

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE SELECCIÓN NATURAL
SOBRE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN LA POBLACIÓN DE
BUENAVENTURA, COLOMBIA.

DIANA CAROLINA ORTEGA ORTEGA



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA ACADÉMICO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2018

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE SELECCIÓN NATURAL
SOBRE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN LA POBLACIÓN DE
BUENAVENTURA, COLOMBIA.

DIANA CAROLINA ORTEGA ORTEGA
diana.ortega@correounivalle.edu.co

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de
Magister en Ciencias Biomédicas

Director
GUILLERMO BARRETO, PhD.

Codirector
HEIBER CÁRDENAS, PhD.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA ACADÉMICO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI

2018

Nota de aprobación

El trabajo titulado: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE SELECCIÓN NATURAL SOBRE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN LA POBLACIÓN DE BUENAVENTURA, COLOMBIA” presentado por la estudiante DIANA CAROLINA ORTEGA, para optar por el título de Magister en Ciencias Biomédicas, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Santiago de Cali, _____

*A mi padre Celestial:
Sin ÉL nada... con ÉL todo.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser el dueño de mi vida y a quien debo todo lo que soy y lo que tengo.

A mi familia y amigos por sus consejos y compañía incondicional. A Carlos por ser un gran apoyo, amigo y un gran ser humano.

Al profesor Guillermo Barreto por acogerme en su equipo de trabajo, por su orientación y permitirme trabajar en el laboratorio de Genética Molecular Humana. Al profesor Héiber Cárdenas por codirigirme, por su compañía, paciencia y tiempo invertido. La compañía de ustedes como siempre, ha sido fundamental en mi formación.

A Wilmar Torres, Jose Tovar y Andres Salgado por su asesoría estadística.

A todas las personas de la ciudad de Buenaventura que participaron en este estudio.

A mis compañeros de laboratorio y la sección de genética. A Oscar por su compañía a lo largo del trabajo en el laboratorio y los buenos momentos compartidos.

A la Universidad del Valle: “La mejor para los mejores”.

Dios los bendiga a todos.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. La hemoglobina S: drepanocitosis y rasgo falciforme.....	5
3.2. El sistema sanguíneo Duffy	8
3.3. La malaria como fuerza de selección evolutiva.....	10
3.3.1 Gen Duffy y protección a la malaria vivax.....	12
3.3.2 HbS y su protección a la malaria falciparum.....	16
3.3.3 Interacciones entre los genes de protección a malaria.....	18
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos	21
5. JUSTIFICACIÓN.....	22
6. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN LA POBLACIÓN URBANA DE BUENAVENTURA	25
6.1. RESUMEN.....	25
6.2. OBJETIVOS.....	26
6.2.1. Objetivo general.....	26
6.2.2. Objectivos específicos	26
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.3.1. Población y tipo de estudio.....	27
6.3.2. Diagnóstico molecular	28
6.3.2.1. Gen HbS.....	28
6.3.2.2. Gen Duffy	29
6.3.3. Análisis de datos	30
6.3.3.1. Estadística descriptiva.....	30

6.3.3.2. Cálculo de Frecuencias alélicas y diferenciación poblacional.....	32
6.3.3.3. Prueba de independencia, análisis de varianza, regresión y correlación.....	32
6.3.3.4. Análisis bayesiano para estimación de prevalencias.....	33
6.3.3.5. Diferenciación poblacional y prueba de homogeneidad	34
6.4. RESULTADOS.....	34
6.4.1. Frecuencias alélicas, genotípicas y diferenciación por rangos de edades.....	34
6.4.2. Prueba de independencia, regresión múltiple, análisis de varianza y prevalencias.....	37
6.4.3. Comparación con otras poblaciones de Colombia.....	41
6.5. DISCUSIÓN.....	43
6.6. CONCLUSIONES	49
7. CAPITULO II: EVALUACIÓN DE SELECCIÓN NATURAL SOBRE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN UNA MUESTRA POBLACIONAL DE BUENAVENTURA.....	50
7.1. RESUMEN.....	50
7.2. OBJETIVOS.....	51
7.2.1. Objetivo general.....	51
7.2.2. Objetivos específicos	52
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
7.3.1. Población y tipo de estudio y diagnóstico molecular	52
7.3.2. Análisis de datos	52
7.3.2.1. Diferenciación poblacional, equilibrio Hardy-Weinberg y test de neutralidad.....	52
7.3.2.2. Desequilibrio de ligamiento, correlación y coeficientes de selección.....	53
7.4. RESULTADOS.....	55
7.4.1. Equilibrio Hardy – Weinberg, test de neutralidad y desequilibrio de ligamiento	55
7.4.2. Correlaciones genotípicas y alélicas	57
7.4.3. Fitness, coeficientes de selección y excesos promedios	59
7.5. DISCUSIÓN.....	65

7.6. CONCLUSIONES	73
8. CAPITULO III: RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL Y CORRELACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA EL GRUPO SANGUINEO DUFFY Y LA HEMOGLOBINA S EN DISTINTAS POBLACIONES HUMANAS.	74
8.1. RESUMEN.....	74
8.2. OBJETIVOS.....	75
8.2.1. Objetivo general.....	76
8.2.2. Objetivos específicos	76
8.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
8.3.1. Topología del árbol y valores de las puntas	76
8.3.2. Reconstrucción de frecuencias ancestrales	78
8.3.3. Correlación de frecuencias alélicas para ambos genes	78
8.4. RESULTADOS.....	79
8.4.1. Frecuencias alélicas y reconstrucción ancestral	80
8.4.2. Fenogramas y correlaciones alélicas.....	80
8.5. DISCUSIÓN.....	85
8.6. CONCLUSIONES	89
9. CONCLUSIONES GENERALES.....	90
10. LITERATURA CITADA.....	91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. a) Frecuencias del alelo FYB ^{ES} del gen Duffy en las distintas poblaciones del mundo. b) Regiones del mundo donde la malaria vivax está presente	15
Figura 2. a) Frecuencias del alelo S del gen de la beta globina en las distintas poblaciones del mundo. b) Endemicidad de malaria en el mundo....	19
Figura 3. Mapa de las zonas urbanas de la ciudad de Buenaventura. También se vio el Departamento del Valle del Cauca desde el cual la ciudad de Buenaventura, y Colombia, América del Sur país	27
Figura 4. Gráfico de barras de las 12 comunas de Buenaventura respecto a los cinco niveles de protección.....	39
Figura 5. Gráfico de barras de las 12 comunas de Buenaventura respecto a los cinco niveles de protección.....	41
Figura 6. a) Correlación de los genotipos FYB ^{ES} /FYB ^{ES} y AS. b) Correlación de los alelos FYB ^{ES} y S.....	58
Figura 7. Gráfica de los genotipos de protección FYBES/FYBES (color azul) y el genotipo AS (color rojo) respecto la edad.....	59
Figura 8. Arboles filogenéticos de las 24 poblaciones para los alelos S (izquierda) y FYB ^{ES} (derecha). Los valores en los nodos corresponden a las frecuencias alélicas ancestrales calculadas.....	81
Figura 9. a) Fenogramas para los alelos FYB ^{ES} y b) el alelo S de las 24 poblaciones de estudio vs. tiempo evolutivo. El color de letra representa la región a la cual pertenece cada país.....	83
Figura 10. Correlación entre Contrastes filogenéticamente independientes (PICs): a) PICs S vs. PICs FYB ^{ES} , b), PICs S vs. PICs FYA y c) PICs S vs. PICs FYB.....	84

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Variables de estudio.....	31
Tabla 2. Individuos analizados de la zona urbana de Buenaventura.....	35
Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen Duffy y HbS. Con sus respectivas prevalencias y regiones de credibilidad.....	36
Tabla 4. Prueba de independencia y regresión multi y polinomial para las diferentes variables de estudio.....	38
Tabla 5. Prevalencias de la variable “Protección” para cada una de las 12 comunas de la ciudad de Buenaventura.....	40
Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen Duffy de distintas poblaciones Colombianas.....	42
Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen HbS de distintas poblaciones Colombianas.....	43
Tabla 8. Descripción de los tres loci de estudio.....	53
Tabla 9. Equilibrio Hardy-Weinberg para los tres locus de estudio de la población de Buenaventura.....	55
Tabla 10. Valores esperados para el gen Duffy en la población de 27 a 93 años.....	56
Tabla 11. Desequilibrio de ligamiento para las diferentes combinaciones de los tres locus de estudio de la población de Buenaventura.....	56
Tabla 12. Correlaciones genotípicas y alélicas para el gen HbS vs. el gen Duffy.....	58

Tabla 13.	Valores de fitness y coeficientes de selección para la comparación N° 1: grupo 1 vs. 2 (8 meses a 12 años vs. 13 a 27 años).....	61
Tabla 14.	Valores de fitness y coeficientes de selección para la comparación N° 2: grupo 1 vs. 3 (8 meses a 12 años vs. 27 a 63 años).....	61
Tabla 15.	Valores de fitness y coeficientes de selección para la comparación N°3: grupo 2 vs. 3 (13 – 27 años vs. 27 – 93 años).....	62
Tabla 16.	Valores de fitness y coeficientes de selección promedio ponderado	63
Tabla 17.	Aporte del fitness para cada combinación genotípica.....	64
Tabla 18.	Descripción de las 24 poblaciones de estudio.....	77
Tabla 19.	Correlaciones de PICs para tres diferentes comparaciones del alelo S y alelos del gen Duffy.....	82

1. RESUMEN

La malaria es una fuerza selectiva importante para adaptaciones genéticas del ser humano debido al letal impacto sostenido que ha tenido sobre poblaciones en todo el mundo. En regiones de población afrodescendiente y donde la malaria es endémica, se ha encontrado altas frecuencias de polimorfismos que confieren resistencia a malaria, como es el caso del heterocigoto para la hemoglobina S (HbS) y el homocigoto FYB^{ES}/FYB^{ES} del gen Duffy. El objetivo general de este trabajo fue la caracterización molecular y evaluación de selección natural, individual y conjunta, sobre los genes HbS y Duffy en la población urbana de Buenaventura, zona de endemidad malárica; abordada mediante tres objetivos específicos o capítulos: 1) caracterización molecular de ambos genes, 2) evaluación de selección natural sobre estos y 3) reconstrucción ancestral y correlaciones alélicas en distintas poblaciones del mundo. Para los capítulos 1 y 2 se analizaron 819 individuos en un muestreo aleatorio estratificado en cada una de las 12 comunas de la ciudad de Buenaventura. El análisis molecular se realizó por PCR-RFLP y el análisis de datos abordó estadística descriptiva, pruebas independencia, y regresión para el capítulo 1, así como equilibrio Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento, neutralidad, correlaciones y cálculo de coeficientes de selección y *fitness*, para el capítulo 2. Todo lo anterior usando los programas Arlequin 3.5.2.2, SPSS 20 y R 3.4.1. Para el capítulo 3 se usaron frecuencias alélicas de 24 poblaciones humanas reportadas para ambos genes, la reconstrucción de las frecuencias ancestrales se realizó mediante máxima verosimilitud bajo el modelo browniano de evolución, y el análisis de correlación se llevó a cabo mediante el uso de contrastes filogenéticamente independientes (todo lo anterior mediante el software estadístico R). Para la ciudad de Buenaventura se

obtuvieron frecuencias alélicas de 3,1 y 72,2% para los alelos S y FYB^{ES}; 6,1% para el genotipo AS y 55%, para FYB^{ES}/FYB^{ES}. Además, se encontró que el grupo de 13 a 27 años presentó la mayor proporción de estos genotipos de resistencia comparado con las demás edades. Las comunas 1 y 3 mostraron la mayor frecuencia de genotipos de protección, mientras que las comunas 6, 7, 10 y 12 presentaron las frecuencias más bajas. La población mostró equilibrio Hardy-Weinberg solamente para el gen HbS, neutralidad en ambos genes y desequilibrio de ligamiento entre el locus de la mutación HbS y la región promotora del gen Duffy. También se observó un aumento de *fitness* de la combinación genotípica AS*FYB^{ES}/FYB^{ES} principalmente en los adolescentes y adultos jóvenes, y también una fuerte correlación positiva entre estos alelos y genotipos de resistencia (Rho: 90%; p=0,001), así como un comportamiento similar de cambio de frecuencias de estos genotipos en distintas edades de la población. En el análisis de las 24 poblaciones del mundo se encontró una correspondencia en la reconstrucción de las frecuencias ancestrales para ambos alelos, S y FYB^{ES}, y nuevamente una correlación en las frecuencias alélicas (Rho 52%, p=0.001). Esta correlación repetitiva en los distintos análisis podría estar mostrando una relación epistática entre estos dos alelos que puede estar influenciando la eficacia en los individuos portadores, correlación que no solo se evidencia en Buenaventura sino en distintas poblaciones del mundo. Además, en este estudio se presenta evidencia de la acción de la selección natural en las frecuencias alélicas de los genes HbS y Duffy en la ciudad de Buenaventura, selección que depende de la estratificación por rangos de edad de la población.

2. INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y ha sido sugerida como el factor de selección más potente en los seres humanos. En los últimos años se ha observado una creciente evidencia de diferencias étnicas en la susceptibilidad a la malaria y de diversas adaptaciones genéticas a esta enfermedad que han surgido en diferentes poblaciones (Kwiatkowski, 2005). La investigación de las variantes genéticas o polimorfismos que confieren algún grado de protección contra la muerte por infección malárica, tienen la capacidad de aportar más información acerca de las relaciones huésped-parásito que podría originar un nuevo enfoque para la prevención y el tratamiento de la enfermedad (Williams, 2006).

La anemia falciforme es una enfermedad autosómica recesiva, causada por una mutación en el gen de la β - globina. Los individuos sanos heredan dos copias que codifican para la hemoglobina A (HbA) mientras que los afectados por la enfermedad heredan dos copias mutadas para la hemoglobina S (HbS) (Pauling & Itano, 1949). Generalmente los individuos heterocigotos para la HbS (genotipo AS) no exhiben síntomas de la enfermedad, sin embargo, entre el 20 - 40% de su hemoglobina es mutante, presentando lo que se conoce como rasgo falciforme (Cameron et al., 1984; Pathak et al., 2003). En regiones de población afrodescendiente y donde la malaria es endémica, se han encontrado altas frecuencias del alelo S para la HbS representadas principalmente en la alta frecuencia genotípica de individuos heterocigotos AS, esto último explicado por la ventaja de estos al mostrar una mayor resistencia a la infección del *Plasmodium* spp., agente causal de la malaria (Eridani,

2011; Luzzatto, 2012). Por otra parte, los antígenos del sistema del grupo Duffy en sangre, son de gran interés en la medicina debido a su asociación con la invasión de los glóbulos rojos por el parásito *Plasmodium vivax* (Langhi & Bordin, 2006). El sistema consta de tres alelos principales FYA, FYB y FYB^{ES} que contribuyen a un total de seis genotipos: FYB^{ES}/FYB^{ES}, FYA/FYA, FYB/FYB, FYA/FYB, FYA/FYB^{ES}, FYB/FYB^{ES}, dando lugar a cuatro fenotipos: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) y Fy(a-b) (Howes et al., 2011). Homocigosis para el antígeno negativo Fy(a-b-) o genotipo FYB^{ES}/FYB^{ES} confiere resistencia a la malaria por *P. vivax*, y el alelo FYB^{ES} se ha encontrado en una mayor proporción en población afrodescendiente y en regiones endémicas a la malaria (Howes et al., 2011; Zimmerman et al., 2013).

Piel y colaboradores (2010) aportaron la primera confirmación geográfica y cuantitativa de la hipótesis de la malaria a una escala global, donde comparando las frecuencias del alelo S a nivel mundial con las frecuencias de endemidad de la malaria, comprobaron que estas relaciones coinciden considerablemente en el continente africano. Sin embargo, aún no es clara esta correspondencia en América y Asia. De forma similar, Howes y colaboradores (2011) proporcionaron un mapa de frecuencias globales de distribución para los principales alelos del sistema sanguíneo Duffy, y como coinciden estas zonas, principalmente en África, con las regiones de baja endemidad para malaria vivax. Existen varios estudios que evidencian la acción de selección sobre estos alelos por separado (Allison, 1956; Eridani, 2011; Hodgson et al., 2014; Langhi & Bordin, 2006; Luzzatto, 2012; McManus et al., 2017), sin embargo, no hay estudios donde se evalúe una dependencia, interacción o selección conjunta entre estos dos alelos a través de las distintas regiones del mundo, o incluso en

regiones específicas. En Colombia, sin ser la excepción, solo se han reportado estudios de frecuencias para estas dos variantes por separado (Alvear et al., 2012; De Bernal et al., 2010; Bernal et al., 1995; Gonzalez et al., 2012; Moyano & Méndez, 2005; Silva et al., 1998; Vallejo et al., 2015), así que no existen estudios donde se evalúe la posible acción de selección natural para uno o ambos genes, a excepción de un estudio realizado por Ortega y colaboradores (2015) que evidencia sobredominancia en el gen HbS en la población de Buenaventura. Por tanto, el objetivo de este trabajo de investigación fue la caracterización y evaluación de selección sobre los genes Duffy y HbS, tanto individual como conjunta, en la población urbana de la ciudad de Buenaventura, región endémica para malaria en Colombia. Así como la evaluación de correlación de las frecuencias alélicas reportadas de ambos genes en distintas poblaciones del mundo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 La hemoglobina S: drepanocitosis y rasgo falciforme

La hemoglobina es una proteína globular constituida por cuatro subunidades proteicas (globinas) a cada una de las cuales se les une de forma no covalente un grupo hemo (protoporfirina ferrosa), capaz de transportar una molécula de oxígeno de forma reversible (Voet & Voet, 2006). Esta heteroproteína se encuentra dentro de los eritrocitos y su función es la de transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono desde estos a los pulmones. En el adulto y niños mayores de 7 meses el 95% de la hemoglobina es

HbA₁, y el porcentaje restante lo constituyen la HbA₂ y la HbF (<1%). Esta HbA₁ se designa como $\alpha_2\beta_2$, indicando que posee dos cadenas alfa y dos beta (Fuentes et al., 1998), cuyos genes codificantes se encuentran ubicados en los cromosomas 16 (cadenas α) y 11 (cadenas β) (Brittain, 2002).

La hemoglobina S (HbS) es una variante de la hemoglobina HbA₁ que surge por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen de la β - globina. Esta mutación es una transversión del segundo nucleótido en el sexto codón, adenina (A) por timina (T), cambiando el codón GAG del ácido glutámico a GTG, el codón para valina (Ingram, 1957). Esta hemoglobina mutada se polimeriza en condiciones de baja tensión de oxígeno, haciendo que el eritrocito adquiera una forma alargada y curvada, similar a una hoz (Pauling & Itano, 1949). Los individuos afectados con la enfermedad denominada “anemia de células falciformes” (o SCA en inglés), heredan dos copias mutadas para la HbS (genotipo SS) y presentarán algunos o todos los síntomas relacionados a la enfermedad, tales como crisis vaso-oclusiva, crisis aplástica, crisis hiperhemolítica, secuestación esplénica, infecciones bacterianas, accidentes cerebro-vasculares, entre otros (Abarca et al., 2008; Sáenz-Renaud, 2005). Los individuos con una copia normal del gen de la β -globina y otro de la HbS, son denominados con “rasgo falciforme” (genotipo AS), los cuales presentan aproximadamente el 42% de hemoglobina S en sangre. Estos individuos no desarrollan la enfermedad SCA y son asintomáticos, sin embargo, existen pocos casos de pacientes que han llegado a presentar complicaciones en condiciones específicas, como en altitud elevada o en deporte de alto rendimiento (ASH, 2017).

Estudios en el este de Senegal, señalan que, si la selección para el genotipo AS fue más alta en sus inicios que la del genotipo AA, la edad del alelo S se encuentra entre los 1,350–2,100 años (Currat et al., 2002). Análisis con enzimas de restricción ha permitido identificar cuatro zonas en África donde la mutación ocurrió de manera independiente, siendo África occidental y central las zonas con mayor frecuencia de la HbS (Cavalli-Sforza & Bodmer, 1971). De igual forma, para este gen en la India y demás países asiáticos se ha determinado un origen de mutación independiente respecto al encontrado en el continente africano (Kan & Dozy, 1980).

En el mundo, las hemoglobinopatías (grupo de enfermedades genéticas resultantes de la producción anormal de la hemoglobina o de la ausencia de la producción de la misma) (Benson & Therrell, 2010) constituyen el trastorno letal heredado más común, siendo más frecuentes en las poblaciones de África tropical, Asia y la región mediterránea, extendiéndose por migración en todo el mundo (Alwan & Modell, 2003). Mundialmente, se ha calculado un promedio de 307 900 nacimientos anuales con un trastorno grave de hemoglobinas, representando la anemia falciforme el 70% de estos trastornos debido a la alta frecuencia del gen para esta enfermedad (Petrou, 2010).

Los datos disponibles y extrapolados sugieren que existen alrededor de 6000 nacimientos anuales y 100 000-150 000 latinoamericanos se ven afectados por SCA (Huttle et al., 2015). En Colombia se han registrado frecuencias de hemoglobinopatías del 2,4 al 14% en distintas regiones del país: estudios realizados en San Andrés y Providencia por Bernal y colaboradores (1995) revelaron una prevalencia de HbS de 14.3%. En Cartagena se han

registrado frecuencias de 10% para hemoglobinopatías, cuya frecuencia más alta fue para la HbS, con una prevalencia del 6.9% para los heterocigotos (Silva et al., 1998). En el sur occidente colombiano, Espinel y Valenzuela (1991) registraron frecuencias para HbS de 2,4% y 2,9% para Tumaco y Chocó, respectivamente. Moyano y Méndez (2005) registraron una prevalencia de hemoglobinopatías del 14.9% en la ciudad de Buenaventura, con una frecuencia de heterocigotos (portadores) del alelo S del 7%. En el 2010 se revelaron frecuencias de hemoglobinopatías para un total de 399 neonatos, de los cuales 5.8% fueron heterocigotos AC seguido de 4.8% de heterocigotos AS (De Bernal et al., 2010). Por otra parte, para la población indígena colombiana, no se han reportado hasta el momento frecuencias para el gen de la HbS, pero si frecuencias hasta del 6% para el gen de la hemoglobina C (Espinel & Valenzuela, 1991; Piel et al., 2010). Recientemente, en el 2015, se registró una frecuencia del gen HbS del 3,1% en la población urbana de Buenaventura (Ortega et al., 2015).

