,64E-11        |
| rs9693712         | EUR        | HF y HF en respuesta a Hidroxiurea        | 13,89978        | 0,000959        |

Los valores de Chi-cuadrado y p para el cálculo HWE de SNP en las poblaciones estudiadas. Todos los SNP presentados presentan significación estadística. Los SNP rs11886868, rs2182008, rs380620 y rs7599488 presentan desequilibrio en 4 poblaciones, y el rs2310991 (EAS), rs2387634 (EAS), rs334 (AMR, AFR), rs61743453 (AMR, AFR), rs7557939 (EAS, AMR), rs9319428 (AFR), presentan desequilibrio en una o dos poblaciones. Los SNP mencionados se presentan en negrita. (FH: hemoglobina fetal; AFR: población africana; SAS: población del sur de Asia; AMR: población estadounidense; EUR: población europea; EAS: población de Asia oriental).

### Cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg

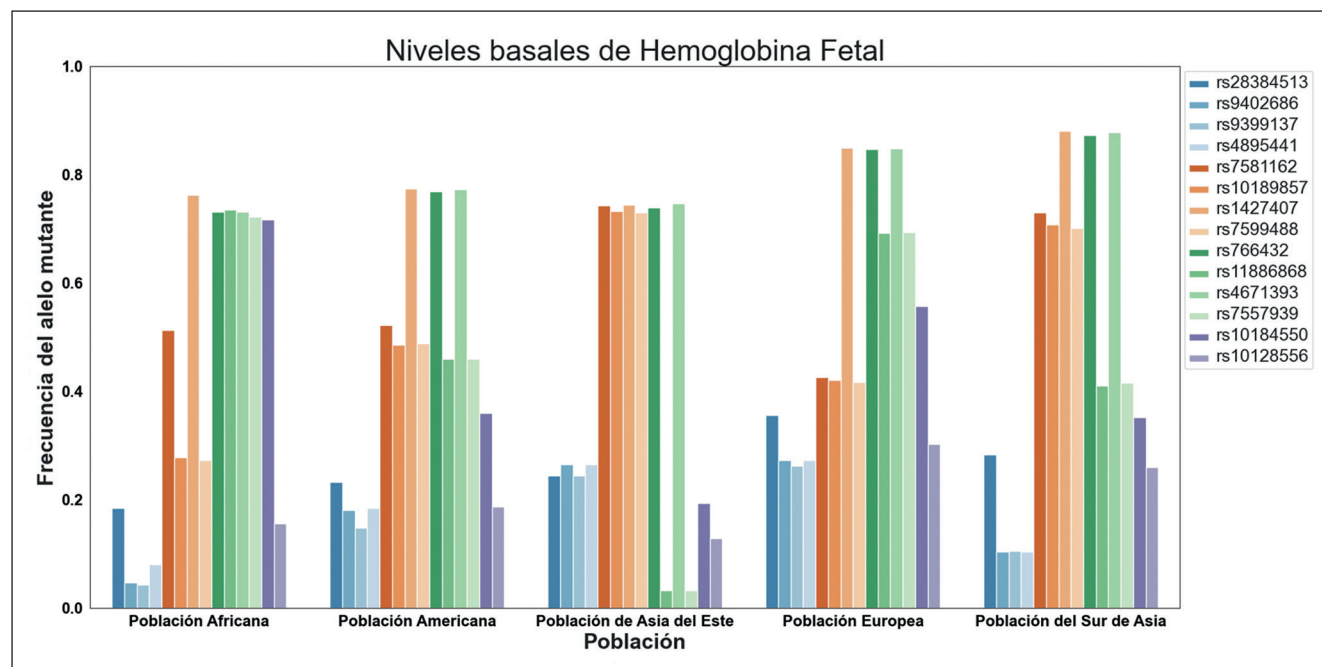
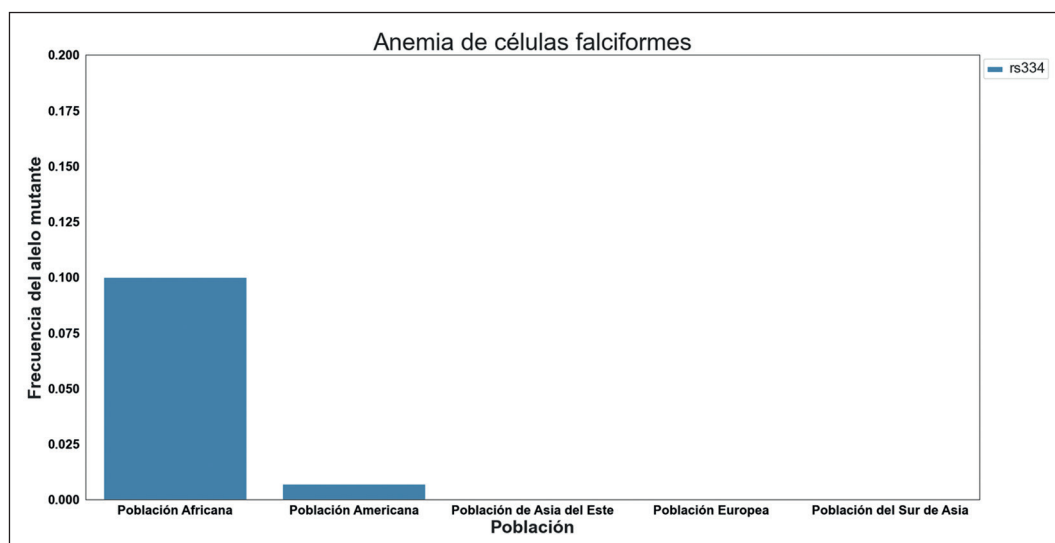
Utilizando la *Pandas Library* de Python 3.8.5 y la metodología descrita por McKinney et al.<sup>15</sup>, se calculó el EHW para cada SNP y se desglosó por cada población utilizando el primer conjunto de datos generado (Tabla 1).