3.2 El sistema sanguíneo Duffy

El sistema Duffy monogénico fue el primer grupo sanguíneo humano asignado a un autosoma específico: posición q21-q25 en el cromosoma 1 (Donahue et al., 1968). Este sistema es importante en la clínica debido a incompatibilidades de transfusión y enfermedad hemolítica del recién nacido (Dean, 2005). El producto del gen Duffy es una glicoproteína de superficie, la glicoproteína FY (Gp-Fy) encargada de eliminar los excesos circulantes tóxicos de quimiocinas, conocida por lo tanto como antígeno / receptor Duffy para las quimiocinas o “DARC”. Esta glicoproteína atraviesa la membrana plasmática siete veces y tiene un dominio

N-terminal extracelular y un dominio intracelular C-terminal que media la invasión de eritrocitos por los merozoitos de *Plasmodium vivax* (Langhi & Bordin, 2006).

El gen DARC tiene tres tipos alélicos principales producto de dos polimorfismos, que forman la base del sistema de grupos sanguíneos Duffy. Los antígenos Fy^a y Fy^b, que difieren por un único aminoácido (Gly42Asp), son codificados por los alelos FYA y FYB, que se diferencian por una sola sustitución de base (G125A)(Langhi & Bordin, 2006; Zimmerman, 2004). La expresión Duffy es interrumpida por una sustitución T por C en la región promotora del gen (nucleótido-33), evitando la transcripción y dando como resultado el fenotipo nulo “eritroide silencioso” (superíndice “ES”). Esta variante de la región promotora está comúnmente asociada haplotípicamente con la región codificante del alelo FYB, por tanto, se le denomina alelo FYB^{ES} (Zimmerman, 2004).

De esta manera los alelos FYA, FYB y FYB^{ES} se combinan para formar los genotipos FYB^{ES}/FYB^{ES}, FYA/FYA, FYB/FYB, FYA/FYB, FYA/FYB^{ES}, FYB/FYB^{ES}, dando lugar a cuatro fenotipos: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) y Fy(a-b-), donde los tres primeros están presentes en la población caucásica, con frecuencias de 17%, 49% y 34% respectivamente, mientras que el fenotipo Duffy negativo Fy (a-b-) es raro en esta población, pero se presenta en un 68% de la población afroamericana (Reid & Lomas-Francis, 2004).

Para el gen Duffy, se han encontrado frecuencias desde 0 a 100% para las diferentes poblaciones del mundo (Howes et al., 2011). Las frecuencias más altas para el alelo FYB^{ES} se encuentran en las poblaciones del África, siendo Kenia, Congo y Senegal las poblaciones

con las frecuencias más altas, 97%, 98% y 100%, respectivamente (MAP, 2017). Seguidas de las poblaciones de Sur América, con frecuencias en población negra que oscila entre el 50 y 80% en población afrodescendiente (Gonzalez et al., 2012; Nickel et al., 1999; Vallejo et al., 2015). Las poblaciones del medio oriente por su parte, presentan frecuencias del alelo FYB^{ES} entre el 10 y 30%. Contrastante con las poblaciones de Asia oriental donde el alelo FYA es el prevalente con frecuencias del 87% al 98% y el alelo FYB^{ES} es inexistente o se encuentra en frecuencias muy bajas en algunas poblaciones (<1%). En Europa por otro lado el alelo predominante es el FYB con frecuencias entre el 52 y 65% y frecuencias bajas del FYB^{ES} que oscilan entre 1 y 5% (Howes et al., 2011; MAP, 2017).

En Colombia específicamente se han establecido prevalencias para los genotipos del gen Duffy en poblaciones principalmente de la costa pacífica y del caribe: en el Chocó, Gonzáles y colaboradores (2012) encontraron frecuencias del 50% en población negra, contrastaste a la población mestiza (8%) e indígena (0%). En poblaciones rurales de Buenaventura, se reportaron frecuencias del 69%, en Tumaco del 71% y Tierra alta (Córdoba) del 17% (Vallejo et al., 2015). En Cartagena se encontraron las frecuencias más altas reportadas para Colombia con un 79% en familias afrocaribeñas (Nickel et al., 1999).

3.3 La malaria como fuerza de selección evolutiva

La malaria es una de las enfermedades infecciosa más importante en el mundo, no solo por ser la principal causa de mortalidad infantil, sino por su gran impacto en la evolución

humana: existe una gran evidencia de asociación entre los factores genéticos del hospedero y el genotipo del parásito, interfiriendo con el riesgo de infección y el desarrollo de complicaciones de la enfermedad. En la última década se ha evidenciado crecientemente las diferencias étnicas en la susceptibilidad a la malaria y las diversas adaptaciones genéticas a esta patología surgida en diferentes poblaciones (Kwiatkowski, 2005).

La malaria es causada por un parásito unicelular del género *Plasmodium* (Antinori et al., 2012). Los plasmodios son parásitos intracelulares obligados que son capaces de infectar y replicarse dentro de los eritrocitos después de una fase de replicación clínicamente silenciosa en el hígado (Ingmundson et al., 2012). Tradicionalmente, se reconocen cuatro especies responsables de la infección natural en seres humanos: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*, sin embargo, el reciente incremento de la malaria en el sudeste de Asia causada por *P. knowlesi* ha llevado a considerarlo como el quinto parásito de la malaria humana. Se han reconocido diversas moléculas *in vitro* como receptores que median la adherencia de los glóbulos rojos parasitados. Así mismo, las diferentes especies de *Plasmodium* poseen ligandos específicos a estos receptores (Antinori et al., 2012; Ingmundson et al., 2012).

Como se sabe, las personas pueden diferir en la forma en que responden a una enfermedad infecciosa, y Haldane fue el primero en formular esta noción en términos de selección darwiniana, quien contempló que, dependiendo de su composición genética, las personas tendrían un riesgo diferente de morir cuando se enfrentan a un organismo parasitario (Haldane, 1949). Entonces si un gen que ofrece protección contra ese parásito es, en circunstancias normales perjudicial, su frecuencia aumentaría cuando una población

estuviera expuesta a este (Haldane, 1932). En 1949, propondría la hipótesis de que la presencia de frecuencias altas para el gen de la talasemia en el mediterráneo y donde la malaria era una enfermedad prevalente, podría deberse a la mayor resistencia del heterocigoto a la infección del *Plasmodium falciparum*, mejor conocida como “la hipótesis de la malaria” (Haldane, 1949). Lo anterior sería posible por varias razones: 1) la malaria causada por *Plasmodium falciparum*, es altamente letal; 2) se estima que ha existido en muchas partes del mundo durante varios miles de años o durante varios cientos de generaciones: por lo tanto, el paludismo como agente de selección natural parece un mejor candidato que cualquier otra enfermedad infecciosa asociada a alta mortalidad (como la peste o la gripe); 3) las muertes por malaria ocurren principalmente en niños, es decir, antes de la reproducción, un criterio crítico para la selección efectiva; 4) los plasmodios adoptan diferentes formas en el transcurso de su ciclo de vida, pero lo que causa la enfermedad son los parásitos intra-eritrocíticos: por lo tanto, no es sorprendente que si los glóbulos rojos son anormales, esto puede afectar la probabilidad de éxito del parásito.

3.3.1 Gen Duffy y protección a la malaria vivax.

El proceso de invasión de merozoitos a los glóbulos rojos implica una secuencia compleja de eventos que incluye el acoplamiento a su superficie, reorientación, formación de uniones estrechas y finalmente, la internalización (Dvorak et al., 1975). El parásito *Plasmodium vivax*, requiere la presencia de antígenos Fya o Fyb intactos para invadir los glóbulos rojos (Miller et al., 1976). En 1975, Miller y colaboradores demostraron que los glóbulos rojos

humanos Duffy-negativos eran resistentes a la invasión por *P. knowlesi*, parásito conocido principalmente por producir malaria en primates, aunque también puede invadir los eritrocitos humanos (Miller et al., 1975). Un año después, estos investigadores mostraron que la resistencia a *P. vivax* se correlacionaba con el fenotipo Duffy-negativo en humanos (Miller et al., 1976) y posteriormente, Barnwell y colegas (1989) demostraron *in vitro* que los merozoitos de *P. vivax* eran incapaces de invadir los eritrocitos Duffy-negativos. Así, tanto *P. vivax* como *P. knowlesi* se basan en una interacción antígeno Duffy-ligando del parásito para llevar a cabo la invasión (Langhi & Bordin, 2006). Finalmente, una serie de estudios moleculares y genéticos, permitieron encontrar una vía de invasión crucial que implica al antígeno Duffy presente en la superficie de los eritrocitos y un dominio de unión a la proteína Duffy, rica en cisteína, del *Plasmodium vivax*. Esto último, es crucial para la formación de la unión que llevará a la consecuente internalización del eritrocito, unión que solo podía ser llevada en los eritrocitos Duffy positivos, y no los Duffy negativos (Chitnis & Miller, 1994).

El alelo Duffy-negativo, FYB^{ES} que corresponde a la ausencia del antígeno Fy en los glóbulos rojos, se encuentra fijado o con frecuencias cercanas a la fijación en la mayoría de las poblaciones de África subsahariana, pero es relativamente bajo fuera de África, excepto en regiones con alta concentración de población negra (Howes et al., 2011). Se ha propuesto incluso que la casi ausencia de *P. vivax* en África es debido a que no había huéspedes adecuados en este continente (aunque el ambiente fuese propicio para el parásito). La mayoría de los individuos serían FYB^{ES}/FYB^{ES} a causa a un barrido selectivo conferido por la resistencia a la infección de *P. vivax*, llevando a un aumento de la frecuencia de este alelo en africanos y posterior erradicación del parásito (R. Carter & Mendis, 2002). El valor de *Fst*

para este alelo es el más alto observado para cualquier alelo en humanos, proporcionando así una fuerte evidencia para la acción de la selección natural sobre este locus (Hamblin & Di Rienzo, 2000). Howes y colaboradores (2011) proporcionaron un mapa de frecuencias globales de distribución para los principales alelos del sistema sanguíneo Duffy, y como coinciden estas zonas, principalmente en África, donde *P. vivax* está relativamente ausente (figura 1).

Con respecto a estudios sobre evidencia de selección natural sobre este gen, el patrón de sus frecuencias alélicas y la asociación genotipo-enfermedad se ha interpretado como evidencia de una historia pasada de selección natural para la resistencia a la malaria por *P. vivax*, favoreciendo así el alelo Duffy-negativo en los africanos subsaharianos continentales (Livingstone, 1984). De hecho, Hambling y colaboradores (2000) encontraron que, en relación con la población italiana, los africanos muestran una reducción de la diversidad genética que rodea la mutación que causa la pérdida de la expresión DARC, lo que es coherente con un pasado de barrido selectivo. Hodgson y colaboradores (2014) encontraron evidencia de selección para este alelo en una población de Madagascar, y evaluaron los posibles escenarios, que aparte de la selección, lograrían haber permitido las frecuencias actuales del alelo y la composición de SNPs alrededor de este gen, encontrando que el escenario de selección direccional positiva para el alelo Duffy-negativo explica mejor la frecuencia alta encontrada de este alelo en Madagascar. Recientemente, Mcnamus y colegas (2017) en un trabajo realizado en 21 poblaciones africanas, estimaron que el tiempo en que surgió el ancestro común más reciente del haplotipo más común del alelo FYB^{ES} es de hace 42 mil años. Además, concluyeron que la mutación Duffy nulo (FYB^{ES}) cambió hasta la

fijación en África con una frecuencia inicial muy baja (0,1%) y un coeficiente de selección de 0,043. Sus resultados son consistentes con una compleja historia evolutiva del locus que implica la selección de una mutación que se encontraba en una frecuencia muy baja en la población africana ancestral (“standing variation”), y que luego se diferenció entre las poblaciones europeas, asiáticas y africanas (McManus et al., 2017). Sin embargo, aun los distintos investigadores se plantea la pregunta de si malaria vivax es un agente plausible de selección en el alelo Duffy-negativo en África o si este ya había alcanzado la fijación gracias a un agente selectivo distinto, antes de la aparición de la malaria vivax (Hodgson et al., 2014).

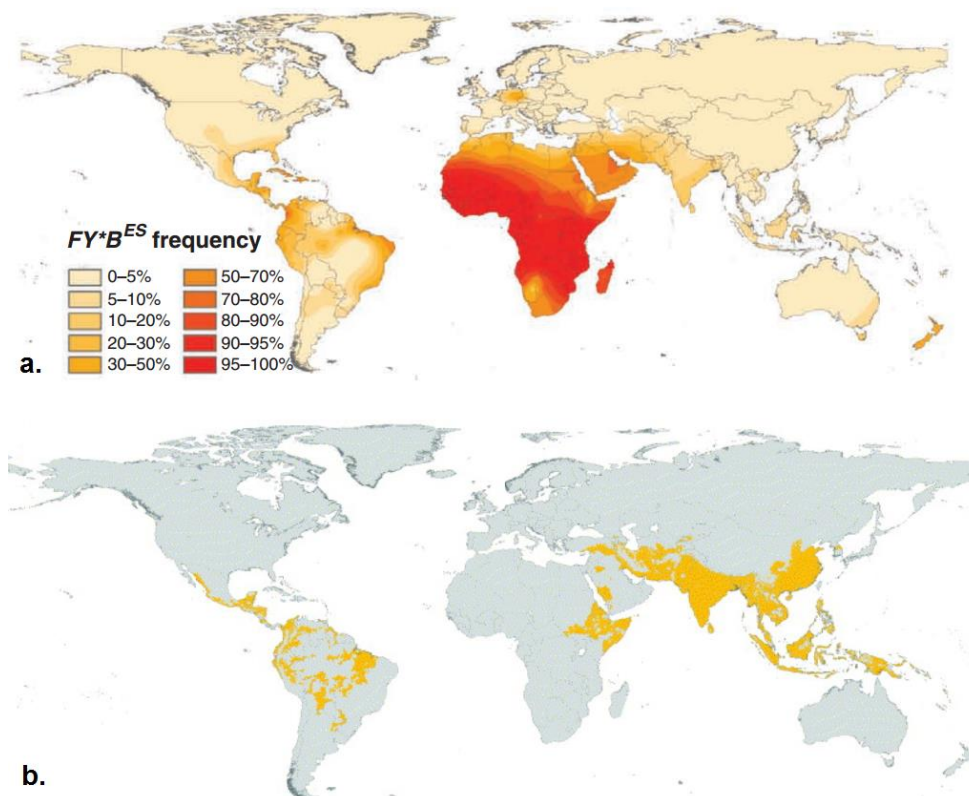


Figura 1. a) Frecuencias del alelo FYB^{ES} del gen Duffy en las distintas poblaciones del mundo. **b)** Regiones del mundo donde la malaria vivax está presente. Adaptado de Howes et al., 2011 y la página web: http://www.vivaxmalaria.com/images/global_dist.jpg

3.3.2 HbS y su protección a la malaria falciparum

La evidencia de la protección conferida por el rasgo falciforme ha sido demostrada en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de las primeras investigaciones fue realizada por Allison (1954), mostrando que los eritrocitos anormales de individuos con el rasgo falciforme eran parasitados en menor medida por el *Plasmodium* que los eritrocitos de individuos sanos. A nivel *in vitro*, Friedman (1978) describió los mecanismos por los cuales la presencia de HbS inhibía el crecimiento del *Plasmodium*, encontrando en sus estudios que el 90% de los parásitos jóvenes se eliminaban en las poblaciones de células con hemoglobinas A y S, y que la presencia del parásito contribuía a inducir la formación de células falciformes en su célula huésped. Sugiriendo entonces que factores tales como la disminución del pH intracelular y los niveles de oxígeno (resultado del metabolismo del parásito), pueden contribuir a la formación de la deformidad del eritrocito (Friedman, 1978). La presencia del parásito en los glóbulos rojos parece ser la razón por la cual dichas células se pegan en las paredes de los capilares lo suficiente como para que exista una reducción en la concentración de oxígeno, produciendo la deformación falciforme. Ahora, las células que adquieren esta forma son fagocitadas con mayor facilidad, contribuyendo de este modo a la eliminación preferencial del parásito. Otros estudios han encontrado que el crecimiento intra-eritrocítico del parásito es inhibido por la polimerización de la HbS en bajas concentraciones de oxígeno, y que la respuesta fagocitaria por parte de las células inmunitarias del huésped es mayor en eritrocitos falciformes infectados por el parásito (fenómeno conocido como “fagocitosis falciforme”), en comparación a la que presentan los eritrocitos normales infectados (Ayi et

al., 2004). Y aunque a menudo se afirma que el mecanismo de protección contra la malaria de los heterocigotos AS no está del todo claro, en los últimos 40 años no ha habido ninguna evidencia contraria al modelo de fagocitosis falciforme, cuya consecuencia clínicamente relevante de este modelo y que ya ha sido probada, es la de mantener la parasitemia relativamente baja en los heterocigotos AS (Luzzatto, 2012).

Sin embargo, puede haber otros mecanismos protectores en los eritrocitos AS: recientemente se ha encontrado que los glóbulos rojos parasitados presentan una adherencia deteriorada a las células endoteliales, lo que podría disminuir el riesgo de malaria cerebral. Al parecer esto es debido a un despliegue defectuoso de la proteína de membrana de eritrocitos 1 (PfEMP) del *P. falciparum* en la superficie de los glóbulos rojos (Cholera et al., 2008), proceso que depende de la remodelación, realizada por el parásito, del citoesqueleto de los glóbulos rojos, y este proceso es defectuoso en los eritrocitos de individuos CC y SC (este efecto en los glóbulos rojos de individuos AS no han sido probados todavía) (Cyrklaff et al., 2011).

La anemia falciforme en el hombre es un ejemplo muy conocido de sobredominancia o ventaja del heterocigoto, cuando la selección favorece al heterocigoto (sobredominancia) las frecuencias génicas de ambos alelos tiende hacia un valor de equilibrio intermedio estable, incluso sin mutación, el cual depende de la proporción entre el coeficiente de selección de uno de los alelos y la suma de los coeficientes de selección de todos los alelos del locus estudiado (Falconer & Mackay, 1996). Para que exista sobredominancia, los alelos deben afectar a dos componentes antagónicos de *fitness* o eficacia, como ocurre en la anemia falciforme. El *fitness* de los homocigotos se reduce a través de un componente, la anemia,

mientras que la eficacia del otro homocigoto se reduce a través de otro factor, la susceptibilidad a la malaria (Falconer & Mackay, 1996).

En 1956, en un estudio poblacional de gran magnitud realizado en niños y adultos de varias zonas de África oriental y occidental, se encontró que los adultos presentaban frecuencias de homocigotos anémicos (o recesivos) en niveles mucho menores a los presentes en niños, además, en los adultos se incrementaba la frecuencia de heterocigotos para el gen de la HbS; de igual manera se encontró a la anemia falciforme y la malaria como principales agente causales de mortalidad y morbilidad en niños, siendo los homocigotos normales más afectados por esta última que los heterocigotos para el gen de la HbS (Allison, 1956).

Piel y colaboradores (2010) proveyeron la primera confirmación geográfica y cuantitativa de la hipótesis de la malaria a una escala global, donde comparando las frecuencias del alelo HbS a nivel mundial con las frecuencias de endemicidad de malaria en el mundo, comprobaron que éstas relaciones coinciden considerablemente en el continente africano. Sin embargo, aún no es clara esta correspondencia en América y Asia (figura 2).

3.3.3 Interacciones entre los genes de protección a malaria.

La hipótesis de la malaria propone que las zonas con alta transmisión de esta patología tendrán una alta prevalencia de las variantes génicas que confieren protección a la misma (Haldane, 1949). Las variantes génicas de resistencia pueden estar representadas en alelos diferentes en un locus dado, donde la selección puede funcionar junto con el alelo normal

ancestral para aumentar, disminuir o estabilizar el cambio genético. Además, dichas variantes de resistencia en diferentes loci pueden estar estadísticamente asociadas (desequilibrio de ligamiento), resultando en un cambio de frecuencias no aleatorio de los alelos de los loci estudiados. Estas variantes pueden tener valores de “fitnees” que no son independientes de los loci (epistasia) e influyen en el cambio genético (Hedrick, 2011).

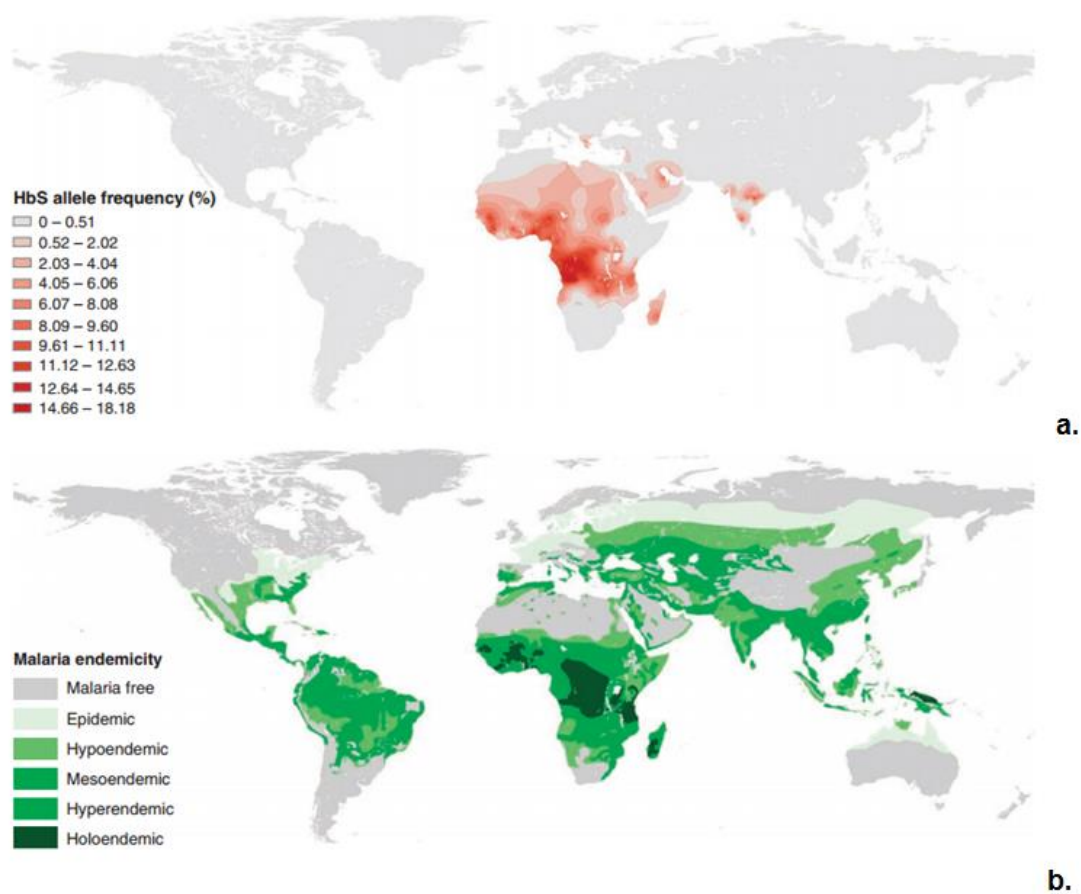


Figura 2. a) Frecuencias del alelo S del gen de la beta globina en las distintas poblaciones del mundo. b) Endemicidad de malaria en el mundo. Tomado de Piel et al., 2010.

El término epistasia fue primeramente usado por Bateson (1909) para describir el efecto “enmascarante” de una variante genética sobre otra. Más tarde, Fisher (1918) usó el término “Epistasia” para referirse a cualquier desviación estadística de la combinación aditiva de dos loci. Así, este concepto de epistasia sostiene que el efecto sobre el *fitness* de un alelo en un locus, depende del genotipo en un segundo locus no relacionado (Williams et al., 2005). Aunque los ejemplos clásicos de este fenómeno han sido descritos en muchos organismos modelos, pocas descripciones están disponibles en humanos, en parte debido a las bajas frecuencias genéticas, pocos reportes de caso y limitaciones en el tamaño y seguimiento de la población (Carlborg & Haley, 2004). Pero la situación con la malaria es diferente: distintos genes de protección a malaria se encuentran en frecuencias altas en distintas poblaciones, y los casos clínicos son bastante comunes. Por lo tanto, la malaria presenta una oportunidad única para probar efectos epistáticos en las poblaciones humanas (Williams et al., 2005).

De hecho, para las variantes de gen de la β -globina, la hemoglobina S y la hemoglobina C (esta última confiere resistencia a malaria en estado homocigoto), se ha encontrado una correlación negativa entre estas en poblaciones africanas, donde pueden coexistir ambos alelos, pero si en una población las frecuencias alélicas de uno son altas, las del otro son muy bajas. Esto puede ser explicado por los diferentes valores de *fitness* de los individuos portadores de estos alelos en las distintas combinaciones genotípicas. Así, el alelo C tiende a desplazar al S cuando ambos inician en frecuencias bajas y el nivel de dominancia de C es alto (Hedrick, 2011). Varios estudios han reportado epistasia negativa entre la hemoglobina S y la α -talasemia, donde su coexistencia resulta en la pérdida del efecto de protección contra la malaria de la HbS, que podría explicarse por cambios específicos del genotipo del huésped en las propiedades de adhesión del parásito (Opi et al., 2014; Penman et al., 2011; Williams

et al., 2005). Este fenómeno revela porque geográficamente, la hemoglobina S es poco común en el mediterráneo, donde la α -talasemia es muy frecuente.

Con respecto al alelo Duffy nulo, no se han reportado correlaciones, ni interacciones epistáticas (o de ningún tipo) de este con las del alelo S, ni tampoco como son los niveles de fitness para los distintos genotipos, teniendo en cuenta ambas variantes en una misma población.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Realizar la caracterización molecular y evaluar evidencia de selección para el gen Duffy y el gen de la hemoglobina S en una muestra poblacional de Buenaventura.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Caracterizar molecularmente los genes Duffy y HbS en la zona urbana de Buenaventura.

4.2.2 Evaluar la evidencia de selección natural para los genes Duffy y HbS, individual y en conjunto, mediante desviación del equilibrio Hardy- Weinberg, prueba

neutralidad, desequilibrio de ligamiento y cálculo de coeficientes de selección y *fitness* para los distintos genotipos.

- 4.2.3 Realizar la reconstrucción ancestral de las frecuencias del alelo de la hemoglobina S (S) y FYB^{ES} del sistema sanguíneo Duffy a lo largo de la filogenia de 24 poblaciones humanas, y evaluar la correlación de estas frecuencias alélicas mediante el uso de contrastes filogenéticamente independientes (PICs).

5. JUSTIFICACIÓN

La malaria es una enfermedad endémica en gran parte de Colombia (áreas localizada por debajo de los 1500 msn) (Minsalud, 2013). En el país, aproximadamente 12 millones de personas habitan en zonas de riesgo para la transmisión de malaria, siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes en Colombia. La morbilidad por esta enfermedad se mantiene elevada, con un registro nacional de aproximadamente 150000 casos anuales (OPS, 2010) constituyéndose así en un evento de especial interés en salud pública.

Aunque la mortalidad por malaria ha disminuido en Colombia, los departamentos de Antioquia, Cauca, Chocó, Córdoba y Valle del Cauca se concentran cerca del ochenta por ciento (80%) de los casos de malaria en el país. Buenaventura esta dentro de los municipios que registran más casos de malaria “complicada” y “no complicada”, así como el mayor número de muertes por esta enfermedad, junto a varios municipios de Chocó, Antioquia y Nariño (INS, 2017).

En el país hay un predominio de malaria por *P. vivax* y *P. falciparum*, y la proporción de casos de malaria por *P. falciparum*, considerada potencialmente letal, es una de las más altas entre los países del continente (30%). En Buenaventura específicamente prevalecen estos dos tipos de malaria, estando mayormente representada la malaria por *P. falciparum* en los dos últimos años (INS, 2017; Perea, 2016, 2017).

En Colombia, pese al mestizaje de los habitantes afrodescendientes, prevalecen las enfermedades genéticas hereditarias como es el caso de la anemia falciforme, y en el suroccidente colombiano la población es susceptible a tener tasas altas de HbS y elevadas frecuencias del gen Duffy nulo. Específicamente se han establecido prevalencias para los genotipos del gen HbS y Duffy en poblaciones principalmente costeras como el Chocó, Buenaventura, Córdoba, Tierra alta y Cartagena (Alvear et al., 2012; De Bernal et al., 2010; Bernal et al., 1995; Gonzalez et al., 2012; Moyano & Méndez, 2005; Silva et al., 1998; Vallejo et al., 2015). Sin embargo, no se han realizado estudios a nivel poblacional que revelen cómo prevalecen las frecuencias de los genotipos que competen a estos genes, y si esas frecuencias se mantienen en la población evidenciando acción de selección natural, como habría de esperarse para una zona donde la malaria es endémica. Lo más aproximado ha sido un estudio nuestro para la misma población de Buenaventura, encontrando evidencia de sobredominancia para el gen HbS en los adolescentes (Ortega et al., 2015). Pero no se ha hecho ningún estudio de este tipo para el gen Duffy, y tampoco se ha evaluado hasta el momento si existe algún tipo de interacción entre estos dos genes de resistencia a malaria (HbS y Duffy) y si alguna combinación de genotipos en particular para ambos genes está confiriendo mayor ventaja adaptativa a los individuos.

A nivel mundial, existen estudios que evidencian la acción de selección sobre estos alelos por separado, sin embargo, no hay estudios donde se evalúe una dependencia o correlación entre estos dos alelos a través de las distintas regiones del mundo.

Por otro lado, la estimación de rasgos ancestrales sigue siendo un objetivo importante en la biología filogenética comparativa, en este caso, la importancia clínica y adaptativa que confiere a las poblaciones humanas portar mutaciones genéticas de interés, como es el caso de la hemoglobina S y el fenotipo Duffy nulo, como una fuerza selectiva importante en el caso de la malaria. Así que sería importante visualizar como han ido cambiando estas frecuencias a lo largo de la diversificación de los grupos poblacionales. Y un análisis de correlación permitiría evaluar qué tanto se relacionan y varían entre sí las frecuencias alélicas de estos dos genes en las distintas poblaciones humanas, y si lo encontrado a nivel local (en este caso la población de Buenaventura) puede extrapolarse a distintas poblaciones del mundo.

6. CAPITULO I

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN LA POBLACIÓN URBANA DE BUENAVENTURA.

6.1 RESUMEN

La malaria es una enfermedad endémica en gran parte de Colombia, y Buenaventura, municipio del Valle del Cauca, se encuentra dentro de las poblaciones que registran más casos de malaria, así como el mayor número de muertes por esta enfermedad. Algunas variantes genéticas confieren resistencia a la malaria, como es el caso del heterocigoto para la hemoglobina S (HbS) y el homocigoto FYB^{ES}/FYB^{ES} del gen Duffy, así que el objetivo de este capítulo es la caracterización molecular de estos genes en una muestra poblacional de la zona urbana de Buenaventura. Se analizaron 819 individuos en un muestreo aleatorio estratificado en cada una de las 12 comunas de la ciudad. El análisis molecular se realizó por PCR-RFLP y el análisis de los datos, fue principalmente descriptivo, de independencia y regresión, llevado a cabo mediante los programas Arlequin 3.5, SPSS 20 y R 3.4.1. Se obtuvieron frecuencias alélicas de 3,1 y 72,2% para los alelos S y FYB^{ES} . Para el genotipo AS 6,1 % y FYB^{ES}/FYB^{ES} 55%. Además, se encontró que el grupo de 13 a 27 años presentó mayor proporción de estos genotipos de resistencia comparado a las demás edades, y las comunas con mayores frecuencias de estos genotipos de protección (combinación genotípica $AA*FYB^{ES}/FYB^{ES}$) fueron la 1 y 3 con 18% y 10,3%, respectivamente. Por otro lado, las comunas con una mayor prevalencia de individuos sin genotipos de protección fueron: 6, 7,

10 y 12 con prevalencias de 19,4%, 26,8%, 17,7% y 13,6% respectivamente. Por lo tanto, sería entonces pertinente tener en cuenta estas comunas y estos grupos de edad para llevar a cabo estudios epidemiológicos y campañas de prevención y atención de salud sobre paludismo en la zona urbana de la ciudad de Buenaventura.

Palabra clave: Buenaventura, comunas, malaria, genotipos de protección.

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente los genes Duffy y HbS en la zona urbana de Buenaventura.

6.2.2 Objetivos específicos

- 6.2.2.1 Establecer frecuencias alélicas y genotípicas de los genes Duffy y HbS en la población urbana de Buenaventura.
- 6.2.2.2 Evaluar el efecto del sexo, la edad y la comuna sobre la presencia de las diferentes combinaciones genotípicas para las dos variantes de estudio.
- 6.2.2.3 Establecer prevalencias de las combinaciones genotípicas de estas dos variantes en cada una de las 12 comunas de la zona urbana de Buenaventura, determinando así el grado de protección de estas.

6.2.2.4 Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de estos dos genes con las reportadas para otras poblaciones colombianas.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Población y tipo de estudio.

Se llevó a cabo un estudio de tipo transversal, cuya toma de la muestra fue realizada mediante un muestreo aleatorio estratificado, donde cada “estrato” correspondió a cada una de las 12 comunas de la ciudad de Buenaventura, municipio del Valle del Cauca (figura 3).

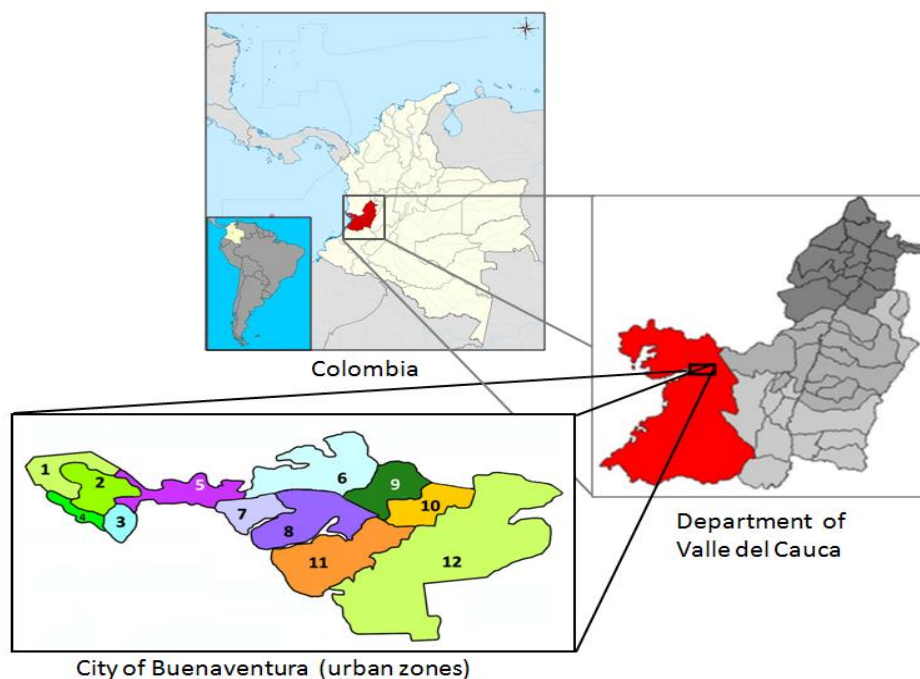


Figura 3. Mapa de las comunas de la ciudad de Buenaventura, ubicada en el Departamento del Valle del Cauca (color rojo). Departamento localizado en Colombia (color rojo), país ubicado en América del Sur. Fuente: Ortega et al., 2015.

Se trabajó con las muestras de DNA de 819 individuos, 214 menores de edad y 605 adultos, de ambos sexos (femenino ó masculino), previamente recolectados en el laboratorio de Genética Molecular Humana (LGMH) de la Universidad del Valle con un aval previo aprobado por el Comité de Ética Humana y Animal de esta universidad, para el diagnóstico de la hemoglobina S y un aval actual para el diagnóstico del gen Duffy en esta misma población (Acta No. 02-013, código: 288-012 y acta N° 013-017, código 098-017). Esta muestra presenta un rango de edad de 8 meses hasta 93 años, correspondientes a las 12 comunas que presenta el municipio; no se trabajó con extranjeros, visitantes o habitantes que no presentaran origen y/o nacimiento en la ciudad. El estado de salud de los participantes fue variable, en su mayoría aparentemente sanos. Finalmente, se escogieron individuos no relacionados (no emparentados entre sí en la misma generación: solo un hermano, primo, nieto, y/o tío por familia) y solo se permitieron miembros de máximo 2 generaciones por familia. Las muestras se almacenaron a -20°C en el LGMH de la Universidad del Valle (Cali), donde fueron procesadas.

6.3.2 Diagnóstico molecular.

6.3.2.1 Gen HbS

El ADN se extrajo a través del método de "salting out" (Miller et al., 1988). La amplificación del ADN se llevó a cabo de acuerdo con la metodología proporcionada por Swee Lay Thein, King's College Hospital en Londres. La mezcla de amplificación (25 µl de volumen) consistió en 50 ng de ADN, 1X Taq Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de la mezcla de los cuatro

desoxinucleótidos trifosfato (Fermentas, Vilnius, Lituania), 1,8 μ M de cebadorares (Forward: 5'- GGG CTG GGC ATA AAA GTC A – 3' Reverse: 5'- AGG GGA AAG AAA GAA AAC ATC AAG GGT C – 3'), y 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Bioline, London, UK). El programa de amplificación comenzó con un calentamiento de 5 minutos a 94°C para la desnaturalización, 30 ciclos continuando como sigue: desnaturalización durante 30 s a 94°C, seguido de hibridación a 62°C durante 1 min; finalmente una extensión a 72°C durante 3 min.

El fragmento amplificado de 571 pb se digirió con 2 unidades de enzima de restricción *DdeI* (Promega, Madison, WI, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión se llevó a cabo durante 5 h a 37°C. Posteriormente, los fragmentos de ADN resultantes se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se examinaron por tinción con nitrato de plata. Los individuos homocigotos (SS) afectados mostraron una banda única de 308 pb; los heterocigotos (AS) tres bandas de 308, 201 y 107 pb, y los individuos homocigotos (AA) mostraron 2 bandas de 201 y 107 pb.

6.3.2.2 Gen Duffy

La mezcla de amplificación de la región promotora GATA por individuo consistió de: 50 ng de ADN, Buffer Taq 1X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de la mezcla de los cuatro dextrinucleótidos trifosfato, 0.3 μ M de cebadores (*forward* 5'-CCC AAG GCC AGT GAC CCC CATA -3' y *reverse* 5'-AGA GGG AGC TAG GAG GCT AGC AT-3') y una unidad de Taq DNA polimerasa. El fragmento de 392pb se trató con tres unidades de la enzima de

restricción *StyI*, y los fragmentos generados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 8%. Los fragmentos resultantes fueron de 205, 110 y 65pb que corresponde a Duffy negativo (Fy-) y las bandas de 205, 110, 80 pb correspondientes a Duffy positivo (Fy+).

Para la región codificante DARC, la mezcla de amplificación por individuo consistió de 50ng de ADN, Buffer Taq 1X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de la mezcla de los cuatro dextrinucleótidos trifosfato, 0.5 μM de primer (forward 5'-AAC TGA GAA CTC AAG TCA GC -3' y reverse 5'-ATG AAG AAG GGC AGT GCA GAGT -3') y una unidad de *Taq* DNA polimerasa. Posteriormente El fragmento de 159 pb se trató con una unidad de la enzima de restricción *Ban-I*. Los productos de esta digestión fueron de 159pb para Fy(a-b+), 86 y 73pb para Fy(a+b-) y 159, 86 y 73pb para fenotipo Fy(a+b+).

6.3.3 Análisis de datos.

6.3.3.1 Estadística descriptiva

Las tablas de contingencia para el conteo de las diferentes variables se llevaron a cabo mediante el programa estadístico SPSS versión 20 (IBM corp., 2011). Las variables de estudio fueron: “sexo”, “edad”, “comuna”, “mutación HbS”, “mutación Duffy”, “Combinación HbS y Duffy”, y una variable especial derivada de esta última denominada “Protección” (tabla 1).

Tabla 1. Variables de estudio

Variable Indicadora	Categorías o valores	Tipo de variable	Escala de medición	Método de medición
Sexo (2)	1=femenino 2= masculino	Cualitativa	Nominal	Encuesta
Edad (3)	1= 8 meses a 12 años 2=13 a 26 años 3=27 a 93 años	Cuantitativa continua	Razón/Ordinal*	Encuesta
Comuna (12)	1= Comuna 1 2= Comuna 2 (...) 12= Comuna 12	Cualitativa	Nominal	Encuesta
Mutación HbS (3)	1=AA 2=AS 3=SS	Cuantitativa discreta	Razón/ Nominal*	PCR-RFLP y posterior conteo de bandas
Mutación Duffy (6)	1=FYB ^{ES} /FYB ^{ES} 2=FYA/FYA 3=FYB/FYB 4=FYA/FYB 5=FYA/FYB ^{ES} 6=FYB/FYB ^{ES}	Cuantitativa discreta	Razón/ Nominal*	PCR-RFLP y posterior conteo de bandas
Combinación HbS y Duffy (13)	1= AA + FYB ^{ES} /FYB ^{ES} 2= AA + FYA/FYA 3= AA + FYB/FYB 4= AA + FYA/FYB 5= AA + FYA/FYB ^{ES} 6= AA + FYB/FYB ^{ES} 7= AS + FYB ^{ES} /FYB ^{ES} 8= AS + FYA/FYA 9= AS + FYB/FYB 10= AS + FYA/FYB 11= AS + FYA/FYB ^{ES} 12= AS + FYB/FYB ^{ES} 13= SS + FYB ^{ES} /FYB ^{ES}	Cuantitativa discreta	Razón/ Nominal*	Conteo de bandas de cada individuo teniendo en cuenta lo obtenido en las variables Mutación Duffy y mutación HbS

 Continuacion tabla 1...

Protección** (5)	1= Doble completa (ser 7 o 13) 2= Doble parcial (ser 11 o 12) 3= Única completa (ser 1, 8, 9 o 10) 4= Única parcial (ser 5 o 6) 5= Ninguna (ser 2, 3 o 4)	Cuantitativa discreta	Razón/ Ordinal*	Conteo de bandas de cada individuo teniendo en cuenta lo obtenido en la variable “Combinación Duffy y HbS”
---------------------	---	--------------------------	--------------------	--

*Escala que tomó la variable al categorizarla; **categorías que provienen de la variable “Combinacion HbS y Duffy”

6.3.3.2 Cálculo de Frecuencias alélicas y diferenciación poblacional

El cálculo de frecuencias alélicas y la prueba exacta de diferenciación poblacional de Raymond y Rousset (1995) para evaluar subgrupos por edad, se llevaron a cabo con el paquete estadístico Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2010). Se usó un valor de 0.05 como máximo error tipo I aceptado.