### Análisis de SNPs entre poblaciones

Para analizar la distribución de los SNPs en diferentes poblaciones, se realizaron histogramas de fre-

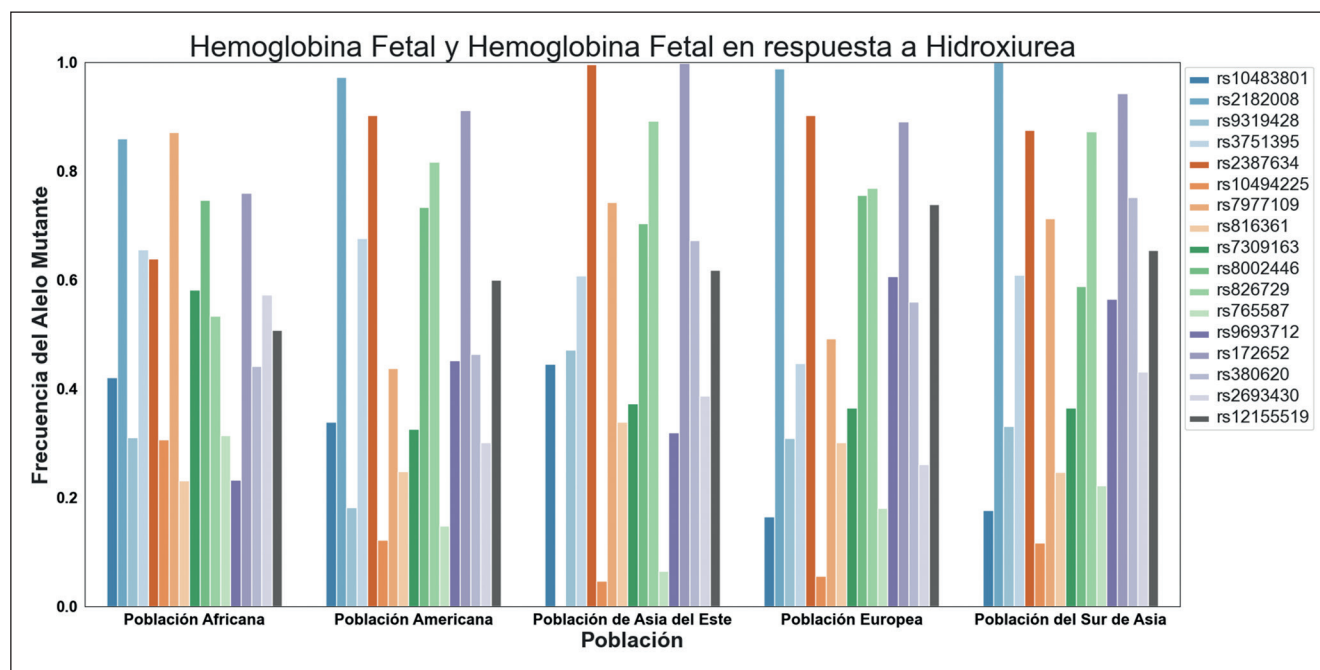
cuencias entre las poblaciones categóricas descritas. Se aplicó una regresión logística al segundo conjunto de datos generado utilizando el módulo de modelo lineal de la *Scikit-learn Library*. El modelo se sometió a un ciclo iterativo de clasificación automática para cada población subconjunto específica. Se utilizó aleatoriamente el 70% de la base de datos para el entrenamiento del modelo y el 30% restante para el diagnóstico automático entre las categorías binarias para cada población.

**Figura 1.** Frecuencia de la mutación del SNP rs 334 en cada población.



**Figura 2.** Frecuencia de los alelos mutantes de los SNP asociados con niveles basales de hemoglobina fetal (HF).





**Figura 3.** Frecuencia del alelo mutante de los SNPs asociado a los niveles de Hemoglobina Fetal y sus niveles en respuesta al tratamiento con Hidroxiurea

## Resultados

### I. Generación de bases de datos y cálculos de EHW

Tras calcular el EHW en los SNPs de la base de datos generada, se observó que 23 de los 37 SNPs analizados no estaban en EHW. Específicamente, 4 SNPs no estuvieron sistemáticamente en EHW en 4 de las 5 poblaciones estudiadas (rs11886868, rs2182008, rs380620, rs7599488) y 6 SNPs no estaban en EHW en una o dos poblaciones (población de Asia oriental; rs2387634 población de Asia oriental; rs334 población americana y población africana; rs61743453 población americana y población africana; rs7557939 población de Asia oriental y población americana; rs9319428 población africana). La Tabla 1 presenta el valor chi y el valor  $p$  para cada SNP y población analizada.