6.3.3.3 Prueba de independencia, análisis de varianza, regresión y correlación.

La prueba de independencia entre las variables se realizó mediante prueba exacta de Fisher (1935), y el efecto de las distintas variables (sexo, edad, comuna) sobre las variables respuesta (tener o no las mutaciones de interés, así como sus combinaciones) se realizaron mediante un análisis de regresión multinomial (para las variables respuesta “Mutación HbS”, “Mutación Duffy” y “Combinación HbS y Duffy”) y multiordinal (para la variable

“Protección”), según el caso, mediante el software estadístico R versión 3.4.1 (R Core Team 2017). Las variables no mostraron una distribución normal (prueba de *Kolmogorov Smirnov*: $p=0,007$), por ello, para llevar a cabo la comparación de medias de las variables edad y comuna respecto a la variable respuesta “protección”, se realizó un análisis de varianza mediante la prueba de *Kruskal-Wallis*. Además, se realizó una prueba post-hoc usando el test de Wilcoxonm mediante el ajuste del p-valor de *Benjamin & Hochberg* o “BH” y la prueba de *Bonferroni* para comparaciones múltiples.

6.3.3.4 Análisis bayesiano para la estimación de prevalencias.

Dado que la cantidad de éxitos de la variable respuesta “protección” es muy pequeña en cada muestra dentro de las distintas categorías, al calcular la prevalencia de esta con estadística clásica, daría como resultado intervalos de confianza muy amplios, los cuales son poco informativos. Así que se asumió que la prevalencia de la variable respuesta es aleatoria cuyo comportamiento natural se puede modelar usando una distribución de probabilidades uniformes (todas las posibles prevalencias tienen la misma probabilidad de ocurrir), esto antes de obtener los datos (distribución *a priori*). Posterior a la recolección de datos en campo, la información de la muestra se combinó con la información previa, obteniendo la distribución posterior de las prevalencias. Con esta distribución posterior, se obtuvo un indicador, valor esperado, o estimador de la prevalencia de la variable “protección”, cuyas regiones de credibilidad adopta valores positivos.

6.3.3.5 Diferenciación poblacional y prueba de homogeneidad.

Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de la población de estudio respecto a lo reportado en diferentes poblaciones de Colombia. La prueba de diferenciación poblacional se realizó mediante la prueba de Raymmond y Russet (1995) complementada con la prueba de homogeneidad de χ^2 , mediante los paquetes estadístico Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) y SPSS 20 (IBM corp., 2011). Como no se encontró ningún estudio que reportara frecuencias combinadas de los genes Duffy y HbS, se evaluaron estos genes por separado para las poblaciones reportadas. Para el gen Duffy se compararon las poblaciones de: la zona rural de Buenaventura (Valle del Cauca), Tumaco (Nariño) y Tierra alta (Córdoba) reportadas por Vallejo y colaboradores (2015), así como la población de la Italia, del municipio de San José del Palmar (Chocó) reportados por Gonzales y colegas (2012). Para el gen HbS se compararon: dos poblaciones de Buenaventura (Valle) (Moyano y Méndez; De Bernal et al., 2010); una población de San Andrés y Providencia (Bernal et al. 1995), una de Cali (Valle) (Satizabal et al. 2013) y dos poblaciones de Cartagena (Bolívar) (Alvear et al., 2012; Silva et al., 1998).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Frecuencias alélicas, genotípicas y diferenciación por rangos de edades.

Se analizó un total de 819 individuos pertenecientes a las 12 comunas de la zona urbana de Buenaventura (tabla 2). Donde 214 fueron menores de edad y 605 adultos (media= 35 años,

DE=20 años). Para el gen HbS, 769 fueron genotipo AA (hemoglobina normal), 49 de genotipo SA (portadores del rasgo falciforme) y solo un individuo de genotipo SS (homocigoto anémico). Teniendo así, una frecuencia del alelo S de 3,1%; una frecuencia del genotipo AA del 93,8%, del genotipo SA 6,1% y una frecuencia del genotipo SS de 0.2% (tabla 3).

Tabla 2. Número de individuos analizados de la zona urbana de Buenaventura

Comuna	Número de individuos
1	36
2	45
3	56
4	86
5	60
6	63
7	50
8	56
9	72
10	71
11	60
12	164
Total	819

Para el gen Duffy, 450 (55%) presentaron la mutación homocigota para Duffy negativo (genotipo FYB^{ES}/FYB^{ES}) siendo el genotipo más frecuente, seguido de los genotipos portadores de este alelo: FYA/FYB^{ES} (18,6%) y el FYB/FYB^{ES} (14,9%). El genotipo FYA/FYB representa el 6,3%, y los genotipos menos frecuentes fueron FYA/FYA y FYB/FYB con el 3% y 2,5% de representación en la muestra, respectivamente. Teniendo así una frecuencia alélica de FYB^{ES} del 72%, y una frecuencia del 15% y 13% para los alelos

FYA y FYB, respectivamente (tabla 3). Acorde con lo anterior, el fenotipo más frecuente fue el Fy(a- b-) con 56%, seguido del Fy(a+ b-) con 22%, el Fy(a- b+) con 17%, y el fenotipo con la menos representación fue el Fy(a+ b+) con 6% (tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen Duffy y HbS. Con sus respectivas prevalencias y regiones de credibilidad.

		Genotipo Duffy						Total
		FYB ^{ES} /FYB ^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB ^{ES}	FYB/FYB ^{ES}	
Genotipo HbS	AA	417* 50,9%** (49,8-52,1)***	24 3,0% (2,6 - 3,4)	18 2,3% (1,9 - 2,6)	50 6,2% (5,6 - 6,8)	148 18,2% (17,2 - 19)	112 13,8% (12,9 -14,6)	769 93,8% (93,2 -94,3)
	AS	32 4,0% (3,5 - 4,45)	0 0,0% (0,0 -0,17)	2 0,36% (0,21- 4,8)	1 0,24% (0,12 - 0,33)	4 6,0% (4,1 - 7,5)	10 1,34% (1,1 - 1,6)	49 6,1% (5,5 - 6,6)
	SS	1 0,24% (0,12 - 0,32)	0 0,1% (0,0 -0,17)	0 0,1% (0,0 -0,17)	0 0,1% (0,0 - 0,17)	0 0,1% (0,0 - 0,17)	0 0,1% (0,0 - 0,17)	1 0,2% (0,1 - 0,3)
Total		450 55% (54,95 - 56,2)	24 3,0% (2,6 - 3,4)	20 2,5% (2,17 -2,9)	51 6,3% (5,7 - 6,9)	152 18,6% (17,7 - 19,5)	122 14,9% (14 - 15)	819
Frecuencias alélicas Duffy			FYA= 15,2%		Frecuencias alélicas HbS	A= 97,0%		
			FYB= 12,6%			S= 3,1%		
			FYB ^{ES} = 72,2%					

*frecuencia absoluta; **frecuencia relativa o prevalencia; ***región de credibilidad

Teniendo en cuenta ambos genes en conjunto, la combinación con mayor frecuencia fue la AA*FYBES/FYBES con 50,9%, seguida de la AA*FYA/FYBES y AA/FYB/FYBES con 18,2% y 13,8% respectivamente.

Al analizar los genotipos en conjunto y por separado para los genes HbS y Duffy de los individuos en diferentes rangos de edad (8 meses a 12 años, 13 a 26 años y 27 a 93 años) se encontraron diferencias significativas para ambos genes en conjunto ($p=0,010$), por separado

para el gen HbS ($p=0,001$), pero no para el gen Duffy ($p= 0,423$). Especialmente el grupo de 13 a 26 a años mostró diferencias significativas respecto a los grupos de 8 meses – 6 años ($p= 0.016$) y 27 a 93 años ($p=0.012$). Estos grupos de edad se tuvieron en cuenta en los diferentes análisis.

6.4.2 Prueba de independencia, regresión múltiple, análisis de varianza y prevalencias.

Las pruebas de independencia de Fisher fueron significativas ($p=<0,05$) para las variables “Comuna” y “Edad categorizada” (según la tabla 1) respecto a todas las variables respuesta, excepto la variable “mutación Duffy”, que no mostró dependencia de la variable edad, pero sí de la variable Comuna (tabla 4). Respecto a la regresión multinomial (y polinomial para la variable respuesta “Protección”) también se encontró influencia de la variable “Comuna” para todas las variables respuesta de estudio (tabla 4), al igual que influencia de la variable “Edad categorizada” para las variables “Mutación HbS” y “Protección”. Respecto a las variables “Sexo” no se encontró significancia para las variables respuesta, ni en la prueba de Fisher, ni en las regresiones múltiples.

El Análisis de varianza para las variable protección respecto a las Comunas, mostró diferencias significativas entre estas ($p=0,0005$) y el análisis post-hoc mostró que dichas diferencias se encontraban específicamente entre las comunas 1 vs. 6 y 12 y la comuna 3 vs. 6, 7 y 12. En cuanto a los grupos de edad, concordante a lo obtenido mediante la prueba de diferenciación poblacional de Raymond y Russet (1995), se encontró para el análisis de

varianza que el grupo de 13 a 26 años es significativamente diferente al grupo de 8 meses a 12 años y al grupo de 27 a 93 años ($p=0,01$).

Tabla 4. Prueba de independencia y regresión multinomial y ordinal para las diferentes variables de estudio.

		Variables respuesta			Protección
		Mutación HbS	Mutación Duffy	Combinación HbS y Duffy	
Variables (test de Fisher)	Sexo	0,8030	0,8731	0,8872	0,8775
	Edad categorizada	0,0010	0,2603	0,0333	0,0029
	Comuna	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000
Factores (Regresión)	Sexo	0,6245	0,9345	0,8909	0,7944
	+ Edad categorizada	0,0047	0,1746	0,0846	0,0209
	+ Comuna	0,0503	0,0000	0,0001	0,0024

color rojo= valores significativos ($p \leq 0,005$)

Teniendo en cuenta lo obtenido en las pruebas de independencia de Fisher y las regresiones múltiples, se calcularon prevalencias mediante análisis bayesiano para las variables “Comuna” y “Edad” respecto a la variable protección (figura 4 y tabla 5).

Con respecto a los rangos de edad, en los tres grupos se encontró que la categoría “única protección” era la predominante, seguida de “única parcial”. Sin embargo, aunque para los rangos “8 meses a 12 años” y “27 - 93 años” la tercera variable en preveleía era “Ninguna protección” seguida de la “doble protección”, para el grupo de 13 a 26 años la categoría “doble protección” es igual de prevalente que “Ninguna protección” con 8,2%. Finalmente, la protección “doble parcial” fue la de menor prevalencia en todas las categorías, estando mayormente representada en los grupos de 13 a 26 años con un 5,41% (figura 4).

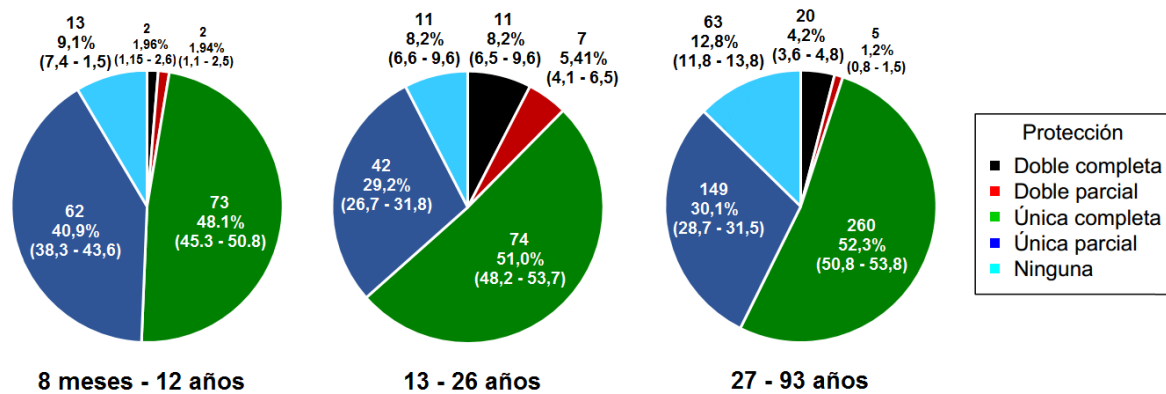


Figura 4. Gráfico de tortas de los grupos de edad respecto a los 5 niveles de protección.

En términos generales, todas las comunas presentaron la mayor prevalencia de individuos con “Única protección”, con frecuencias entre 40,3% - 63,5 %, seguido de la categoría “única parcial” (23,4 – 43,1%). Las comunas que presentaron la mayor prevalencia de “doble protección” fueron la 1 y 3, con 18% y 10,3%, respectivamente. Por otro lado, las comunas 7, 6, 12 y 10 mostraron una mayor prevalencia de individuos “sin protección” con prevalencias de 26,8%, 19,4%, 17,7% y 13,6% respectivamente. Todas las protecciones estuvieron presentes en las 12 comunas excepto, la doble protección, que no estuvo presente en ningún individuo de la comuna 4, y la doble protección parcial, que no estuvo presente en las comunas 2, 5, 6 y 11 (figura 4, tabla 5).

Tabla 5. Prevalencias de la variable “Protección” para cada una de las 12 comunas de la ciudad de Buenaventura

		Protección					Total ⁺
		Doble completa	Doble parcial	Única completa	Única parcial	Ninguna	
Comuna	1	6* 18%** (13,6-21,7)***	2 7,7% (4,5 – 10,1)	17 46,1% (40,7 – 51,5)	8 23% (18,3 – 27,9)	4 12,8% (8,9 – 16,0)	37 4,6% ⁺ (4,12 – 5,1)
	2	1 4,3% (2,12 – 5,8)	0 2,2% (0,63 – 3,0)	25 56,5% (51,5 – 61,5)	16 36,9% (31,8 – 41,6)	2 6,5% (3,8 – 8,4)	44 5,48% ⁺ (4,9 – 5,9)
	3	5 10,3% (7,3 – 21,7)	1 3,4% (1,6 – 4,6)	35 62% (57,7 – 66,4)	12 22,4% (18,5 – 25,9)	3 6,8% (4,4 – 8,7)	56 6,94% ⁺ (6,3- 7,5)
	4	0 1,1% (0,33 – 0,16)	1 2,3% (1,1 – 3,0)	52 60,1% (56,7 – 63,6)	26 30,7% (27,3 – 34,0)	7 9,0% (6,8 – 10,9)	86 10,60% ⁺ (9,8 – 11,3)
	5	1 3,2% (1,5 – 4,3)	0 1,6% (0,46 – 2,2)	38 62,9% (58,8 – 67,1)	19 32,2% (28,1 – 36,1)	2 4,8% (2,8 – 6,2)	60 7,44% ⁺ (6,8 – 8,0)
	6	1 3,0% (1,4 – 3,9)	0 1,5% (0,43 – 2,0)	28 43,4% (39,2 – 47,5)	24 37,4% (33,4 – 36,1)	12 19,4% (15,9 - 22,4)	65 8,0% ⁺ (7,3 – 8,6)
	7	3 7,6% (4,9 – 9,7)	1 3,8% (1,8 – 5,2)	20 40,3% (35,7 – 44,7)	13 26,9% (22,6 – 30,9)	13 26,8% (22,5 – 30,8)	50 6,20% ⁺ (5,6 – 6,7)
	8	2 5,13% (3,0 – 6,7)	3 6,9% (0,43 – 2,0)	25 44,8% (40,2 – 49,1)	24 43,1% (38,7 – 47,4)	2 5,2% (3,0 – 6,8)	56 6,95% ⁺ (6,3 – 7,5)
	9	2 4,0% (2,3 – 5,3)	1 2,7% (1,3 – 3,7)	46 63,5% (59,9 – 67,3)	16 23% (19,5 – 26,2)	7 10,7% (8,1 – 12,9)	72 8,89% ⁺ (8,2 – 9,5)
	10	4 6,8% (4,7 – 8,6)	0 1,3% (0,4 – 1,9)	33 46,5% (42,5 – 50,5)	25 35,6% (31,8 – 39,3)	9 13,6% (10,7 – 16,2)	71 8,75% ⁺ (8,0 – 9,4)
	11	3 6,4% (4,2 – 8,2)	0 1,6% (0,48 – 2,2)	33 54,8% (51,5 – 61,5)	21 35,5% (31,3 – 39,5)	3 6,4% (4,1 – 8,2)	60 7,43% ⁺ (6,8 – 8,0)
	12	5 3,6% (2,6 – 4,5)	5 3,6% (2,6 – 4,5)	68 42% (39,5 – 44,6)	56 37,7% (32,3 – 37,2)	28 17,7% (15,5 – 19,6)	162 19,78% ⁺ (18,9– 20,8)
Total	33 4,1% (3,6 – 4,6)	14 1,8% (1,5 – 2,1)	420 51,27% (50,0 – 52,4)	260 31,78% (30,7 – 32,8)	92 11,33% (10,5 - 12,0)	819	

*frecuencia absoluta; **frecuencia relativa o prevalencia dentro de la comuna; ***Región de credibilidad; +frecuencia calculada relativa al total; color “rojo”= comunas que muestran las diferencias según la prueba post-hoc.

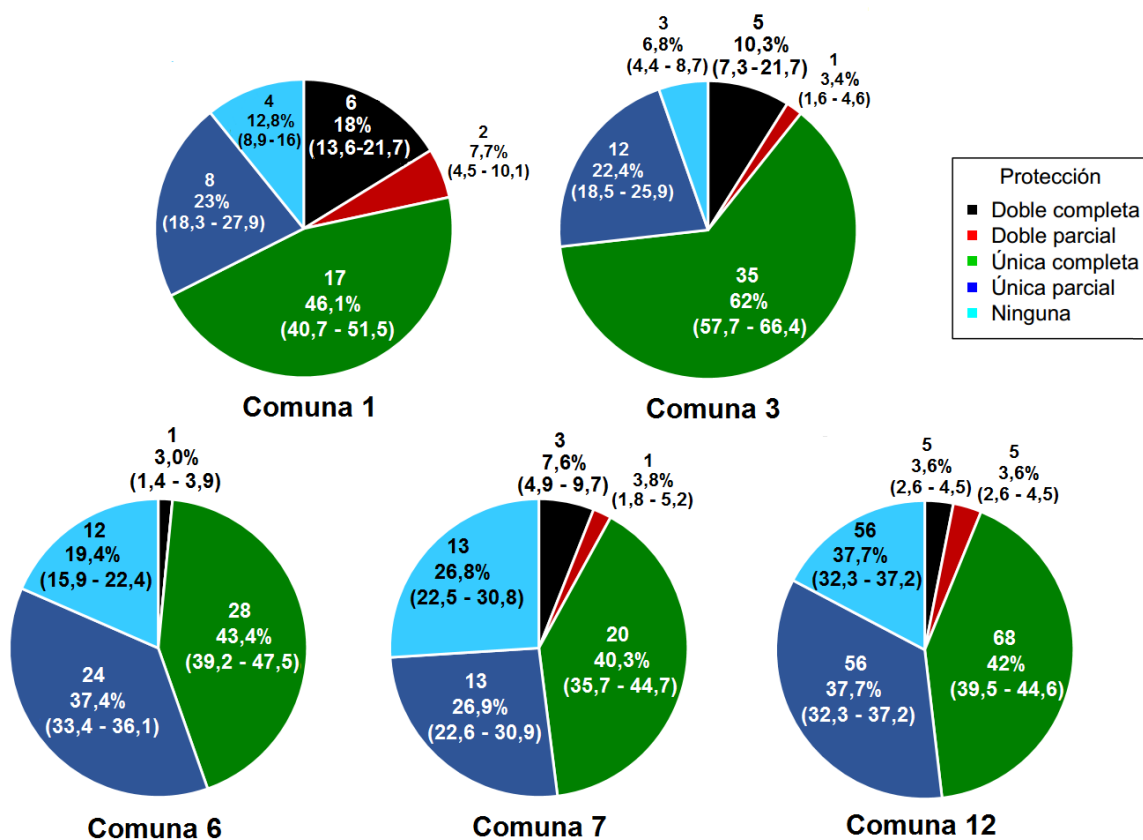


Figura 5. Gráfico de tortas de las 12 comunas de Buenaventura respecto a los cinco niveles de protección.

6.4.3 Comparación con otras poblaciones de Colombia

Al realizar las pruebas de diferenciación poblacional y de homogeneidad para la población de Buenaventura respecto a las reportadas en Colombia para los genes Duffy y HbS se encontró lo siguiente: para el gen Duffy, la población de este estudio es significativamente diferente en cuanto a la distribución de las frecuencias genotípicas de la población de Buenaventura ($p=0,0001$) y Tierra alta ($p<0,0001$) reportadas por Vallejo y colaboradores (2015), distinta a la población de la Italia, corregimiento de Chocó, reportada por Gonzáles

y colaboradores (2012). Sin embargo, la población de estudio no fue diferente con respecto a la población de Tumaco ($p \geq 0,5751$) reportada por Vallejo (2015) (tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen Duffy de distintas poblaciones Colombianas.

Población	Genotipo						Equilibrio H-W (valor p)
	FYB ^{ES} /FYB ^{ES} (%)	FYA/FYA (%)	FYB/FYB (%)	FYA/FYB (%)	FYA/FYB ^{ES} (%)	FYB/FYB ^{ES} (%)	
Buenaventura-Valle ^a (n=819)	55,80	2,69	2,44	5,98	18,93	14,16	0,0000
Buenaventura-Valle ^b (n=437)	56,60	8,50	2,80	7,50	14,20	10,40	0,0000
Tumaco - Nariño ^b (n=460)	53,60	4,10	2,10	5,20	21,60	13,40	0,0049
Tierra alta - Córdoba ^b (n=272)	3,00	24,20	15,20	29,30	10,10	18,20	0,0007
La Italia - Chocó ^c (n=318)	16,04	15,41	18,87	48,11	0,94	0,63	0,0000
Frecuencias alélicas (%)				FYA	FYB	FYB ^{ES}	
	Buenaventura actual			15,32	13,00	71,67	
Buenaventura rural			19,35	11,75	68,90		
Tumaco			17,50	11,40	71,10		
Tierra alta			43,90	38,95	17,15		
Chocó			18,50	25,50	56,00		

^aEstudio actual; ^bVallejo et al. 2012; ^cGonzález et al. 2012.