En cuanto a los niveles basales de HF, se observa que los SNPs rs10128556, rs10189857, rs4671393 y rs4895441 no están en EHW en todas las poblaciones. El SNP rs11886868 sólo está en equilibrio en la población europea y el rs7599488 en la población de Asia del sur; el SNP rs7557939 no está en EHW en las poblaciones americanas y del Asia oriental.

### II. Análisis de la variación poblacional de los SNPs

Con respecto a los SNPs descritos para los niveles basales de HF, luego de realizar la caracterización de las poblaciones entre los SNPs, se observan varias diferencias entre las distintas poblaciones caracterizadas (Figuras 1, 2 y 3). Como era de esperar, la mutación

rs334, principal componente etiológico de la ACF, es altamente prevalente en la población africana y tiene una prevalencia mucho menor en la población americana (Figura 1).

En cuanto a los SNPs descritos para los niveles de HF en respuesta al tratamiento con hidroxiurea, se puede observar que el alelo mutado del SNP rs61743453 está presente en la población africana, a diferencia del resto de las poblaciones (Figura 3). Podemos ver que el SNP rs2310991 se encuentra en los cinco grupos categóricos estudiados, sin embargo, presenta una mayor frecuencia de aparición en la población africana.

### III. Correlación logística y clasificación automática

Se aplicó un modelo de regresión logística para clasificar automáticamente las poblaciones estudiadas. En este contexto, fue esencial que la regresión logística organizara correctamente la información genómica entre las categorías africana y no africana. En las demás poblaciones, la regresión logística pudo identificar correctamente la ausencia de población definida (0). Sin embargo, no pudo asignar correctamente la categoría población en otras diferentes del grupo africano. La regresión logística se aplicó utilizando los SNPs relacionados con el diagnóstico, pronóstico y tratamiento asociados a la ACF.

La Tabla 2 muestra el modelo de regresión logística aplicado a los datos pertenecientes a la población africana que podría servir para predecir si una persona con SNPs implicados en la respuesta al tratamiento

**Tabla 2. Clasificación de la información genómica entre poblaciones: africana (AFR), americana (AMR), asiática oriental (EAS), europea (EUR) y Población del sur de Asia (SAS) mediante un modelo de regresión**

| Población |                    | Precisión | Recall | f1-score | Support |
|-----------|--------------------|-----------|--------|----------|---------|
| AFR       | 0                  | 0,78      | 0,99   | 0,87     | 21014   |
|           | 1                  | 0,89      | 0,25   | 0,39     | 7894    |
|           | Exactitud          |           |        | 0,79     | 28908   |
|           | Promedio macro     | 0,83      | 0,62   | 0,63     | 28908   |
|           | Promedio ponderado | 0,81      | 0,79   | 0,74     | 28908   |
| AMR       | 0                  | 0,88      | 1,00   | 0,94     | 25538   |
|           | 1                  | 0,00      | 0,00   | 0,00     | 3370    |
|           | Exactitud          |           |        | 0,88     | 28908   |
|           | Promedio macro     | 0,44      | 0,50   | 0,47     | 28908   |
|           | Promedio ponderado | 0,78      | 0,88   | 0,83     | 28908   |
| EAS       | 0                  | 0,80      | 1,00   | 0,89     | 22983   |
|           | 1                  | 0,00      | 0,00   | 0,00     | 5925    |
|           | Exactitud          |           |        | 0,80     | 28908   |
|           | Promedio macro     | 0,40      | 0,50   | 0,44     | 28908   |
|           | Promedio ponderado | 0,63      | 0,80   | 0,70     | 28908   |
| EUR       | 0                  | 0,79      | 1,00   | 0,88     | 22775   |
|           | 1                  | 0,00      | 0,00   | 0,00     | 6133    |
|           | Exactitud          |           |        | 0,79     | 28908   |
|           | Promedio macro     | 0,39      | 0,50   | 0,44     | 28908   |
|           | Promedio ponderado | 0,62      | 0,79   | 0,69     | 28908   |
| SAS       | 0                  | 0,80      | 1,00   | 0,89     | 23162   |
|           | 1                  | 0,00      | 0,00   | 0,00     | 5746    |
|           | Exactitud          |           |        | 0,80     | 28908   |
|           | Promedio macro     | 0,40      | 0,50   | 0,44     | 28908   |
|           | Promedio ponderado | 0,64      | 0,80   | 0,71     | 28908   |

AFR: Población Africana; SAS: Población del sur de Asia; AMR: población Estadounidense; EUR: población Europea; EAS: Población de Asia Oriental.

**Tabla 3. Número de Hombres y Mujeres distribuidos en cada grupo étnico analizado**

| Población | Género | snp   | Tamaño de la muestra |
|-----------|--------|-------|----------------------|
| AFR       | F      | 12654 | 342                  |
|           | M      | 11803 | 319                  |
| AMR       | F      | 6549  | 177                  |
|           | M      | 6290  | 170                  |
| EAS       | F      | 9620  | 260                  |
|           | M      | 9028  | 244                  |
| EUR       | F      | 9731  | 263                  |
|           | M      | 8880  | 240                  |
| SAS       | F      | 8473  | 229                  |
|           | M      | 9620  | 260                  |
| ALL       | F      | 47027 | 1271                 |
|           | M      | 45621 | 1233                 |
|           |        | 92648 | 2504                 |

AFR: African Population; SAS: Population of South Asia; AMR: American Population; EUR: European Population; EAS: East Asian Population.

to con hidroxurea, niveles basales de HF, regulación del nivel de la subunidad alfa 2 de la hemoglobina (HbA2) y porcentaje de cambio de los niveles de HF podría ser clasificada como africana (o con algún origen genético relacionado con la población africana) con una precisión del 89% para predecir el valor 1. En los demás casos, el modelo no pudo clasificarlos como población americana, europea, de Asia oriental o de Asia del sur. Sin embargo, el modelo acertó cuando los grupos no pertenecían a ninguno de estos grupos de población. Al parecer, la presencia de los SNPs seleccionados, implicados en un mejor pronóstico de la ECF según descripciones previas, aparece frecuentemente relacionada con un posible origen étnico africano, a diferencia de otras poblaciones en las que también se encuentra la malaria. Estos SNPs podrían ser una mejora potencial de la eficacia en poblaciones antecesoras con ECF u otras hemoglobinopatías. Sería interesante evaluar las subpoblaciones ya descritas en el proyecto “1000 Genomes” (actualmente en curso).



## Discusión

Se observaron diferencias notables en la frecuencia poblacional de los polimorfismos analizados entre distintas poblaciones. Esta frecuencia diferencial en los SNPs clínicamente relevantes es importante para la personalización de los tratamientos médicos. Esta información podría ser utilizada para desarrollar políticas públicas personalizadas basadas en la información genómica de la población a la que se accede en diferentes bases de datos<sup>16</sup>.

Actualmente, existen numerosos métodos que permiten reducir los costes asociados a la secuenciación y caracterización del perfil de polimorfismos en un paciente, los que se han aplicado principalmente a la detección de mutaciones relacionadas con el diagnóstico y pronóstico de la ACF<sup>16</sup>, presentando mayores índices de sensibilidad y precisión en comparación con técnicas clásicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, estas tecnologías aún no son masivas. Diferentes avances tecnológicos y técnicos han hecho que la secuenciación sea más asequible y accesible. Estos métodos incluyen la secuenciación de nueva generación (NGS) y las plataformas de genotipado de alto rendimiento, que permiten un análisis con mejor relación costo-beneficio de las variaciones genéticas y los polimorfismos en los pacientes.

Además, existen bases de datos con información poblacional sobre perfiles de SNPs. En este contexto, la literatura ha demostrado en estudios retrospectivos el beneficio de la tipificación de polimorfismos en pacientes diagnosticados con ACF<sup>17-19</sup>. Un estudio identificó la posibilidad de orientar mejor el tratamiento farmacológico de la ACF mediante la caracterización del perfil de mutaciones asociadas a la ACF.

En cuanto al tratamiento de la ACF, la personalización del tratamiento farmacológico se ha visto dificultada por el escaso número de fármacos disponibles. Esto significa que todos los pacientes reciben hidroxiurea como fármaco principal. En los últimos años, han aparecido nuevos fármacos para tratar la ACF; por ejemplo, crizanlizumab y voxelotor han sido aprobados por la FDA y la EMA. Voxelotor es un modulador de la HB que inhibe la polimerización de la HbS, favoreciendo el estado oxigenado de la HB. Tras la finalización del ensayo clínico fase III, voxelotor demostró la reducción de los eventos vaso-oclusivos y de los índices hemolíticos<sup>20</sup>. Además, este medicamento ha sido descrito como especialmente útil en pacientes mayores de 12 años y con ECF resistente al tratamiento con hidroxiurea<sup>21,22</sup>. El crizanlizumab es un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina, una proteína implicada en la adhesión expresada por el endotelio. El bloqueo parcial de la P-selectina dificulta la formación de agre-

gados plaquetas-leucocitos, disminuyendo la formación de eventos vaso-oclusivos<sup>23</sup>. Con la aparición de estos nuevos fármacos, se pone de manifiesto la importancia de disponer de herramientas que identifiquen polimorfismos en grupos poblacionales y mejoren la personalización de los tratamientos para la ACF y otras patologías. Sin embargo, en la literatura se han descrito esfuerzos para personalizar el tratamiento para la ACF con hidroxiurea mediante el cálculo y ajuste de dosis específicas individuales<sup>24,25</sup>.