Para el gen HbS, se encontró que la población de Buenaventura de este estudio es marcadamente diferente en sus frecuencias genotípicas respecto de la población de Cali (Valle), reportada por Satizabal y colaboradores (2013) más no para las demás poblaciones reportadas en Colombia como Buenaventura, San Andrés y Providencia, Cartagena (Alvear et al., 2012; De Bernal et al., 2010; Bernal et al., 1995; Silva et al., 1998).

Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen HbS de distintas poblaciones colombianas

Población	Genotipo			Frecuencias alélicas (%)		Equilibrio H-W (valor p)
	AA (%)	AS (%)	SS (%)	A	S	
Buenaventura – Valle ^a (n=819)	93,89	5,98	0,12	96,89	3,11	0,5537
Buenaventura – Valle ^b (n=242)	92,98	7,02	0,00	96,49	3,51	1,0000
Buenaventura – Valle ^c (n=372)	94,89	5,11	0,00	97,45	2,55	1,0000
San Andrés y Providencia ^d (n=544)	93,01	6,80	0,18	96,42	3,58	0,5064
Cartagena – Bolívar ^e (n=230)	92,17	6,96	0,87	95,65	4,35	0,0581
Cartagena – Bolívar ^f (n=1711)	95,44	4,56	0,00	97,72	2,28	1,0000
Cali - Valle (n=10000)	97,59	2,40	0,01	98,79	1,21	1,0000

^aEstudio actual; ^bMoyano & Méndez, 2005; ^cDe Bernal et al., 2010; ^dBernal, et al. 1996; ^eSilva et al. 1998; ^fAlvear et al., 2012

6.5 DISCUSIÓN

Como muestran las pruebas de independencia y regresión, las variables edad (por categorías) y comuna parecen estar relacionadas o influenciando de alguna manera el patrón de los diagnósticos moleculares de las mutaciones en los genes HbS y Duffy, así como la combinación de estos en la variable “protección”. Con respecto a la edad, tal como lo mostró la prueba de diferenciación poblacional y como se puede apreciar en la figura 4, el grupo de edades de 13 a 26 años presenta una distribución diferente en cuanto a las categorías de la variable protección respecto a los otros grupos de edad. En este grupo en particular, se

observa como la frecuencia de ambos genotipos que confieren la resistencia de la infección malárica (AS y FYB^{ES}/FYB^{ES}) se encuentran en su frecuencia más alta (figura 4), además de presentar una mayor proporción de la categoría “doble protección” y “doble protección parcial” y una disminución de la categoría “ninguna protección”, comparado a los otros grupos de edad. Así que se podría afirmar que este grupo muestra una mayor proporción de mutaciones genéticas que le podrían conferir mayor resistencia a la infección malárica comparada con las otras edades o, en otras palabras: los otros grupos de edad, como los menores de 12 años y los mayores de 26 podrían ser más susceptibles a la infección por malaria. Para el Valle del Cauca y en particular Buenaventura, se han registrado los mayores casos de malaria principalmente en individuos de 15 a 45 años, pero la letalidad predomina en los mayores de 60 años y menores de 5 años (Fernández et al., 2009). Los diversos estudios reportados hasta el momento para la ciudad de Buenaventura, y demás zonas endémicas de malaria en el país, muestran que las tasas de infección de malaria incrementan con la edad, presentando las mayores tasas de infección en los adolescentes y adultos jóvenes, pero empieza a disminuir en los adultos mayores (Fernández et al., 2009; Mendez & Carrasquilla, 1995; Mendez, et al., 2000). Este patrón ha sido asociado con factores de comportamiento de estos grupos de individuos, estando los jóvenes y adultos más expuestos por sus actividades laborales que en muchos casos incluye movilizarse por el área rural y de esta forma están más expuestos a la picadura del mosquito. Por otro lado, niños pequeños y adultos mayores, debido a sus actividades, generalmente se encuentran menos expuestos y presentan las frecuencias más bajas de infección (Mendez et al., 2000; Ortega et al., 2015). Sin embargo, y algo muy acorde a lo encontrado en este estudio, a pesar de que las edades de mayor tasa de infección han sido los adolescentes y adultos jóvenes, estos al parecer sobreviven más a

esta infección que aquellos individuos de otras edades (Fernández et al., 2009), sobre todo más que los menores de 5 años quienes representan aproximadamente el 70% de las muertes por malaria en el mundo (WHO, 2017). Lo anterior apoya aún más la hipótesis de que este grupo en particular manifiesta menor mortandad debido las mutaciones genéticas de resistencia estudiadas. Hay que recordar que el hecho de portar el genotipo AS no implica que el individuo no vaya a infectarse por el *Plasmodium falciparum* y adquirir la enfermedad. La resistencia que confiere este genotipo va enfocada a cómo el organismo hace frente a la enfermedad: los individuos AS pueden contraer la malaria, pero sus eritrocitos presentan menores tasas de infección que aquellos de individuos sin el rasgo; presentan menor incidencia de las dos formas de malaria grave: malaria cerebral y la malaria con anemia severa; y por ende, los individuos heterocigotos rara vez mueren de malaria (Luzzatto, 2012; Olumese et al., 1997). Por otro lado, los individuos Duffy negativo tampoco están exentos de sufrir infección de *Plasmodium vivax*, al parecer han surgido cepas de este parásito que tienen la capacidad de invadir los eritrocitos por una vía distinta a la del antígeno Duffy (Ménard et al., 2010; Russo et al., 2017). Sin embargo, son casos que han sido asociados a la inmunidad de grupo: al aparecer gran cantidad de individuos Duffy negativos pueden actuar de manera similar a la inmunidad colectiva para reducir la transmisión y, en consecuencia, proteger a los individuos Duffy positivos de la *malaria vivax*. Por otro lado, en poblaciones con altas frecuencias de Duffy positivos, el *P. vivax* tiene una mayor oportunidad de invadir los eritrocitos Duffy-negativos, además de haber pasado por todo el reservorio de proteínas receptoras eritrocíticas de los individuos que le permiten optimizar su infección (Zimmerman et al., 2013). Así que, tener genotipos de “resistencia” no hace al individuo inmune de adquirir la enfermedad, pero está relacionada con cómo enfrenta el organismo el desarrollo

de esta, sin olvidar la protección o inmunidad de grupo que confiere a una población presentar altas frecuencias de estos genotipos. Hacen falta estudios que dilucidan si en la población está ocurriendo la infección de *P. vivax* exclusiva en individuos Duffy negativos en Buenaventura, porque en al menos lo reportado hasta el momento en población mestiza, afro e indígena del Chocó, solo se encontró la población de *P. vivax* en individuos Duffy positivos (González et al., 2012).

Ahora, las comunas con una mayor prevalencia de individuos con genotipos de protección respecto a las otras categorías fueron la 1 y 3, en contraste, las comunas con mayor prevalencia de genotipos sin protección fueron la 6, 7 y 12. Los reportes entre 1987 y 1993 muestran que las comunas con menores tasas de morbilidad malárica han sido la 1, 2, 3, 4 y 5 (Mendez & Carrasquilla, 1995), manteniéndose la 1, 4 y 5 como las comunas con menores tasa de infección en el 2016 y 2017 (Perea, 2016, 2017). Estas comunas se ubican en la zona insular de la Buenaventura urbana, la zona más antigua de la ciudad, en sus inicios conocida como la Isla Cascajal (Pérez, 2007). Al parecer estas comunas por su antigüedad han tenido mayor tiempo para que la selección trabaje en sus habitantes para adaptarse mediante genotipos que confieren resistencia a la malaria, como lo son el HbS y Duffy (la acción de selección sobre esta población se discutirá con mayor detalle en el capítulo II de este documento). Los encontrado en este estudio concuerda con lo ya mencionado ya que las comunas con mayor porcentaje de individuos con “doble protección” se encontraron en esa zona insular: las comunas 1 y 3, con 18% y 10,3%, respectivamente. La comuna 5 por su parte fue la que presentó mayor porcentaje de individuos con “única protección completa” con 62,9% (figura 4).

Por otro lado, las comunas con una mayor prevalencia de individuos “sin protección” fueron las 6, 7, 10 y 12 con prevalencias de 19,4%, 26,8%, 17,7% y 13,6% respectivamente (figura 5). Esto fue concordante con lo obtenido en el análisis post-hoc del análisis de varianza, donde estas comunas marcaron la significancia obtenida del análisis total. Entre 1987 y 1993 en la zona urbana de Buenaventura, los mayores casos de morbilidad malárica se reportan en las comunas 9, 10 y 12, (Moyano & Méndez, 2005). En el 2016 estas tres comunas siguieron siendo las más afectadas, al igual que en el 2017, a excepción de la comuna 9 que salió de este grupo para ser reemplazada por la comuna 11 (Perea, 2016, 2017). Situación opuesta a las comunas con las tasas más bajas de infección, estas últimas corresponden geográficamente a la zona continental de la Buenaventura urbana, y que al parecer es la zona que desde hace 30 años o más está siendo la más afectada en cuanto a casos de infección malárica, sobretodo la comuna 12, la cual representa casi el 20% de la población urbana. Hace 17 años se le atribuyó esta vulnerabilidad en cuanto a infección malárica, al hecho de ser comunas con alta proporción de necesidades básicas insatisfechas, alta densidad de bosque, y donde existen focos naturales del mosquito (Olano et al., 1997). Y aunque se han implementado factores de protección y prevención por parte de la comunidad, que al parecer han afectado positivamente estas tasas de infección y mortandad de malaria (Alvarado et al., 2006), las estadísticas indican que estas comunas fueron y continúan siendo las más vulnerables en cuanto a contraer infección malárica, y no solo por factores humanos y sociales, sino porque genéticamente, según lo encontrado en este estudio, son las que presentan menor frecuencia en cuanto a genotipos de protección, tanto para malaria vivax como la malaria falciparum (Perea, 2016, 2017). Así que sería oportuno priorizar sobre estas comunas al

momento de llevar a cabo estudios epidemiológicos y campañas de prevención y atención de salud sobre paludismo en la zona urbana de la ciudad de Buenaventura.

Con respecto a la prueba de diferenciación poblacional, el hecho de haber encontrado a la población de Buenaventura con una distribución de frecuencias genotípicas diferente a la población de Buenaventura de Vallejo y colaboradores (Vallejo et al., 2015), da un indicio de que la población urbana no puede equipararse a la rural al menos con respecto al sistema Duffy. La población rural de Buenaventura de estos autores estuvo compuesta por los corregimientos de Punta Soldado, Zacarias y La Delfina, y este último, especialmente fue el que mostró la mayor frecuencia de Duffy positivo (explicado quizás por el alto componente indígena de la zona) cambiando así la distribución de frecuencias con el incremento del alelo FYA y la frecuencia del genotipo FYA/FYA en la población (tabla 6). Caso similar ocurre con la población de Tierra Alta (Córdoba) y la Italia (Chocó), las cuales muestra frecuencias genotípicas del gen Duffy completamente diferentes a las otras poblaciones y esto se evidencia por su frecuencia significativamente alta de Duffy positivo, tanto para el alelo FYA como FYB, lo cual se le atribuye a su alta mezcla con población indígena y bajos patrones de migración de afrodescendientes (Vallejo et al., 2015).

Referente al gen HbS, las frecuencias genotípicas de la población de Buenaventura de este estudio no fueron significativamente distintas a las de otras poblaciones (tabla 7) exceptuando la población de Cali (Satzíbal et al., 2013) lo que concuerda ya que, de todas las poblaciones reportadas, esta es la que presenta menor porcentaje de población afrodescendiente (aproximadamente 40%) y por tanto menor frecuencia de alelo HbS que las

demás. Con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg, todas las poblaciones comparadas respecto a este alelo no presentaron desviación del equilibrio H.W (tabla 7). Contrario al gen Duffy, donde ninguna población de las reportadas, incluyendo la de este estudio, se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Esto último es el primer indicio de algún proceso de cambio de frecuencia génica puede estar influyendo, ya que las frecuencias alélicas y genotípicas no están siendo constantes a través de las generaciones (esto se discutirá en mejor detalle en el siguiente capítulo de este documento).

6.6 CONCLUSIONES

- 6.6.1 Los adolescentes y adultos jóvenes están presentando mayor porcentaje de genotipos de resistencia a la infección malárica en la ciudad de Buenaventura, al igual que las comunas 1 y 3 pertenecientes a la zona insular y más antigua de la Isla.
- 6.6.2 Los menores de 12 años y mayores de 26 podrían ser más susceptibles a la infección por malaria a causa de su baja frecuencia en genotipos de resistencia, al igual que las comunas 6, 7, 10 y 12 correspondientes a la zona continental de la ciudad.
- 6.6.3 La población urbana no se puede equiparar completamente a la población rural de Buenaventura para el gen Duffy debido a la diferencia en sus frecuencias alélicas y genotípicas, conferido en gran parte a la gran proporción de población indígena que habita la zona rural.

7. CAPITULO II

EVALUACIÓN DE SELECCIÓN NATURAL SOBRE LOS GENES DUFFY Y HEMOGLOBINA S EN UNA MUESTRA POBLACIONAL DE BUENAVENTURA

7.1 RESUMEN

La malaria es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y ha sido sugerida como el tipo más potente de selección en los seres humanos. En regiones de población afrodescendiente y donde la malaria es endémica, se ha encontrado altas frecuencias de polimorfismos que confieren resistencia a la malaria, algunos de los cuales muestran interacciones, tanto positivas como negativas, entre sí. El objetivo de este capítulo fue evaluar la acción de selección, tanto individual como conjunta, de los genes HbS y Duffy, los cuales proporcionan resistencia a la infección del *P. falciparum* y *P. vivax*, en la población urbana de Buenaventura. Se analizaron 819 individuos en un muestreo aleatorio estratificado en cada una de las 12 comunas de la ciudad. El análisis molecular se realizó por PCR-RFLP y se llevaron a cabo análisis de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento, neutralidad, correlaciones y cálculo de coeficientes de selección y *fitness* mediante los programas Arlequin 3.5.2.2 y R 3.4.1. La población en general mostró neutralidad y equilibrio Hardy-Weinberg para el gen HbS, mas no para el gen Duffy, siendo los genotipos FYA/FYB, FYA/FYB^{ES} y FYB/FYB^{ES} responsables de esta desviación. Se encontró desequilibrio de ligamiento entre el locus HbS y la región promotora del gen Duffy,

un aumento de *fitness* de la combinación genotípica AS*FYBES/FYBES sobretodo en los adolescentes y adultos. Además de una fuerte correlación entre estos genotipos ($Rho=90\%$, $p=0,001$) y un comportamiento similar de cambio de frecuencias en las distintas edades, evidenciando una posible acción de selección conjunta para estos dos alelos (coadaptación) o epistasia para *fitness*. En este capítulo se presenta evidencia de la acción selección natural en las frecuencias alélicas de los genes HbS y Duffy en la población urbana de Buenaventura, selección que, según lo evidenciado, depende mucho de la estratificación de la población por rangos de edad.

Palabra clave: Buenaventura, selección, malaria, *fitness*, coadaptación.

7.2 OBJETIVOS

7.2.1 Objetivo general

Evaluar la acción de selección natural para los genes Duffy y HbS en la población de Buenaventura.

7.2.2 Objetivos específicos

7.2.2.1 Verificar si la frecuencia de los genotipos del gen Duffy y HbS se mantiene en equilibrio Hardy- Weinberg o presenta algún tipo de variación.

7.2.2.2 Evaluar el desequilibrio de ligamiento y neutralidad en los genes Duffy y HbS y calcular los respectivos coeficientes de selección y *fitness* para estos genes.

7.2.2.3 Calcular si existe correlación entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los genes HbS y Duffy, y si estos genotipos de resistencia en conjunto contribuyen a mejorar el *fitness*, o por el contrario, no hay evidencia de interacción entre ellos.

7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

7.3.1 Población, tipo de estudio y diagnóstico molecular.

La población, tipo de estudio, diagnóstico molecular y la base datos son los mismos propuestos en el capítulo I. Los análisis de los datos son diferentes, y se describen a continuación.

7.3.2 Análisis de datos

7.3.2.1 Diferenciación poblacional, equilibrio Hardy-Weinberg y test de neutralidad

Se llevó a cabo la prueba exacta de diferenciación poblacional de Raymond y Rousset (1995) donde se evaluó cada uno de los genes para los tres rangos de edad trabajados en el capítulo I. El equilibrio Hardy-Weinberg se evaluó para cada gen en particular, para la población total y cada grupo de edad (grupo 1: 8 meses a 12 años; grupo 2: 13 a 26 años; grupo 3: 27 a 93 años). Además, se evaluó la desviación de la neutralidad de los distintos loci a estudiar mediante la prueba de neutralidad de Ewens-Watterson (1972) y la prueba Chakraborty

(1990). Todas las pruebas mencionadas se llevaron a cabo con el paquete estadístico Arlequin versión 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

7.3.2.2 Desequilibrio de ligamiento, correlación y coeficientes de selección.

El desequilibrio de ligamiento se calculó con el paquete Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) teniendo en cuenta los loci de ambos genes (tabla 8). Mediante el software R 3.4.1 (R Core Team, 2017) se calculó el coeficiente de correlación de *Sperman* entre los alelos S (gen HbsS) y FYB^{ES} (gen Duffy), y los dos genotipos principales de la resistencia a la malaria: el FYB^{ES}/FYB^{ES} y el heterocigoto AS, así como la correspondencia de estos genotipos a la edad de los individuos, graficando y calculando líneas de tendencia con sus respectivos coeficientes de determinación. Para los distintos análisis mencionados se usó un valor de 0.05 como máximo error tipo I aceptado.

Tabla 8. Descripción de los tres loci de estudio.

	Gen	Alelos	Locus
	HbS	A/S	1
Duffy	Región promotora	C/T	2
	GATA		
	Región codificante	A/G	3
	DARC		

Los valores de *fitness*, coeficientes de selección y excesos promedios fueron calculados para cada gen por separado, para ambos en conjunto y teniendo en cuenta los tres grupos de edad. Teniendo así tres comparaciones diferentes: 1) grupo 1 vs. 2, 2) grupo 1 vs. 3; y 3) grupo 2

vs. 3. El valor de *fitness* correspondió al cociente de las frecuencias del grupo de mayor edad vs, el de menor edad, y fueron reportados relativos al genotipo de mayor valor de *fitness*. Los coeficientes de selección se calcularon como la diferencia de la unidad a cada valor de *fitness* (los coeficientes alélicos se reportan relativos al mayor). Los excesos promedios se calcularon según la siguiente ecuación (Templeton, 2006):

$$a_A = \frac{z_{AA} (w_{AA} - \bar{w}) + \frac{1}{2}z_{Aa} (w_{Aa} - \bar{w})}{p}$$

Donde a_A es el exceso promedio del *fitness* del alelo A; z_{AA}/p y $\frac{1}{2}z_{Aa}/p$ son la probabilidad condicional de encontrar un gameto portador en los genotipos AA y Aa, respectivamente; w_{AA} y w_{Aa} son los valores de *fitness* del genotipo AA y Aa, respectivamente y \bar{w} es el *fitness* promedio de la población.

También se calculó el *fitness* para cada uno de los dos genes, HbS y Duffy, con el promedio ponderado de cada *fitness* de los distintos genotipos en las distintas comparaciones de grupos de edad. Finalmente se evaluó el aporte de cada combinación genotípica del gen HbS junto con el gen Duffy calculando las diferencias en *fitness* para cada combinación genotípica restándole a estas el producto del *fitness* individual de cada genotipo.

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Equilibrio Hardy – Weinberg, test de neutralidad y desequilibrio de ligamiento.

Al analizar los diferentes grupos de edad tratados en el capítulo I para cada uno de los genes, se encontraron diferencias significativas para el gen HbS, más no para el gen Duffy, sin embargo, se decidió tener en cuenta los tres grupos de edad en los diferentes análisis para ambos genes. En general, la población se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg, para el gen HbS y la región codificante DARC del gen Duffy ($p=0,5515$ y $p=0,2251$ respectivamente), más no para la región promotora GATA del gen Duffy ($p\leq 0,000$) (tabla 9). Por lo anterior, se calcularon valores de probabilidad mediante la prueba χ^2 para determinar cuales eran los genotipos que estaban aportando a dicho desequilibrio H-W en el gen Duffy, encontrando a los genotipos FYA/FYB, FYA/FYB^{ES} y FYB/FYB^{ES} responsables de esta desviación (tabla 10). Las pruebas de neutralidad de Ewens-Watterson ($p=0.6850$) y Chakraborty ($p=0.3386$) no presentaron desviación de la neutralidad, es decir, los tres loci analizados podrían ser considerados como neutrales.

Tabla 9. Equilibrio Hardy-Weinberg para los tres locus de estudio de la población de Buenaventura.

Población	Heterocigosidad Observada (%)			Heterocigosidad Esperada (%)			Probabilidad H-W		
	L1*	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
8 meses - 12 años	2,6	41,6	27,3	2,6	41,5	26,4	1,0000	1,0000	1,0000
13 - 26 años	12,4	33,8	22,1	12,9	37,8	25,8	0,5047	0,2691	0,0999
27 - 93 años	5,4	30,9	24,3	5,3	40,9	25,5	1,0000	0,0000	0,2956
Población total	5,9	33,5	24,8	6,0	40,6	25,9	0,5515	0,0000	0,2251

*L= locus; color rojo= valores significativos ($p\leq 0,005$)

Tabla 10. Valores esperados para el gen Duffy en la población de 27 a 93 años.

Genotipo	FYB^{ES}/FYB^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB^{ES}	FYB/FYB^{ES}	Total
F. Observada	278 (55,94)*	14 (2,82)	14 (2,82)	37 (7,44)	84 (16,9)	70 (14,8)	497
F. Esperada	254 (51,2)	11 (2,25)	9 (1,84)	20 (4,07)	106 (21,41)	96 (19,4)	
Probabilidad	0,1250	0,3967	0,1105	0,0002	0,0297	0,0071	0,000

* frecuencia relativa (%); color rojo= valores significativos ($p \leq 0,005$)

En general, la población se encontró en desequilibrio de ligamiento para el locus 1 (mutación HbS) respecto al 2 (región promotora del gen Duffy) y el 1 respecto al 3 (región codificante), al igual que para el grupo de 27 a 93 años. Los demás grupos de edad no presentaron desequilibrio de ligamiento en estos grupos de locus (tabla 9). Se debe tener en cuenta que es de esperar que el locus 2 respecto al 3 siempre muestren desequilibrio de ligamiento, porque se trata de la región promotora y codificante del gen Duffy, respectivamente (por eso estas probabilidades no se señalan en rojo en la tabla 11).

Tabla 11. Desequilibrio de ligamiento para las diferentes combinaciones de los tres locus de estudio de la población de Buenaventura.

Población	Probabilidad DL		
	L1 vs. L2 (DE*)	L1 vs. L3 (DE)	L2 vs. L3 (DE)
8 meses - 12 años	0,5080 (0,0050)	1,0000 (0,000)	0,0000 (0,000)
13 - 26 años	0,2165 (0,0043)	0,1221 (0,0027)	0,0000 (0,000)
27 - 93 años	0,0022 (0,0004)	0,0515 (0,0022)	0,0000 (0,000)
Total	0,0020 (0,0000)	0,0030 (0,0000)	0,0000 (0,000)

*DE= Desviación estándar; color rojo= valores significativos ($p \leq 0,005$)

7.4.2 Correlaciones genotípicas y alélicas

Al realizar la correlación de los genotipos y de los alelos para ambos genes, se encontró una correlación positiva ($Rho=0,9$) y significativa ($p=0,001$) entre los genotipos AS y FYB^{ES}/FYB^{ES} (tabla 12), que al graficarse presentó una línea de tendencia polinómica de orden 4 y un índice de determinación del 98% (figura 6-a). En contraste, no se encontró correlación significativa para el genotipo AS con los otros genotipos del gen Duffy (tabla 12). En cuanto a las correlaciones alélicas, se encontró una correlación positiva significativa para los alelos S y FYB^{ES} ($Rho= 0,843$, $p=0,004$) y una gráfica con tendencia lineal y un índice de determinación del 77% (figura 6-b). Por otro lado, al graficar los genotipos AS y FYB^{ES}/FYB^{ES} con respecto a la edad de los individuos, se encontraron gráficas muy similares, con línea de tendencia de tipo polinómica de orden 6. Para ambos genotipos, se puede apreciar un descenso en la frecuencia en los primeros años de vida, teniendo la frecuencia más baja alrededor de los 8 años. De ahí se observa un aumento en la frecuencia a la edad de 10 años y un pico de frecuencia máxima alrededor de los 15 años. Luego ocurre una disminución de la frecuencia del genotipo, que luego se eleva ligeramente a partir de los 30 años (este incremento se hace menos marcado en el genotipo AS). Finalmente, ambos genotipos estabilizan sus frecuencias partir de los 45 años (figura 7).

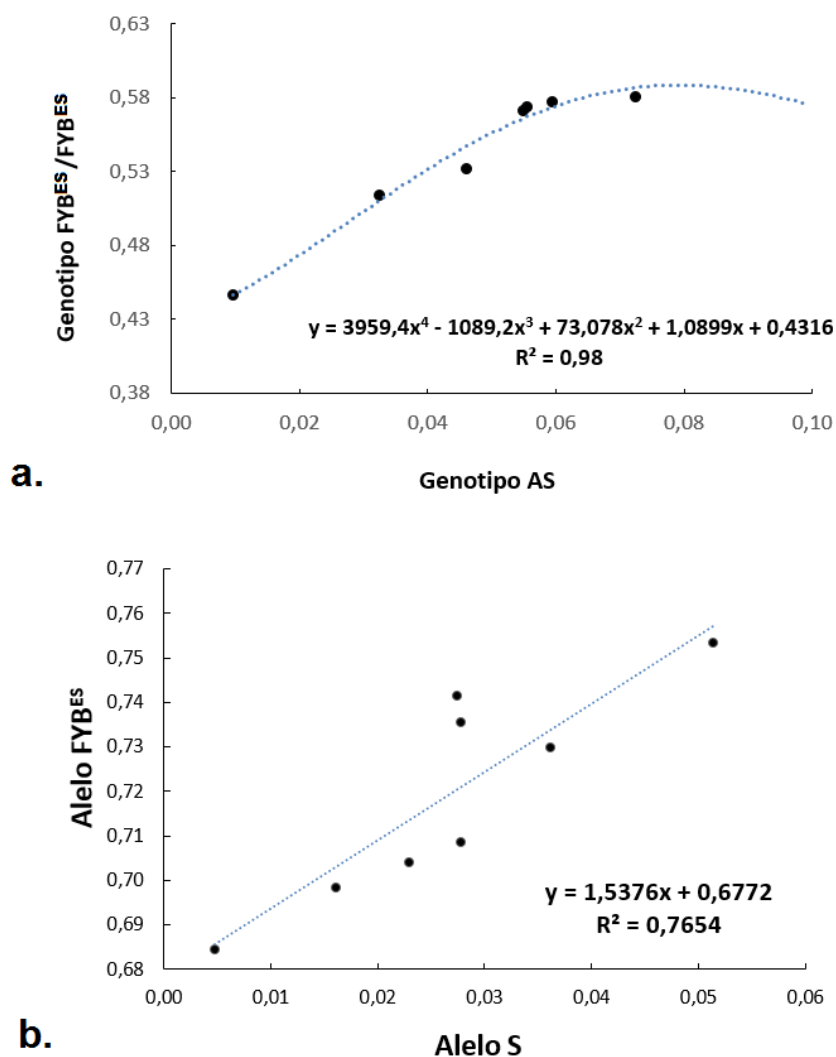


Figura 6. a) Correlación de los genotipos FYB^{ES}/FYB^{ES} y AS. b) Correlación de los alelos FYB^{ES} y S (el punteado azul en ambas gráficas corresponde a la línea de tendencia que mejor se ajusta a los puntos).

Tabla 12. Correlaciones genotípicas y alélicas para el gen HbS vs. el gen Duffy

		FYB^{ES}/FYB^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB^{ES}	FYB/FYB^{ES}
Genotipos	AS	0,900*	0,536	0,000	-0,435	-0,552	-0,268
		0,001**	0,137	1,000	0,242	0,123	0,486
		FYB^{ES}	FYA	FYB			
Alelos	S	0,843	-0,166	-0,592			
		0,004	0,670	0,093			

*Coeficiente de correlación de Spearman; **probabilidad; color rojo= valores significativos ($p \leq 0,005$)

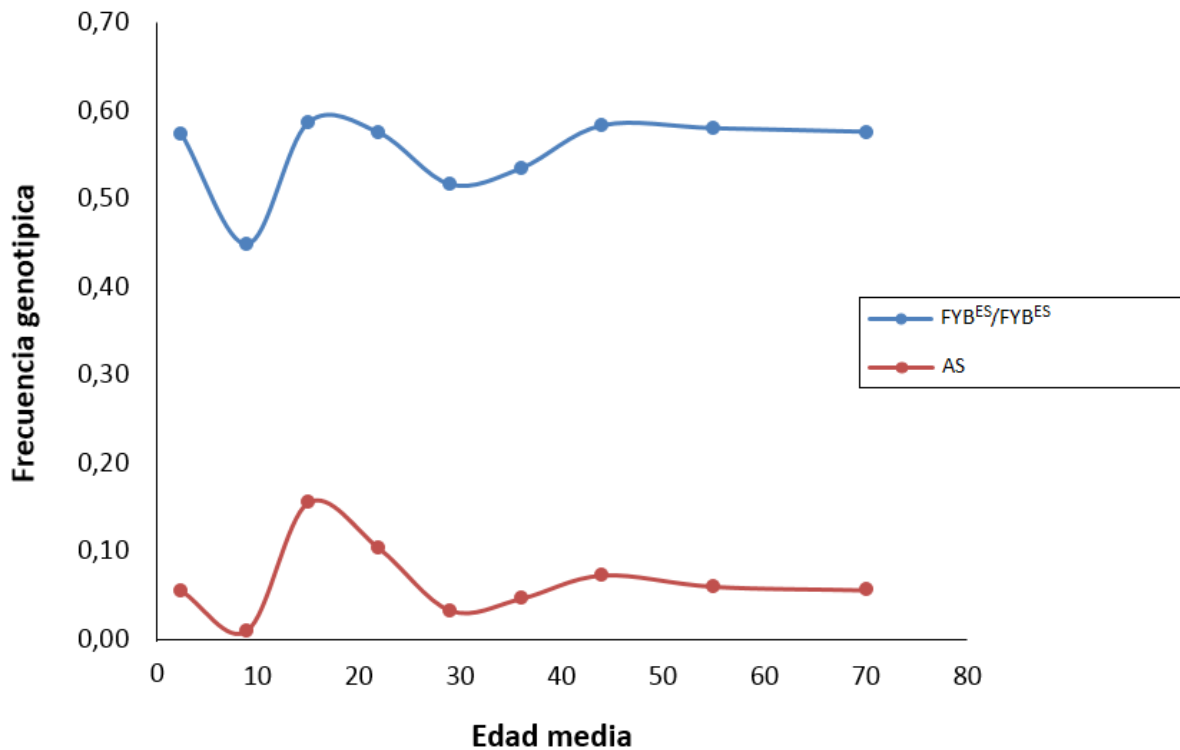


Figura 7. Grafica de los genotipos de protección FYB^{ES}/FYB^{ES} (color azul) y el genotipo AS (color rojo) respecto la edad.

7.4.3 *Fitness*, coeficientes de selección y excesos promedios

Los valores de *fitness*, coeficientes de selección y excesos promedios fueron calculados para cada gen por separado, para ambos al tiempo y teniendo en cuenta los tres grupos de edad. Cuando se evaluaron los *fitness* para ambos genes a la vez, se encontró que tanto para la comparación 1 (grupo 1 vs 2) y la comparación 2 (grupo 1 vs. 3) el *fitness* más alto correspondió a la combinación $AS*FYB^{ES}/FYB^{ES}$ (tabla 13 y 14). La comparación 3 (grupos 2 vs 3) mostró una tendencia completamente distinta: el valor de *fitness* más alto fue para la

combinación AA*FYB/FYB, seguida de la AA*FYA/FYB (tabla 15). Para el gen HbS por separado se obtuvo que para las comparaciones 1 y 2 el heterocigoto AS tuvo *fitness* más alto, a diferencia de la comparación 3 donde el *fitness* más alto fue para el genotipo AA. Para el gen Duffy por separado el *fitness* más alto correspondió a los genotipos FYA/FYA y FYB^{ES}/FYB^{ES} en la comparación 1 (tabla 13); FYA/FYB, FYA/FYA y FYB/FYB para la 2 (tabla 14) y los genotipos FYA/FYB y FYB/FYB para la comparación 3 (tabla 15). El promedio ponderado de todas las combinaciones mostró los valores de *fitness* más alto para las combinaciones AA*FYB^{ES}/FYB^{ES}, AA*FYB/FYB y AA*FYA/FYB; los genotipos FYA/FYA, FYB/FYB, FYA/FYB para el gen Duffy y el genotipo AA para el gen HbS (tabla 16). Los valores más bajos de *fitness* para todas las comparaciones se encuentran marcados en rojo en las diferentes tablas (se debe tener en cuenta que los valores de *fitness* de 0,000 no se encuentran en rojo porque corresponde a combinaciones que no se encontraron en ningún individuo).

Con respecto a los coeficientes de selección alélicos, para las tres comparaciones, incluyendo el promedio ponderado, siempre los coeficientes más altos correspondieron a los alelos S, FYA y FYB y los más bajos para el alelo A y FYB^{ES}. Los excesos promedios en las tres comparaciones tuvieron valores tanto positivos como negativos para todos los alelos en todas las comparaciones.

Tabla 13. Valores de *fitness* y coeficientes de selección para la comparación N° 1: grupo 1 vs. 2 (8 meses a 12 años vs. 13 a 27 años).

Genotipo	FYB ^{ES} /FYB ^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB ^{ES}	FYB/FYB ^{ES}	Solo HbS
	<i>Fitness</i> [*] <i>CS</i> ^{**}	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>
AA	0,200	0,400	0,067	0,114	0,149	0,119	0,189
	0,800	0,600	0,933	0,886	0,851	0,881	-0,811
AS	1,000	0,000	0,200	0,000	0,400	0,500	1,000
	0,000	1,000	0,800	1,000	0,600	0,500	0,000
SS	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
	0,800	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-0,999
Solo Duffy	0,560	1,000	0,333	0,286	0,400	0,362	
	0,440	0,000	0,667	0,724	0,600	0,638	

Coefficientes de selección alélicos: FYB^{ES}= 0,000 FYA= 0,804 FYB= 0,870 A= 0,117 S= 0,602

Exceso promedio: FYB^{ES}= 0,024 FYA= -0,676 FYB= -0,708 A= -0,003 S= 0,712

Fitness promedio del gen: HbS= 0,794 Duffy= 0,561

*Colores de *fitness*: azul= fitness del genotipo de referencia o “más favorecido”; morado= valores más altos de fitness; rojo= valores más bajos de fitness **CS= Coeficientes de selección

Tabla 14. Valores de *fitness* y coeficientes de selección para la comparación N° 2: grupo 1 vs. 3 (8 meses a 12 años vs. 27 a 63 años).

Genotipo	FYB ^{ES} /FYB ^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB ^{ES}	FYB/FYB ^{ES}	Solo HbS
	<i>Fitness</i> [*] <i>CS</i> ^{**}	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>
AA	0,353	0,467	0,433	0,514	0,234	0,248	0,470
	0,647	0,533	0,567	0,486	0,766	0,752	-0,530
AS	1,000	0,000	0,100	0,100	0,200	0,150	1,000
	0,000	1,000	0,900	0,900	0,800	0,850	0,000
SS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-1,000
Solo Duffy	0,701	0,883	0,883	1,000	0,454	0,457	
	0,299	0,117	0,117	0,000	0,546	0,543	

Continuación de la tabla 14....

Coefficientes de selección alélicos: $FYB^{ES}= 0,016$ $FYA= 0,698$ $FYB= 0,608$ $A= 0,000$ $S= 0,896$

Exceso promedio: $FYB^{ES}= 0,125$ $FYA= 0,021$ $FYB= 0,089$ $A= -0,009$ $S= 0,475$

Fitness promedio del gen: $Hbs= 0,983$ $Duffy= 0,710$

***Colores de fitness:** azul= fitness del genotipo de referencia o el de fitness más alto; morado= valores altos de fitness; rojo= valores más bajos de fitness; **CS= Coeficientes de selección

Tabla 15. Valores de *fitness* y coeficientes de selección para la comparación N°3: grupo 2 vs. 3 (13 – 27 años vs. 27 – 93 años).

Genotipo	FYB^{ES}/FYB^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB^{ES}	FYB/FYB^{ES}	Solo HbS
	<i>Fitness*</i> <i>CS**</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>	<i>Fitness</i> <i>CS</i>
AA	0,272	0,179	1,000	0,692	0,243	0,322	1,000
	0,728	0,821	0,000	0,308	0,757	0,678	0,000
AS	0,154	0,000	0,077	0,077	0,077	0,046	0,402
	0,846	1,000	0,923	0,923	0,923	0,954	0,598
SS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Solo	0,358	0,252	0,757	1,000	0,324	0,360	
Duffy	0,642	0,748	0,243	0,000	0,676	0,640	

Coefficientes de selección alélicos: $FYB^{ES}= 0,076$ $FYA= 0,698$ $FYB= 0,608$ $A= 0,000$ $S= 0,979$

Exceso promedio: $FYB^{ES}= -0,047$ $FYA= 0,018$ $FYB= 0,108$ $A= 0,028$ $S= -0,616$

Fitness promedio del gen: $HbS= 0,954$ $Duffy= 0,405$

***Colores de fitness:** azul= fitness del genotipo de referencia o el de fitness más alto; morado= valores altos de fitness; rojo= valores más bajos de fitness; **CS= Coeficientes de selección

Tabla 16. Valores de *fitness* y coeficientes de selección promedio ponderado

Genotipo	FYB ^{ES} /FYB ^{ES}	FYA/FYA	FYB/FYB	FYA/FYB	FYA/FYB ^{ES}	FYB/FYB ^{ES}	Solo HbS
	<i>Fitness</i> * CS**	<i>Fitness</i> CS	<i>Fitness</i> CS	<i>Fitness</i> CS	<i>Fitness</i> CS	<i>Fitness</i> CS	<i>Fitness</i> CS
AA	0,291	0,338	0,590	0,509	0,221	0,253	0,629
	0,709	0,662	0,410	0,491	0,779	0,747	0,233
AS	0,659	0,000	0,150	0,031	0,270	0,317	0,761
	0,341	1,000	0,850	0,969	0,730	0,683	0,000
SS	0,037	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,963	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-1,000
Solo	0,537	0,653	0,728	0,864	0,392	0,400	
Duffy	0,463	0,347	0,272	0,136	0,608	0,600	

Coefficientes de selección alélicos: FYB^{ES}= 0,037 FYA= 0,35 FYB= 0,713 A= 0,022 S= 0,872

Exceso promedio: FYB^{ES}= 0,037 FYA= -0,113 FYB= -0,055 A= 0,007 S= 0,083

Fitness promedio del gen: HbS= 0,560 Duffy= 0,936

*Colores de *fitness*: azul= fitness del genotipo de referencia o el de fitness más alto; morado= valores altos de *fitness*; rojo= valores más bajos de *fitness*; **CS= Coeficientes de selección

Finalmente, se evaluó el aporte de cada combinación genotípica del gen HbS junto con el Duffy encontrando que la combinación genotípica AS*FYBES/FYBES incrementa el valor de *fitness* en cada comparación de grupo de edad que cuando se consideran el producto de los *fitness* por separado (tabla 17), algo que no se observó en las demás combinaciones, exceptuando la del genotipo AA junto con todos los genotipos del Duffy, mostrando que esta combinación también aportaba un incremento de *fitness*, pero solo considerando la comparación #1 (8 meses vs. 13 a 27 años). Para esta comparación también se encontró un incremento del *fitness* cuando se considera el alelo AS en conjunto con los heterocigotos del alelo FYB^{ES} (tabla 17).

Tabla 17. Aporte del *fitness* para cada combinación genotípica.

Genotipo	Comparación	AA			AS		
		Ind.*	Comb.**	Dif.***	Ind.	Comb.	Dif.
FYBES/FYBES	1	0,106	0,200	0,094	0,560	1,000	0,440
	2	0,374	0,353	-0,021	0,794	1,000	0,206
	3	0,890	0,272	-0,618	0,144	0,154	0,010
	Promedio	0,529	0,292	-0,238	0,490	0,662	0,172
FYA/FYA	1	0,189	0,400	0,211	1,000	0,000	-1,000
	2	0,470	0,467	-0,003	1,000	0,000	-1,000
	3	0,627	0,179	-0,448	0,101	0,000	-0,101
	Promedio	0,480	0,339	-0,141	0,641	0,000	-0,641
FYB/FYB	1	0,063	0,067	0,004	0,333	0,200	-0,133
	2	0,470	0,433	-0,037	1,000	0,100	-0,900
	3	1,882	1,000	-0,882	0,304	0,077	-0,227
	Promedio	0,958	0,590	-0,367	0,595	0,110	-0,485
FYA/FYB	1	0,054	0,114	0,060	0,286	0,000	-0,286
	2	0,533	0,514	-0,019	1,133	0,100	-1,033
	3	2,487	0,692	-1,795	0,402	0,077	-0,325
	Promedio	1,223	0,509	-0,714	0,680	0,072	-0,608
FYA/FYBES	1	0,076	0,149	0,073	0,400	0,401	0,001
	2	0,242	0,234	-0,008	0,514	0,200	-0,314
	3	0,807	0,243	-0,564	0,130	0,077	-0,053
	Promedio	0,436	0,221	-0,215	0,339	0,189	-0,150
FYB/FYBES	1	0,068	0,119	0,051	0,362	0,500	0,138
	2	0,243	0,248	0,005	0,517	0,150	-0,367
	3	0,896	0,322	-0,574	0,145	0,046	-0,099
	Promedio	0,471	0,253	-0,218	0,339	0,175	-0,164

*Ind= *fitness* “individual”; **Comb.= *fitness* “combinado”; ***Dif = diferencia “ind. – comb”.

7.5 DISCUSIÓN

La población general se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para el gen HbS, más no para el Duffy. Se encontró neutralidad para ambos genes y desequilibrio de ligamiento para estos. Una población grande con apareamiento aleatorio y que mantiene sus frecuencias genotípicas y alélicas constantes de generación en generación, se dice que está en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), a menos que existan fuerzas externas que cambien dicho equilibrio (Falconer & Mackay, 1996). Sin embargo, la población de Buenaventura de este trabajo claramente se encuentra estratificada por rangos de edad, y estos por tanto deben ser tenidos en cuenta al momento de los diferentes análisis. Así, cuando se calcula el equilibrio H-W para la población general la prueba no revelará discrepancias a menos que el efecto de la selección sea muy marcado, que es lo que podría estar ocurriendo en este caso para el gen HbS (Ortega et al., 2015).