Se han creado bases de datos que permiten almacenar información sobre la ACF y otras hemoglobinopatías, las que son útiles para establecer la personalización de los tratamientos contra la ACF<sup>26</sup>. Algunos ejemplos de personalización del tratamiento de la ACF se han llevado a cabo mediante la caracterización de polimorfismos asociados a la respuesta al tratamiento con hidroxiurea en pacientes pediátricos<sup>27-30</sup>. Varios estudios han intentado identificar qué población de pacientes mejorará en gran medida sus niveles de HF. Un hecho interesante es que muchos pacientes ya tenían un HF basal más alto y presentaban muchos SNPs en los genes *BCL11A*, *HMIP* (*polimorfismo intergénico HbS1L-MYB*) y *HBG2*<sup>31</sup>. El gen *BCL11A* es un factor de transcripción que codifica una proteína de dedos de zinc y está asociado al desarrollo de varias neoplasias linfoides<sup>32</sup>. El gen *HMIP* muestra un conjunto de SNPs en la región intergénica del gen *HbS1L* (factor de elongación G) y el oncogén *MYC*<sup>33</sup>.

Un enfoque interesante es la aplicación de la medición farmacocinética para definir una dosis individual específica<sup>34</sup>. En este contexto, los SNPs relacionados con la metabolización de la hidroxiurea e incluidos en este estudio son relevantes para identificar y mejorar el perfil farmacogenético de la definición de dosis individuales de hidroxiurea<sup>35,36</sup>.

En la actualidad, procesos como los cambios migratorios y nuevas modificaciones en la matriz étnica han generado la necesidad de establecer políticas públicas de *screening* neonatal para la ACF en comunidades donde antes no se realizaban<sup>37</sup>. Por ejemplo, se ha descrito en la literatura que algunos haplotipos de la ACF podrían co-segregarse y potencialmente asociarse con diferentes niveles de HF<sup>38-45</sup>.

En base a las evidencias presentadas en este trabajo, sería conveniente y orientado a la personalización de la medicina extender el *screening* neonatal a un conjunto completo de polimorfismos, principalmente de SNPs y potenciales haplotipos de interés, con fines de diagnóstico y tratamiento. El perfil genético precoz podría dirigirse a cada población o grupo étnico de interés, familias con al menos un miembro afectado o niños en riesgo. Se considera que es necesario mejorar la tecnología de detección de SNPs, permitiendo la detección

simultánea de múltiples mutaciones relevantes para la ACF. La mayoría de los intentos de la salud pública por establecer estudios neonatales sólo detectan la mutación etiológica de la ACF<sup>46</sup>.

Una de las muchas complicaciones de la ACF son las infecciones. La mortalidad de los niños con diagnóstico de ACF es similar a la de los pacientes no diagnosticados, especialmente en países de altos ingresos<sup>47</sup>. Sin embargo, en los países africanos, sólo sobrevive el 50% de los niños con ACF<sup>48</sup>. Las infecciones son principalmente un factor ambiental; llama la atención que se observan diferencias importantes en varios SNPs relacionados con la metabolización de antibióticos y varios fármacos utilizados para tratar la ECF (actualmente en curso). No se ha descrito la farmacogenómica para otras afecciones concomitantes con la ECF. Algunos estudios observacionales sugieren que los pacientes con diagnóstico de ACF sufren una infección particularmente grave de COVID-19 y dengue<sup>49-51</sup>.

Es esencial personalizar el tratamiento de la ACF y la caracterización completa del haplotipo de la subunidad beta de la hemoglobina del gen *HBB*<sup>52</sup>. Se han descrito cinco haplotipos diferentes de la subunidad beta con mutaciones del gen *HBB* ( $\beta$ -S-*HBB*), incluyendo los haplotipos Benín (BEN), Senegal (SEN), Árabe/India (AI), Bantú (BAN) y Camerún (CAM)<sup>4</sup>. Pacientes con portadores de los haplotipos AI y SEN presentan niveles más elevados de HF y un fenotipo leve<sup>5</sup>. Mientras que los pacientes con los haplotipos BEN y CAM tenían fenotipos graves y leves, respectivamente<sup>52</sup>.

En relación con la ACF, se han descrito muchos modificadores y cofactores. Uno de los más importantes es la presencia simultánea de  $\alpha$ -talasemia. Actualmente, se estima que el 30-35% de los pacientes con diagnóstico de ECF son heterocigotos ( $\alpha\alpha/\alpha-$ ) y un 3-5% homocigotos para la delección ( $\alpha-/ \alpha-$ ) (53,54) para  $\alpha$ -talasemia. La presencia simultánea de  $\alpha$ -talasemia es una cuestión fundamental ya que los pacientes con diagnóstico de ACF y delección de  $\alpha$ -talasemia tienen mejor pronóstico<sup>7</sup>.