Si la población de Buenaventura realmente estuviese en equilibrio H-W, los coeficientes de selección y *fitness* no deberían variar mucho al comparar los grupos de edad, y contrario a lo esperado, estos valores cambian en las distintas comparaciones (tablas 13, 14 y 15), variaciones que no se alcanzan a detectar si solo se observa la tabla del promedio de estos valores (tabla 16). Nuevamente, la población de Buenaventura está mostrando una clara estratificación para estos dos genes de resistencia a la malaria y no deberían calcularse valores de carácter evolutivo considerando solo la población total. Así que la población de Buenaventura, al menos para el gen HbS, estaría mostrando un equilibrio H-W general de la población, que realmente es un equilibrio de “fuerzas” o mejor conocido como polimorfismo balanceado: la selección natural favorece una frecuencia alélica intermedia debido a un

equilibrio estable de contribuciones de *fitness* positivos y negativos (Templeton, 2006). Lo anterior es debido a la naturaleza pleiotrópica antagónica del gen HbS (Carter & Nguyen, 2011): el gen mutado en heterocigosis genera resistencia a la malaria, y en homocigosis se genera la anemia de células falciformes. Lo encontrado en este estudio posiblemente evidencia que el gen HbS en la población general de Buenaventura está llegando a frecuencias cercanas a este equilibrio balanceado y las fuerzas que están actuando se compensan entre sí, haciendo comportar a este locus como si fuera neutral (Griffiths et al., 1999). Si se aplica la fórmula de la frecuencia de equilibrio para un gen letal recesivo $q_{eq} = \frac{s_1}{s_1 + s_2}$ (donde s_1 es el coeficiente de selección del genotipo AA y s_2 el del genotipo SS) en la población general de Buenaventura (sin tener en cuenta los estratos de edad) se obtiene un valor de 0,027, muy cercano al valor 0,031 del alelo S encontrado actualmente. Esto también explica porque la población no presenta desviación de la neutralidad según las pruebas de Ewens-Watterson y Chakraborty. El modelo de la neutralidad propone que la mayoría de variabilidad genética se mantiene por el efecto combinado de la presión de mutación y la deriva genética (Kimura, 1991). Pero la sobredominancia de este gen (que fue observada en las comparaciones 1 y 2) y que claramente involucra la acción de selección natural para el mantenimiento de sus frecuencias en las poblaciones humanas (Cavalli-Sforza & Bodmer, 1971; Eridani, 2011; Piel et al., 2010) muestra que, en efecto, este gen no es neutral. Sin embargo, el mayor indicio de que los alelos del locus HbS realmente no son neutrales son los valores de exceso promedio para esos, los cuales tienen un valor distinto de 0 en todas las comparaciones (tablas 13, 14 y 15). El exceso promedio es un valor matemático que enseña si la frecuencia de un alelo está o no siendo alterada por la selección natural, y a qué dirección está siendo alterada: exceso de promedio positivo indica que la frecuencia del

alelo incrementará, negativo que disminuirá y un valor de 0 que su frecuencia no está siendo afectado por la selección (Templeton, 2006). Entonces, al igual que el equilibrio Hardy Weinberg encontrado, la prueba de neutralidad en este caso está indicando que la población se comporta “como si fuera neutral”, y esto puede ser debido a que la población lleva mucho tiempo sometida a selección y está llegando al equilibrio balanceado en sus frecuencias, evidenciado además en que el *fitness* de todo el gen incrementa de 0,79 a 0,98 (tablas 13, 14 y 15), alcanzando valores cercanos a 1,00 que es donde teóricamente alcanzaría el equilibrio selectivo porque la población habría llegado a su valor máximo de *fitness* promedio (Fisher, 1930; Templeton, 2006).

Una historia un poco diferente parece estar mostrando el gen Duffy para sus frecuencias en la población de Buenaventura: como se mencionó anteriormente, la prueba H-W muestra desequilibrio en la población total, la cual se concentra principalmente en las edades adultas de 27 a 93 años (tabla 10). Y aunque la prueba de neutralidad al igual que para el HbS no mostró diferencias significativas, la dominancia del gen Duffy es parcial (no sobredominante como el otro gen) y la selección que opera sobre él es direccional positiva (Hamblin & Di Rienzo, 2000; Hodgson et al., 2014; McManus et al., 2017). En este caso, la selección no actúa para mantener un equilibrio balanceado en las frecuencias alélicas sino para llevar a la fijación al alelo FYB^{ES}, como ya ocurrió en la mayoría de poblaciones del África (Howes et al., 2011). Así que no se puede afirmar que este gen esté alcanzando el equilibrio en sus frecuencias alélicas como el HbS, no solo por lo obtenido en la prueba H-W y porque sus valores de exceso promedio son distintos de 0 (tablas 13, 14 y 15) sino por las fluctuaciones en los valores de *fitness* total del gen (variaciones de 0,56 a 0,71 y luego a 0,40 en las

comparaciones 1, 2 y 3 respectivamente). Ahora, el alelo FYB^{ES} mostró el menor valor de coeficiente de selección comparado a los otros alelos del gen Duffy, FYA y FYB, (en promedio 0,037) muy similar a los valores encontrados en otras poblaciones, incluso africanas (Hodgson et al., 2014; McManus et al., 2017), y aunque las frecuencias más altas se encontraron para el genotipo FYB^{ES}/FYB^{ES} , este no es el genotipo que muestra el mayor *fitness* en todas las comparaciones (cuando se considera el gen solo), así que algo más puede estar influenciando en sus frecuencias además de la selección en contra de la malaria vivax. Cuando se evaluó en detalle cuáles eran los genotipos de este gen que estaban aportando al desequilibrio, se encontró que el genotipo FYA/FYB se encuentra en frecuencias mayores a las esperadas (tabla 10), y los heterocigotos FYA/ FYB^{ES} y FYB/ FYB^{ES} en frecuencias menores a las esperadas (lo cual es consistente con la pérdida de heterocigosidad encontrada en este locus (tabla 9)). El fenómeno de migración podría explicar el porqué del incremento del genotipo FYA/FYB de menores a adultos, y también del incremento del *fitness* de este genotipo en los adultos (tablas 14 y 15): aunque en Buenaventura predomina la población afrodescendiente, ha habido bastante mezcla con otras etnias, incluyendo población indígena ubicada en la zona rural que presenta baja prevalencia de genotipo FYB^{ES} (Vallejo et al., 2015). El haber encontrado una disminución de las frecuencias de los genotipos FYA/ FYB^{ES} y FYB/ FYB^{ES} es contradictorio con lo reportado acerca del potencial del genotipo heterocigoto en la reducción de la adhesión del parásito al eritrocito llevado a cabo en Papua Nueva Guinea, población endémica para malaria vivax (Michon et al., 2001). Se plantea la hipótesis de que quizás esté ocurriendo algún mecanismo de antagonismo pleiotrópico (Carter & Nguyen, 2011) que involucre los genotipos heterocigotos de este sistema, no considerado por la literatura hasta el momento, donde la ventaja que confiere estos genotipos

solo se limita a la etapa de la niñez (cuando una infección de malaria puede llegar a ser mortal) y a los adolescentes y adultos jóvenes (los que presentan las mayores tasa de infección), más que en la edad adulta donde puede haber resistencia adquirida por parte del individuo a la infección malária (Doolan et al., 2009; Pinkevych et al., 2012). Así que al individuo adulto posiblemente no le representa una ventaja el poseer el genotipo Duffy negativo en estado heterocigoto teniendo en cuenta que aproximadamente la mitad de sus eritrocitos no estarían realizando el adecuado transporte y depuración de quimiocinas circundantes en el organismo: el sistema DARC es un regulador de casi todos los ligandos de quimiocina CC y CXC, por lo tanto, su antagonismo podría bloquear eficazmente la compleja red de quimiocinas preinflamatorias, relacionadas con enfermedades que competen a los adultos como artritis, artero esclerosis e incluso cáncer de próstata (Apostolakis et al., 2011; Lentsch, 2002; Novitzky-Basso & Rot, 2012; Smith et al., 2008).

Ahora, pese a las fuerzas selectivas de naturaleza distinta que operan sobre los genes HbS y Duffy, pareciera que juntos, estos genes se fortalecen: el mayor valor de *fitness* ocurre para la combinación genotípica AS*FYB^{ES}/FYB^{ES} (o también conocida como la variable “doble protección” del capítulo I de este documento) estando conformada por ambos genotipos de protección a los diferentes tipos de malaria que afectan a Buenaventura: la malaria falciparum y la malaria vivax (INS, 2017; Perea, 2016, 2017; Vallejo et al., 2015). En un estudio previo realizado en la misma muestra poblacional, se evidenció que la acción de selección para el gen HbS estaba ocurriendo a nivel de los adolescentes (Ortega et al., 2015) y lo encontrado esta investigación muestra que no solo se mantiene para este grupo de edad, sino para los adultos jóvenes, y que además esta acción de selección está ocurriendo considerando el gen

Duffy en compañía. La combinación AS*FYB^{ES}/FYB^{ES} genotípica no solo muestra que incrementa el valor de *fitness* en los adolescentes (comparación 1, tabla 13) sino también en el grupo de adultos (comparaciones 2 y 3, tablas 14 y 15). Y aunque el *fitness* del genotipo FYB^{ES}/FYB^{ES} del gen Duffy nunca alcanzó valores de 1,0 en las distintas comparaciones, como si se observó para el genotipo AS del gen Duffy, la combinación de estos dos genotipos al parecer favorece y da un aporte mayor del que se esperaría de cada uno evaluándolo independiente (tabla 17). Esto también puede explicar el desequilibrio de ligamiento encontrado para estos dos genes (tabla 11). El desequilibrio en el ligamiento es la asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci (que pueden o no estar en el mismo cromosoma), y en una población grande y con apareamiento aleatorio, se espera que los alelos de diferentes loci exhiban equilibrio de ligamiento, es decir, estén asociados al azar. Así que el observar desviaciones a estas frecuencias génicas, similar a desviaciones en el equilibrio H-W, puede estar causado por una gran variedad de fenómenos, como la selección y la deriva (Slatkin, 2008). En este estudio se encontró desequilibrio de ligamiento entre el locus HbS y la región promotora del gen Duffy (esta región es la que determina si el eritrocito expresa o no los antígenos Duffy en superficie). Así que ese desequilibrio podría ser el reflejo de una alguna o algunas combinaciones genotípicas de ambos genes que están siendo “escogidas” para pasar en mayor o menor proporción a las siguientes generaciones (más que lo esperado por apareamiento al azar), y esta combinación podría ser, según los datos de *fitness*, la combinación genotípica AS*FYBES/FYBES. Adicional a los valores de *fitness* superior de esa combinación genotípica, se encontró un correlación positiva y significativa para estos genotipos y los alelos que lo conforman, contrastante con la correlación negativa o no correlación encontrada con los demás genotipos y alelos (tabla 12). En este estudio se

encontró que el alelo S explica aproximadamente el 84% de la variación encontrada en el alelo FYB^{ES} y viceversa, y que el genotipo AS explica el 90% de la variación encontrada en el genotipo FYB^{ES}/FYB^{ES} e inversamente. Esta correlación encontrada lleva a suponer que puede estar ocurriendo una selección conjunta para estos dos alelos, que se encuentran “coadaptados”, o en otras palabras, que parte de su adaptación se debe a interacciones epistáticas entre ellos (en este caso en particular, epistasia para eficacia) (Falconer & Mackay, 1996; Lehner, 2011). Algo que apoya aún más esta variación conjunta de ambos genotipos de resistencia es la gráfica genotipos vs. edad (figura 17), donde se encontró que ambos genotipos presentan un cambio de frecuencia muy similar a lo largo de las distintas edades en la población urbana de Buenaventura: ambos presentan una disminución en sus frecuencias en sus primeros años de vida, para empezar a incrementar a partir de los 10 años, y mantener las frecuencias más altas entre a los 13 años y 20 años (adolescentes y adultos jóvenes), luego ambos genotipos muestran una disminución de la frecuencia del genotipo, que luego se eleva ligeramente partir de los 30. Finalmente, ambos genotipos estabilizan sus frecuencias partir de los 45 años. Este comportamiento casi idéntico de ambos genotipos no se presenta cuando se compara la edad con los demás genotipos de ambos genes (gráficas no mostradas). La figura 7 está mostrando algo adicional aparte de la selección conjunta de estos genotipos de resistencia a la malaria: la selección natural parece estar iniciando en las primeras edades, actuando fuertemente y reafirmandose en la adolescencia y en los adultos (aproximadamente a partir de los 44 años) empezar a “relajarse” (mostrando una estabilidad en estas frecuencias y poca o nula variación). Esta atenuación de la selección en los adultos mayores podría explicarse por la inmunidad adquirida que presenta esta población debido a episodios de infección presentadas a lo largo de la vida, además (como se mencionó en el

capítulo I) por el estilo de vida y actividades de estos individuos que ya no implica una completa exposición a estos parásitos (Doolan et al., 2009; Pinkevych et al., 2012), además de otras enfermedades no relacionadas a la malaria que le compete a la población adulta mayor (como las ya mencionadas relacionadas a los antígenos Duffy). Todo este fenómeno en la disminución de la intensidad de la selección en los adultos se ve directamente reflejado en los valores de *fitness* de adultos mayores cuando se compara respecto a los adolescentes y adultos jóvenes (comparación 3, tabla 15): la combinación genotípica AS*FYB^{ES}/FYB^{ES} ya no es la de mayor *fitness*, siendo superiores a esta todas las combinaciones de todos los genotipos Duffy con el genotipo AA. En este grupo los valores de *fitness* más altos los tienen las combinaciones genotípicas AA*FYB/FYB y AA*FYA/FYB, mostrando de nuevo que quizás la presión de selección a malaria ya no está jugando un rol tan importante en este grupo de edad, dando paso a la predilección de genotipos que posiblemente están relacionados con otras enfermedades que competen a esta población.

Claro está que no se puede dejar a un lado la influencia de otras fuerzas como la deriva genética, (proceso de colonización y disminución de la población que sufrió la población de Buenaventura en sus inicios (Pérez, 2007) la migración y mutación en el cambio de las frecuencias actuales de estos genotipos de la ciudad de Buenaventura. La selección natural opera sobre la variación genética encontrada, cuyas frecuencias iniciales están profundamente influenciados por factores aleatorios como la mutación y la deriva (Templeton, 2006). Todos estos procesos en combinación han aportado al panorama adaptativo que se puede apreciar hoy día en Buenaventura. En este estudio se presentan evidencia del papel fuerte de la selección natural en las frecuencias alélicas de los genes HbS

y Duffy en esta población, selección que, según lo evidenciado, depende mucho de la estratificación de la población por rangos de edad.

7.6 CONCLUSIONES

7.6.1 La población urbana de Buenaventura se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para el gen de la HbS, más no para el gen Duffy. La población puede estar alcanzando el equilibrio balanceado para sus frecuencias del gen HbS, contrario al gen Duffy donde aún sus frecuencias y valores de fitness varían especialmente en los adultos, posiblemente debido al efecto de este polimorfismo en el desarrollo de distintas enfermedades que afectan este grupo de edad.

7.6.2 La dinámica de cambio de las frecuencias genotípicas AS y FYBES/FYBES en la población de Buenaventura se comportan de forma similar, y es acorde a la frecuencia de infección de la malaria en las distintas edades. Estos genotipos se correlacionan positivamente y muestran el mayor valor de fitness. Lo anterior podría indicar una selección conjunta para estas dos variantes y que la malaria es un factor de selección sobre estas cuando se evalúan juntas.

8. CAPITULO III

RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL Y CORRELACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA EL GRUPO SANGUINEO DUFFY Y LA HEMOGLOBINA S EN DISTINTAS POBLACIONES HUMANAS.

8.1 RESUMEN

La malaria es una fuerza selectiva importante para adaptaciones genéticas del ser humano debido al letal impacto sostenido que ha tenido sobre poblaciones en todo el mundo. Altas frecuencias tanto de la hemoglobina S como del alelo nulo FYB^{ES} del grupo sanguíneo Duffy han sido encontradas en zonas donde la malaria es endémica, lo cual se le atribuye a la resistencia de la infección por malaria a los portadores de estas variantes. Así que sería importante visualizar como han ido cambiando estas frecuencias a lo largo de la diversificación de los grupos poblacionales. Por otra parte, un análisis de correlación permitiría evaluar qué tanto se relacionan y varían entre sí las frecuencias alélicas de estos dos genes en las distintas poblaciones humanas, y si lo encontrado a nivel local en la población de Buenaventura, puede extrapolarse a distintas poblaciones del mundo. El objetivo de este capítulo fue realizar la reconstrucción ancestral y evaluar la correlación de las frecuencias para estos alelos a lo largo de la filogenia de 24 poblaciones humanas. Se utilizó una topología de árbol y frecuencias alélicas reportadas en la literatura para 24 poblaciones. La reconstrucción de las frecuencias ancestrales para los dos alelos se llevó a cabo mediante

el método de máxima verosimilitud y el modelo Browniano de evolución y el análisis de correlación se llevó a cabo mediante el uso de Contrastes Filogenéticamente Independientes (PICs). Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico R versión 3.4.1. Se encontró una correspondencia en la reconstrucción de las frecuencias ancestrales para ambos alelos y una correlación estadística significativa ($p=0.001$) entre el alelo S y el FYB^{ES}, indicando que aproximadamente el 52% de la variación de un alelo explica la variación del otro. Esta correlación podría estar mostrando una relación epistática entre estos dos alelos que puede estar influenciando el *fitness* en los individuos que presentan estos dos alelos en combinación, cuando son sometidos a una fuerza selectiva como la malaria.

Palabras clave: Malaria, Coadaptación, Epistasia, Alelo S, Alelo FYB^{ES}, PICs.

8.2 OBJETIVOS.

8.2.1 Objetivo General.

Realizar la reconstrucción ancestral y establecer la correlación de las frecuencias alélicas de los genes Duffy y hemoglobina S a lo largo de la filogenia de distintas poblaciones humanas.

8.2.2 Objetivos Específicos.

Establecer el valor de las frecuencias ancestrales para los alelos A y S del gen de la β -globina y las frecuencias de los alelos FYA, FYB y FYB^{ES} del gen Duffy en un árbol filogenético que muestra las relaciones de diferentes poblaciones humanas.

Realizar un análisis de correlación mediante contrastes filogenéticamente independientes (PICs) para las frecuencias del alelo S del gen de la β -globina y las frecuencias alélicas FYA, FYB y FYB^{ES} del gen Duffy a lo largo de esta filogenia.

8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

8.3.1 Topología del árbol y valores de las puntas.

La topología de árbol de distintas poblaciones humanas sobre el cual se realizaron los distintos análisis de este estudio fue tomada de Li y colaboradores (2008): de este trabajo se usaron las relaciones y longitud de las ramas para construir el árbol manualmente con el software Mesquite versión 3.1 (Maddison & Maddison, 2016). Se trabajó con 24 poblaciones (debido a la disponibilidad de estudios para estos genes) las cuales representaron las puntas de las ramas de árbol. Los valores de las frecuencias alélicas A y S del gen HbS como de los alelos FYA, FYB y FYB^{ES} del gen Duffy para las 24 poblaciones de estudio fueron tomados directamente de literatura o de estimación según las bases de datos geográficas para estas (tabla 18). El árbol fue calibrado usando el paquete *ape* del software estadístico R (Paradis et al., 2004) según el método de verosimilitud penalizada (Sanderson, 2002) usando un parámetro $\lambda = 1$ (igual tasa de cambio evolutivo para todas las ramas) y una edad mínima y máxima para la raíz de 100 000 y 200 000 años, respectivamente (el tiempo en el que se cree surgieron los humanos modernos en Africa) (Campbell et al., 2014).

Tabla 18. Descripción de las 24 poblaciones de estudio.

Población	Fuente	Región
Namibia	MAP, 2017	África
República centroafricana RCA	MAP, 2017	
Congo	MAP, 2017	
Kenia	MAP, 2017	
Senegal	MAP, 2017	
Nigeria	MAP, 2017	
Medio Oriente*	MAP, 2017	Medio Oriente
Italia	Lippi et al., 2010	Europa
Francia	Thuret et al., 2010; Bauduer et al., 2004	
Islas Orkney	Welch et al., 1973	
Rusia	Piel et al., 2010; Howes et al., 2011	
Asia C. y S.*	MAP, 2017	Asia Central y del Sur*
Uygur (China)	Lin et al., 2016	Asia Oriental
Mongolia (China)	Yuan et al., 1984	
Japón	Nakajima, 1971	
Han (China)	Yan et al., 2005	
She (China)	Yan et al., 2005	
Cambodia	MAP, 2017	
Siberia	Sukernik te al., 1978	
Arizona	Piel et al., 2010; Howes et al., 2011	Norte América
México	MAP, 2017; Cerde-Flores & Garza-Chapa, 1989	
Colombia	MAP, 2017	Sur América
Brasil	MAP, 2017	
Oceanía (Nueva Guinea y Melanesia)	MAP, 2017; Shimizu et al., 2000.	Oceanía

*La población denominada “Medio Oriente” corresponde a un promedio de las frecuencias de las poblaciones de Azerbaijón, Georgia, Irán, Iraq, Turkia, Israel, Yemen, y la población “Asia Central y del Sur” corresponde el promedio de las frecuencias alélicas de las poblaciones de Afghanistan, Banglades, India, Kyrgyzstan, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, Tajikistan y Uzbekistan.

8.3.2 Reconstrucción de frecuencias ancestrales.

La reconstrucción de las frecuencias ancestrales para los dos genes en los distintos nodos del árbol se llevó a cabo mediante el método de máxima verosimilitud (ML) con el modelo Browniano de evolución (BM). Se fijaron los valores ancestrales de aparición de los alelos FYB^{ES} y HbS a los nodos del árbol donde se cree surgieron estos según diversos estudios (McManus et al., 2017; Templeton, 2006). También se llevaron a cabo fenogramas, que son gráficos que proyectan la filogenia de cada característica a evaluar, en este caso las frecuencias alélicas (eje y) desde la raíz, hasta el tiempo actual (eje x). Todo lo anterior fue llevado a cabo con el paquete *phytools* del software R 3.4.1 (Revell, 2012).

8.3.3 Correlación de frecuencias alélicas para ambos genes.

Para llevar a cabo las correlaciones alélicas se calcularon “Contrastes filogenéticamente independientes (PICs)” para cada alelo mediante el método descrito por Felsenstein (1985), el cual permite estandarizar o “corregir” los valores de las ramas teniendo en cuenta la filogenia (solucionando así el problema de la no-independencia de los grupos a evaluar).