En cuanto al análisis de regresión logística, se destaca que el modelo pudo asignar correctamente valores de caracterización tanto positivos como negativos cuando se analizó la población africana. En otras palabras, podría decirse que el perfil de SNPs analizado muestra una asociación particular con el grupo étnico africano.

En resumen, el fenotipo y la gravedad de la ACF tienen muchos factores multigénicos. Realizar el análisis genómico tan pronto como sea posible es importante para la adecuada aplicación futura de la medicina de precisión en el diagnóstico y tratamiento de la ACF. La aparición de la genómica como disciplina

central para el desarrollo de la medicina personalizada da esperanzas de mejorar el tratamiento de la ACF y la ECF en general. Este enfoque podría potenciarse incorporando información "ómica", como la proteómica, la lipidómica, la metabolómica, la transcriptómica y la microbiómica, para desentrañar la fisiopatología de la ACF.

Actualmente, no existen estudios en nuestro país sobre la presencia de mutaciones relevantes para la ACF; sin embargo, existen reportes epidemiológicos en poblaciones de Centroamérica y Sudamérica. En la población de pacientes pediátricos de Haití, diversos estudios han establecido la presencia de la ACF. Estudios en inmigrantes de Haití a Estados Unidos identificaron la presencia de hemoglobina S y hemoglobina C en pacientes pediátricos en 8,0% y 4,7%, respectivamente<sup>54</sup>. Otro estudio estableció la prevalencia de estas mutaciones en un 0,58% para la mutación en portadores homocigotos y aproximadamente un 13% para los portadores heterocigotos. La evidencia apuntaría a establecer que la prevalencia de la ACF en la población haitiana sería el doble que la de los grupos étnicos del África subsahariana<sup>54</sup>. En la actualidad, según información censal y del Servicio Jesuita a Migrantes, existen aproximadamente 200.000 personas de origen haitiano en Chile<sup>55</sup>.

Muy pocos estudios han analizado la prevalencia de la ACF en países sudamericanos, particularmente en Venezuela donde se estimó que la prevalencia en recién nacidos con ACF sería de aproximadamente 0,10% y los portadores heterocigotos de la mutación serían aproximadamente 3,5%<sup>56</sup>. Actualmente, en Chile hay aproximadamente 500.000 migrantes venezolanos. Por lo tanto, es importante destacar que los procesos migratorios modificarán la población en nuestro país y, en el futuro, habrá una creciente presión sobre los sistemas de salud relacionados con la detección precoz de esta enfermedad.

## Conclusión

Considerando el análisis estadístico realizado y el resultado obtenido, podemos concluir que varios SNPs significativos relacionados con el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la ACF están particularmente correlacionados entre los diferentes grupos étnicos. Estamos convencidos de que la focalización en pacientes de alto riesgo, también con historia familiar de alteración hematológica entre otros grupos, el avance en la identificación de SNPs esenciales, como el grupo mencionado en este estudio, y la caracterización del haplotipo en pacientes con ACF y ECF mejorará las respuestas al tratamiento y debería ser una prioridad, especialmente en el sistema de salud pública de nuestro país, orien-

tado a grupos étnicos de alta prioridad o pacientes de alto riesgo.

## Financiamiento

Proyecto DICYT Clínico 022091BP\_MED a RB.

## Agradecimientos

Universidad de Santiago de Chile, USACH. Agradecimientos Proyecto InvClínica \_DICYT, Código 022091BP\_MED, Vicerrectoría de Investigación, Desarrollo e Innovación.

## References

1. Khan H, Krull M, Hankins JS, et al. Sickle cell disease and social determinants of health: A scoping review. *Pediatr Blood Cancer*. 2023;70(2):e30089. doi: 10.1002/pbc.30089.
2. Wastnedge E, Waters D, Patel S, et al. The global burden of sickle cell disease in children under five years of age: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2018;8(2):021103. doi: 10.7189/jogh.08.021103.
3. Kavanagh PL, Fasipe TA, Wun T. Sickle Cell Disease: A Review. *JAMA*. 2022;328(1):57-68. doi: 10.1001/jama.2022.10233.
4. Nagel RL, Fleming AF. Genetic epidemiology of the beta s gene. *Baillieres Clin Haematol*. 1992;5(2):331-65. doi: 10.1016/s0950-3536(11)80023-5.
5. Adekile AD, Gu LH, Baysal E, et al. Molecular characterization of alpha-thalassemia determinants, beta-thalassemia alleles, and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs. *Acta Haematol*. 1994;92(4):176-81. doi: 10.1159/000204216.
6. Makani J, Cavazzana M, Gupta K, et al. Blood diseases in Africa: Redressing unjust disparities is an urgent unmet need. *Am J Hematol*. 2022;97(12):1505-6. doi: 10.1002/ajh.26754.
7. Kasai ET, Alworong'a Opara JP, Ntokamunda Kadima J, et al. Overview of current progress and challenges in diagnosis, and management of pediatric sickle cell disease in Democratic Republic of the Congo. *Hematology*. 2022;27(1):132-40. doi: 10.1080/16078454.2021.
8. Brousse V, Makani J, Rees DC. Management of sickle cell disease in the community. *BMJ*. 2014;348:g1765. doi: 10.1136/bmj.g1765.
9. WATSON J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *Am J Med Sci*. 1948;215(4):419-23. doi: 10.1097/00000441-194804000-00008.
10. Rees DC, Brousse VAM, Brewin JN. Determinants of severity in sickle cell disease. *Blood Rev*. 2022;56:100983. doi: 10.1016/j.blre.2022.100983.
11. Kang HA, Barner JC, Lawson KA, et al. Impact of adherence to hydroxyurea on health outcomes among patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2023;98(1):90-101. doi: 10.1002/ajh.26765.
12. Elenga N, Celicourt D, Muanza B, et al. Dengue in hospitalized children with sickle cell disease: A retrospective cohort study in the French departments of America. *J Infect Public Health*. 2020;13(2):186-92. doi: 10.1016/j.jiph.2019.07.015.
13. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. doi: 10.1038/nature15393.
14. Green NS, Ender KL, Pashankar F, et al. Candidate sequence variants and fetal hemoglobin in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *PLoS One*. 2013;8(2):e55709. doi: 10.1371/journal.pone.0055709.
15. McKinney, W. Data structures for statistical computing in Python. In *Proc. 9th Python in Science Conf.* (eds van der Walt, S. & Millman, K. J.). 2010:56-61.
16. El Hoss S, El Nemer W, Rees DC. Precision Medicine and Sickle Cell Disease. *Hemasphere*. 2022;6(9):e762. doi: 10.1097/HS9.0000000000000762.
17. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639-44. doi: 10.1056/NEJM199406093302303.
18. Pincez T, Ashley-Koch AE, Lettre G, et al. Genetic Modifiers of Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022;36(6):1097-124. doi: 10.1016/j.hoc.2022.06.006.
19. WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 1955;19(4):251-3. doi: 10.1111/j.1469-1809.1955.tb01348.x.
20. Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, et al. A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2019;381(6):509-19. doi: 10.1056/NEJMoa1903212.
21. Food and Drug Administration (FDA). Oxbryta. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/213137s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/213137s000lbl.pdf). Accessed 02 Feb 2023 63
22. CHMP. Oxbryta, INN-Voxelotor. European Medicines Agency (EMA). Oxbryta. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/oxbryta-eparproduct-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/oxbryta-eparproduct-information_en.pdf). Accessed 02 Feb 2023
23. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(5):429-39. doi: 10.1056/NEJMoa1611770.
24. Adekile A, Akbulut-Jeradi N, Al Khaldi R, et al. Diagnosis of Sickle Cell Disease and HBB Haplotyping in the Era of Personalized Medicine: Role of Next Generation Sequencing. *J Pers Med*. 2021;11(6):454. doi: 10.3390/jpm11060454.
25. Gallaway KA, Sakon C, Onger J, et al. Opportunity for pharmacogenetics testing in patients with sickle cell anemia. *Pharmacogenomics*. 2022;23(17):925-31. doi: 10.2217/pgs-2022-0115.
26. Lanzkron S, Manwani D, Desai P, et al. GRNDaD: big data and sickle cell disease. *Blood Adv*. 2022;6(3):1088. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005282.
27. Meier ER, Creary SE, Heeney MM, et al. Hydroxyurea Optimization through Precision Study (HOPS): study protocol for a randomized, multicenter trial in children with sickle cell anemia. *Trials*. 2020;21(1):983. doi: 10.1186/s13063-020-04912-z.
28. Dong M, McGann PT. Changing the Clinical Paradigm of Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Anemia Through Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2021;109(1):73-81. doi: 10.1002/cpt.2028.
29. Gueye Tall F, Martin C, Ndour EHM, et al. Influence of Oxidative Stress Biomarkers and Genetic Polymorphisms on the Clinical Severity of Hydroxyurea-Free Senegalese Children with Sickle Cell Anemia. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9):863. doi: 10.3390/antiox9090863.
30. Manu GP, Segbefia C, N'guessan BB, et al. Association Between Selected Single Nucleotide Polymorphisms in Globin and Related Genes and Response to

- Hydroxyurea Therapy in Ghanaian Children with Sickle Cell Disease. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2022;15:205-14. doi: 10.2147/PGPM.S351599.
31. Mohammad SNNA, Ibrahim S, Wan Ab Rahman WS, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in *XMNI-HBG2*, *HBS1L-MYB*, and *BCL11A* and Their Relation to High Fetal Hemoglobin Levels That Alleviate Anemia. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(6):1374. doi: 10.3390/diagnostics12061374.
  32. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, et al. The *BCL11* gene family: involvement of *BCL11A* in lymphoid malignancies. *Blood.* 2001;98(12):3413-20. doi: 10.1182/blood.v98.12.3413.
  33. Menzel S, Jiang J, Silver N, et al. The *HBS1L-MYB* intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood.* 2007;110(10):3624-6. doi: 10.1182/blood-2007-05-093419.
  34. Karimi M, Zarei T, Haghpahan S, et al. Relationship Between Some Single-nucleotide Polymorphism and Response to Hydroxyurea Therapy in Iranian Patients With  $\beta$ -Thalassemia Intermedia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2017;39(4):e171-6. doi: 10.1097/MPH.0000000000000779.
  35. Allard P, Alhaj N, Lobitz S, et al. Genetic modifiers of fetal hemoglobin affect the course of sickle cell disease in patients treated with hydroxyurea. *Haematologica.* 2022;107(7):1577-88. doi: 10.3324/haematol.2021.278952.
  36. Quinn CT, Niss O, Dong M, et al. Early initiation of hydroxyurea (hydroxycarbamide) using individualised, pharmacokinetics-guided dosing can produce sustained and nearly pancellular expression of fetal haemoglobin in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2021;194(3):617-25. doi: 10.1111/bjh.17663.
  37. Zhou JR, Ridsdale R, MacNeil L, et al. The Alberta Newborn Screening Approach for Sickle Cell Disease: The Advantages of Molecular Testing. *Int J Neonatal Screen.* 2021;7(4):78. doi: 10.3390/ijns7040078.
  38. Chebloune Y, Pagnier J, Trabuchet G, et al. Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(12):4431-5. doi: 10.1073/pnas.85.12.4431.
  39. Shriner D, Rotimi CN. Whole-Genome-Sequence-Based Haplotypes Reveal Single Origin of the Sickle Allele during the Holocene Wet Phase. *Am J Hum Genet.* 2018;102(4):547-56. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.02.003.
  40. Green NS, Fabry ME, Kaptue-Noche L, et al. Senegal haplotype is associated with higher HbF than Benin and Cameroon haplotypes in African children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 1993;44(2):145-6. doi: 10.1002/ajh.2830440214.
  41. Powars D, Hiti A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child.* 1993;147(11):1197-202. doi: 10.1001/archpedi.1993.02160350071011.
  42. Perrine RP, Pembrey ME, John P, et al. Natural history of sickle cell anemia in Saudi Arabs. A study of 270 subjects. *Ann Intern Med.* 1978;88(1):1-6. doi: 10.7326/0003-4819-88-1-1.
  43. Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, et al. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(7):2111-4. doi: 10.1073/pnas.82.7.2111.
  44. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med.* 1985;312(14):880-4. doi: 10.1056/NEJM198504043121403.
  45. Serjeant GR, Vichinsky E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;70:66-77. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.06.004.
  46. Ngole M, Race V, Mbayabo G, et al. DNA testing for sickle cell anemia in Africa: Implementation choices for the Democratic Republic of Congo. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(5):e24398. doi: 10.1002/jcla.24398.
  47. Telfer P, Coen P, Chakravorty S, et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. *Haematologica.* 2007;92(7):905-12. doi: 10.3324/haematol.10937.
  48. Makani J, Cox SE, Soka D, et al. Mortality in sickle cell anemia in Africa: a prospective cohort study in Tanzania. *PLoS One.* 2011;6(2):e14699. doi: 10.1371/journal.pone.0014699.
  49. Hoogenboom WS, Alamuri TT, McMahon DM, et al. Clinical outcomes of COVID-19 in patients with sickle cell disease and sickle cell trait: A critical appraisal of the literature. *Blood Rev.* 2022;53:100911. doi: 10.1016/j.blre.2021.100911.
  50. Telfer P, De la Fuente J, Sohal M, et al. Real-time national survey of COVID-19 in hemoglobinopathy and rare inherited anemia patients. *Haematologica.* 2020;105(11):2651-4. doi: 10.3324/haematol.2020.259440.
  51. Panepinto JA, Brandow A, Mucalo L, et al. Coronavirus Disease among Persons with Sickle Cell Disease, United States, March 20-May 21, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(10):2473-6. doi: 10.3201/eid2610.202792.
  52. Powars DR, Chan L, Schroeder WA. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical implications. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990;12(3):367-74. doi: 10.1097/00043426-199023000-00022.
  53. Rotz S, Arty G, Dall'Amico R, et al. Prevalence of sickle cell disease, hemoglobin S, and hemoglobin C among Haitian newborns. *Am J Hematol.* 2013;88(9):827-8. doi: 10.1002/ajh.23510.
  54. Saint Fleur R, Archer N, Hustace T, et al. Capacity building and networking to make newborn screening for sickle cell disease a reality in Haiti. *Blood Adv.* 2018;2(Suppl 1):54-5. doi: 10.1182/bloodadvances.2018GS111997.
  55. Mercado Órdenes M, Figueiredo A. Construcciones identitarias de inmigrantes haitianos en Santiago de Chile desde una perspectiva interseccional. *Migr Inter.* 2023;13:rmiv1i12495.https://doi.org/10.33679/rmi.v1i1.2495
  56. Huttel A, Maestre GE, Lantigua R, et al. Sickle cell in Latin America and the United States [corrected]. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(7):1131-6. doi: 10.1002/pbc.25450. Erratum in: *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Aug;62(8):1493.