Con estos PICs se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y probabilidad para tres comparaciones: 1) PICs alelo S vs. PICs alelo FYB^{ES} del gen Duffy; 2) PICs alelo S vs. alelo FYA del gen Duffy; 3) PICs alelo S vs. PICs alelo FYB del gen Duffy. Todo lo anterior usando el paquete *ape* del software R (Paradis et al., 2004).

8.4 RESULTADOS

8.4.1 Frecuencias alélicas y reconstrucción ancestral

Para las 24 poblaciones de estudio se obtuvieron frecuencias para el alelo S entre el 0 a 17%. Las frecuencias más altas se presentaron en los países del África, seguidas de las poblaciones de Medio Oriente, siendo Nigeria la población con mayor frecuencia reportada para este gen (17%). Las poblaciones con menor frecuencias de este alelo fueron los de Asia oriental con 0% o cercanas a este valor. Para el gen Duffy, se encontraron frecuencias desde 0 al 100% para las 24 poblaciones. Similar al alelo S se encontraron las frecuencias más altas para FYB^{ES} en las poblaciones del África, seguidas del Medio oriente y Sur América, siendo las poblaciones de Kenia, Congo y Senegal las que tienen las frecuencias más altas con 97%, 98% y 100%, respectivamente. Las poblaciones con las frecuencias más bajas fueron igualmente las de Asia Oriental, con frecuencias de 0 a 1%.

Al realizar la reconstrucción ancestral de las frecuencias alélicas bajo el modelo BM para los distintos nodos del árbol filogenético para las 24 poblaciones, se encontraron valores de frecuencias ancestrales que aumentaban o disminuían de forma similar en alelos (figura 8). Para ambos genes, las frecuencias ancestrales más altas corresponden a las poblaciones africanas y las más bajas a las poblaciones de Asia Oriental (Han, Japón, She, Cambodia, Mongolia y Siberia). Para el alelo S se encuentran valores de frecuencias para los nodos del árbol que oscilan entre el 0% a 7,4% (figura 8 - izquierda) y entre 0.01% a 73% para el alelo FYB^{ES} (figura 8-derecha).

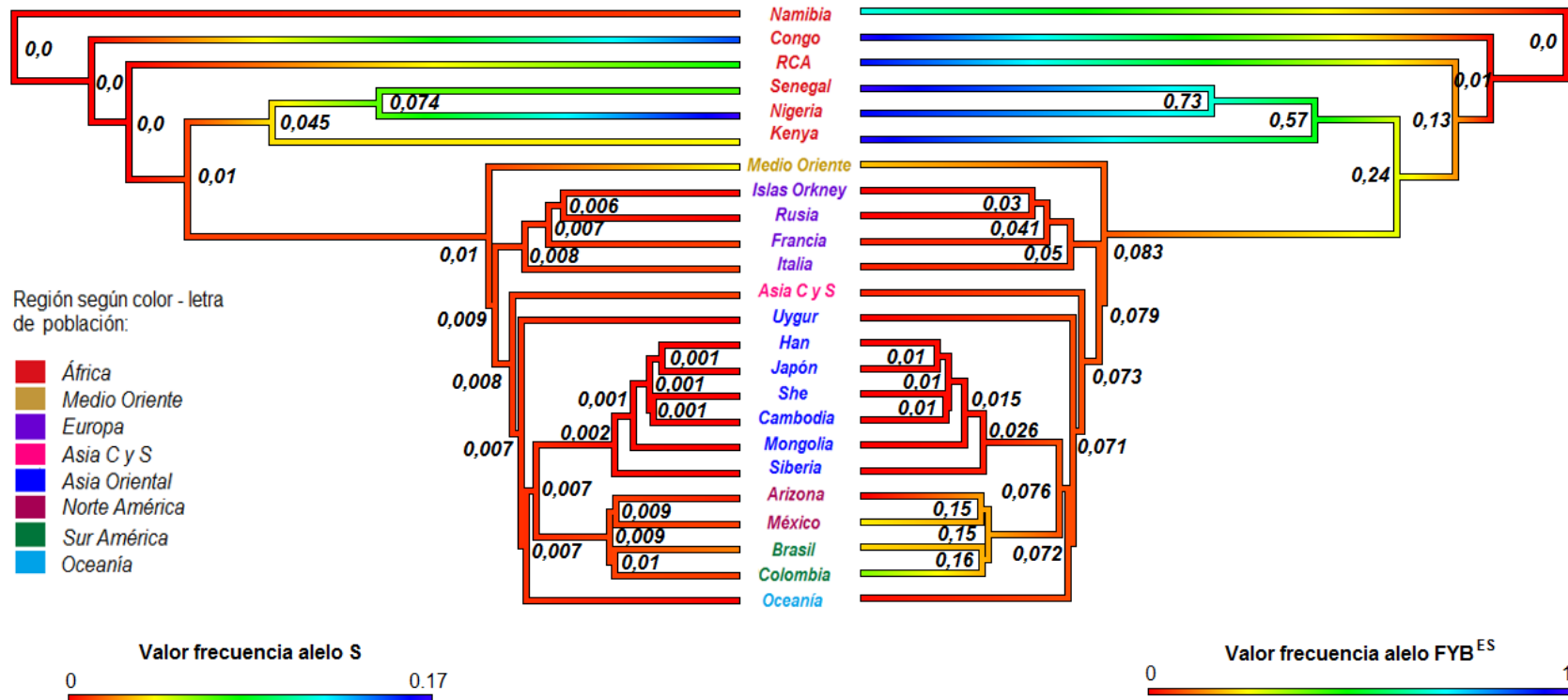


Figura 8. Árboles filogenéticos de las 24 poblaciones para los alelos S (izquierda) y FYB^{ES} (derecha). Los valores en los nodos corresponden a las frecuencias alélicas ancestrales calculadas. Los colores en degradé en las ramas de cada árbol corresponde al cambio en la frecuencia alélica explicada en la barra de la parte inferior.

El nodo que presentó la mayor frecuencia para ambos alelos fue aquel donde divergen las poblaciones de Senegal y Nigeria (7,4% y 73% para S y FYB^{ES} respectivamente). Por otra parte, la disminución evidente de la frecuencia alélica a lo largo de esta filogenia fue observada en la rama interna que conecta a las poblaciones de Nigeria, Kenia y Senegal con la población de Medio Oriente para el alelo FYB^{ES}, cuya frecuencia disminuye de 24 a 8,3%, y para el alelo S dicha disminución notoria ocurre en la bifurcación de las poblaciones de Medio Oriente con el resto las poblaciones de Asia, Europa y América y Oceanía (figura 8). A partir de entonces ambos alelos continúan disminuyendo en frecuencia hasta llegar a valores de aproximadamente 0 en las poblaciones de Asia Oriental. Aunque cabe resaltar que en las poblaciones del continente americano (Arizona, México, Colombia y Brasil), clado hermano de estas poblaciones asiáticas, las frecuencias tienden a incrementar para ambos alelos a pesar de que venían disminuyendo desde el nodo de divergencia del clado que comparten Kenia, Senegal y Nigeria con el resto de poblaciones no-africanas (figura 8).

8.4.2 Fenogramas y correlaciones alélicas

Los cambios y tendencias en las distintas poblaciones se ven mejor reflejadas en los fenogramas de la figura 9: para el alelo FYB^{ES} se observa claramente dos comportamientos en cuanto a las frecuencias de este alelo: las poblaciones africanas, excepto Namibia (cuya frecuencia se mantienen cercanas a su valor inicial), tienen frecuencias alélicas considerablemente más altas que el resto de las poblaciones (figura 9-a).

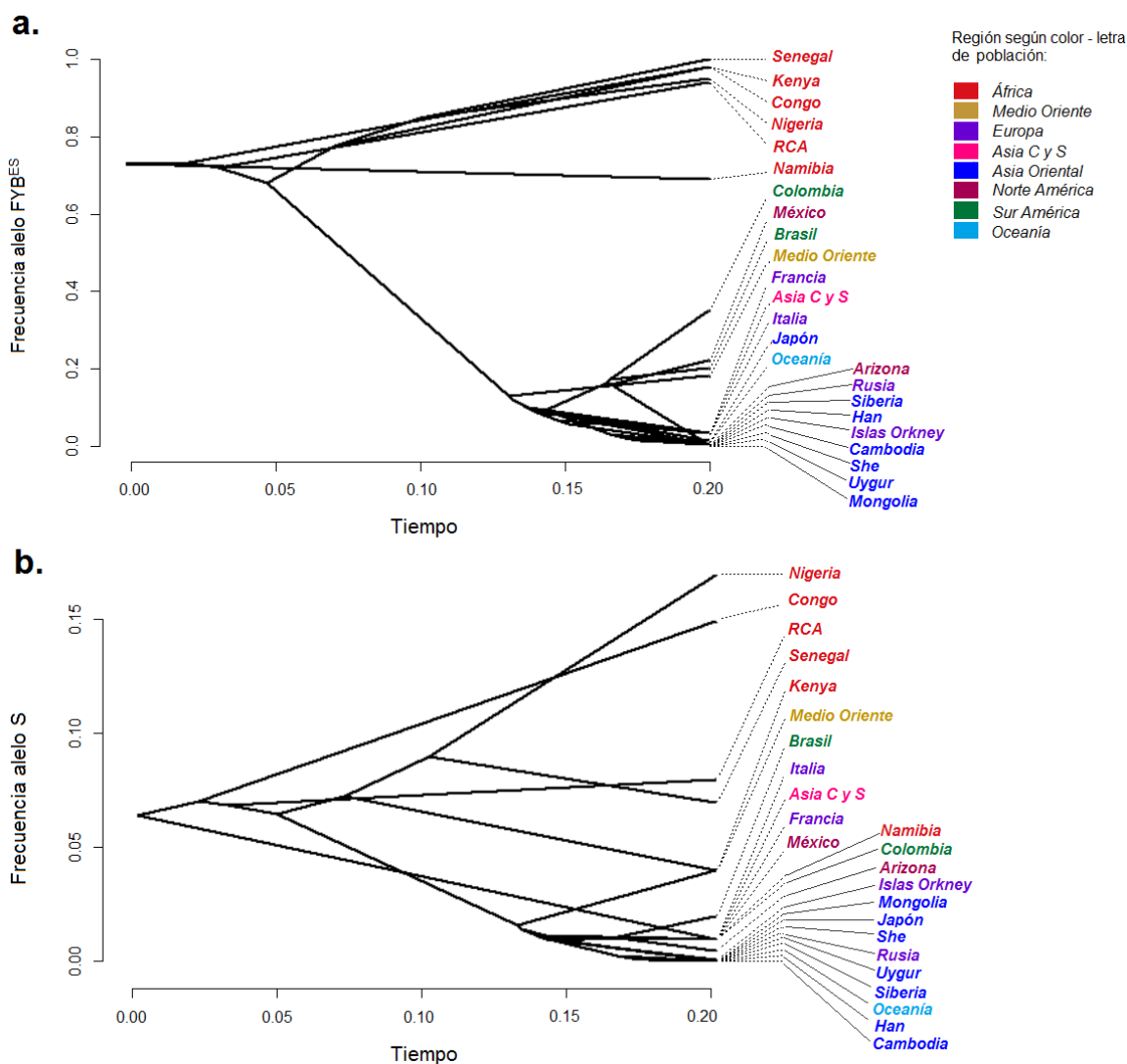


Figura 9. a) Fenogramas para los alelos FYB^{ES} y b) el alelo S de las 24 poblaciones de estudio vs. tiempo evolutivo. El color de letra representa la región a la cual pertenece cada país.

En el otro extremo están las poblaciones de Europa y Asia central, sur y oriental, cuyas frecuencias decaen en la gráfica temprano en el tiempo hasta llegar a 0 o casi 0. En cuanto a norte y sur América, sus frecuencias, aunque bajas, son un poco más altas que las de sus cladros hermanos, elevándose un poco sus ramas en la gráfica, al igual que las de Medio oriente (figura 9-a).

Para el alelo S estas tendencias se visualizan de un modo un poco más complejo ya que no solo existe dos tendencias o extremos en cuanto al valor de frecuencias, sino que existen poblaciones que se distribuyen en la mitad y a lo largo de este rango que va de 0 al 17%: las poblaciones que presentan el extremo superior o frecuencias más altas ya no son todas las del continente africano, sino solo Nigeria y Congo, y el grupo de poblaciones que representa las frecuencias más bajas se amplía, incluyendo no solo las de Europa, Asia central, sur y oriental, sino también norte y sur América, Medio oriente e incluso Namibia que es un país africano (figura 9-b).

Finalmente se realizó la correlación estadística para los PICs del alelo S y los tres alelos principales del sistema sanguíneo Duffy: FYB^{ES}, FYA, FYB. Se encontró una correlación positiva significativa para la comparación S vs. FYB^{ES} con un valor de probabilidad de 0.0109 (tabla 19, figura 10-a), una correlación negativa significativa para la comparación S vs FYA con un valor $p=0,0001$ (tabla 19, figura 10-b) y no se encontró correlación para S vs FYB ($p=0,2287$) (tabla 19, figura 10-c).

Tabla 19. Correlaciones de PICs para tres diferentes comparaciones del alelo S y alelos del gen Duffy.

PICs	Rho	Probabilidad
Alelo S vs. FYB ^{ES}	0,520	0,0109
Alelo S vs. FYA	-0,714	0,0001
Alelo S vs. FYB	-0,261	0,2287

color rojo= valores significativos ($p \leq 0,005$)

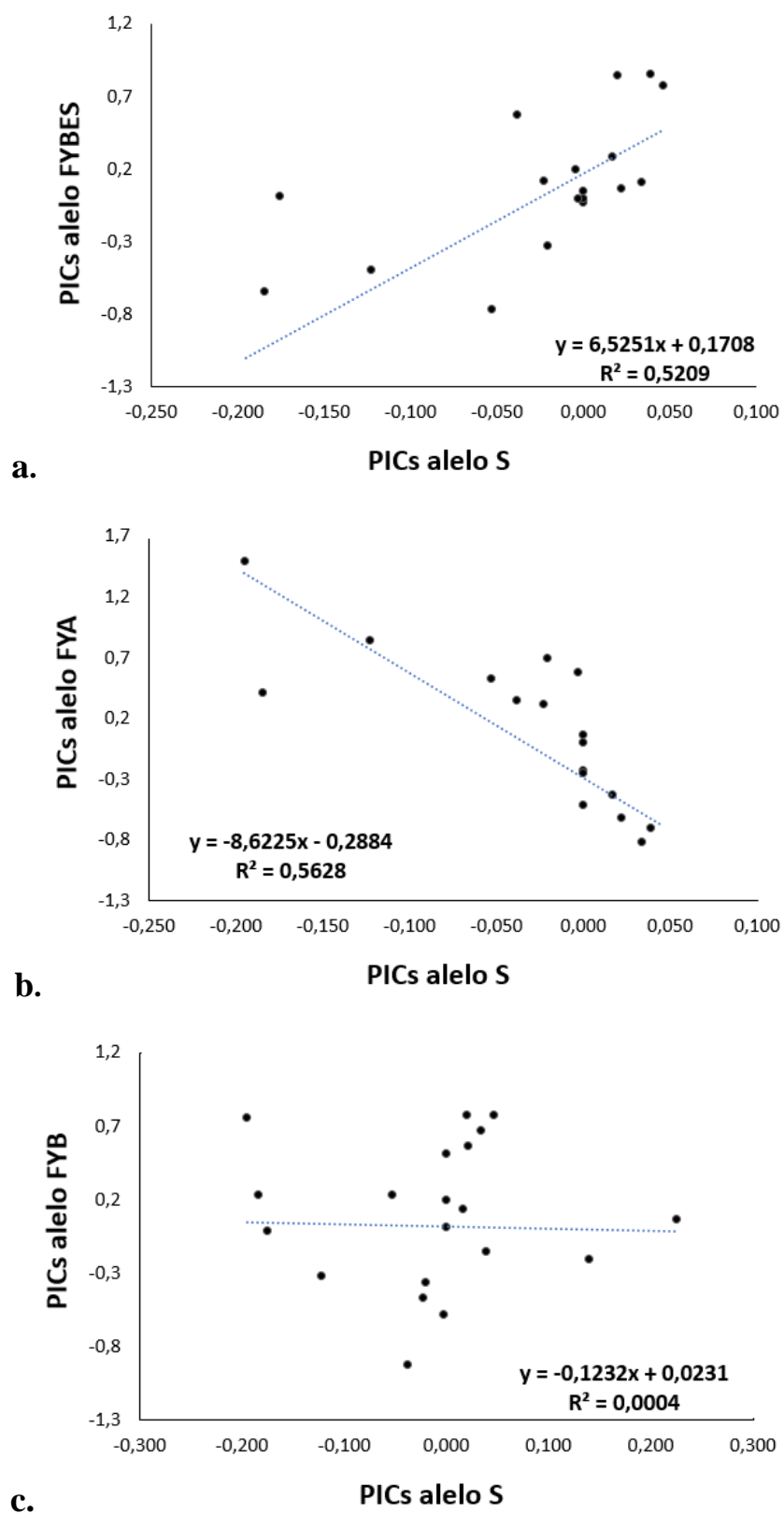


Figura 10. Correlación entre Contrastes filogenéticamente independientes (PICs): a) PICs S vs. PICs FYB^{ES}, b) PICs S vs. PICs FYA y c) PICs S vs. PICs FYB.

8.5 DISCUSION

Las frecuencias alélicas reportadas en este estudio de los alelos S y FYB^{ES} para las distintas poblaciones y regiones del mundo coinciden considerablemente con las regiones endémicas a la malaria reportadas globalmente (Gething et al., 2011), específicamente las poblaciones correspondientes a las regiones del África, Medio Oriente, sur de Asia y parte de Sur América. Inicialmente, las poblaciones de África tendrían muy bajas frecuencias de alelo S y FYB^{ES} en los primeros pueblos del África como aquellos de habla Bantú, los cuales se expandieron por el centro-oeste, este y sur de África (Templeton, 2006). En ese entonces la malaria no era un agente selectivo importante en su ambiente, pero con la expansión de estos pueblos y la introducción de una agricultura de corte y quema, se crearon hábitats propicios para la expansión de los parásitos del género *Plasmodium* por parte de las poblaciones del mosquito *Anopheles*. Así, la introducción de la malaria a estas poblaciones llevó a alteraciones en el *fitness* de estos alelos que condujeron a cambios evolutivos que alteraron considerablemente estas frecuencias alélicas iniciales (Espinel & Valenzuela, 1991; Livingstone, 1958; Templeton, 2006). En este estudio se encontró una correspondencia general en términos filogenéticos y estadísticos para los alelos FYB^{ES} y S en las 24 poblaciones estudiadas. La correspondencia inicial se evidenció al realizar la reconstrucción ancestral de las frecuencias para cada nodo del árbol, desde las divergencia de las poblaciones africanas iniciales, como las disminuciones y aumentos sutiles en frecuencia que han ocurrido en clados específicos ya mencionados en los resultados (figura 8), pero quizás la correspondencia más evidente se observó al realizar la correlación de los contrastes filogenéticamente independientes (PICs) para estos alelos, al encontrar una correlación positiva y significativa para estos, contrastante con la correlación negativa y la no correlación

del alelo S con los alelos FYA y FYB respectivamente (tabla 3), esto último era fundamental para poder hablar de una correlación real entre los alelos S y FYB^{ES}. Esta correlación, al igual que la reportada en el capítulo II de este documento para estas frecuencias en la población de Buenaventura, nuevamente es un indicio para considerar selección conjunta para estos dos alelos, o que pueda estar ocurriendo epistasia para *fitness* entre ellos (Falconer & Mackay, 1996; Lehner, 2011). En este estudio se encontró que el alelo S explica aproximadamente el 52% o un poco más de la mitad de la variación encontrada en el alelo FYB^{ES} y viceversa. No es un coeficiente de determinación tan alto como el encontrado en la población de Buenaventura, pero eso puede explicarse por el tipo de estudio y modo de obtención de los datos. En este estudio el grado de error aumenta no solo porque se están trabajando con frecuencias de más de una población, sino porque estos datos están siendo obtenidos de la literatura y de programas de estimación geográfica (MAP, 2017). Lo interesante es ver como a escala global, se puede apreciar mejor la naturaleza y tipo de selección que esta actuando sobre cada gen (sobredominancia y selección direccional para HbS y Duffy, respectivamente): se observan frecuencias muy altas e incluso la fijación para el alelo FYB^{ES} en algunas poblaciones (mostrando de manera general dos óptimos adaptativos para este alelo en el fenograma de la figura 9), caso que no ocurre para el alelo S, donde las frecuencias no sobrepasan el 20% según la literatura (Piel et al., 2010) (al menos en este estudio, no sobrepasa el 17%), nunca alcanza la fijación (por su característica letal en homocigosis) y por tanto su frecuencia esta siendo representada principalmente en los heterocigotos (mostrando así diferentes patrones de distribución en el fenograma de la figura 9).

Otra diferencia clara entre estos dos alelos es la naturaleza de la protección (la cual a su vez puede ser vista como complementaria a la resistencia frente a la malaria) y el tiempo de

surgimiento de las variantes. Mientras el alelo S confiere resistencia para el *Plasmodium vivax*, considerado por mucho tiempo el agente causal de la malaria más letal en humanos, y el alelo FYB^{ES} confiere resistencia a *P. vivax* (estudios recientes sugieren que la malaria vivax puede volverse letal de forma similar a la malaria falciparum (Baird, 2007)). Por otro lado, el alelo S es mucho más reciente que el FYB^{ES}: Se cree que la edad de la mutación para el surgimiento de S ocurrió entre los 1,350–2,100 años (Currat et al., 2002), mientras que la de FYB^{ES} ocurrió aproximadamente hace 42000 años (McManus et al., 2017). Este punto también explica porque en algunas poblaciones de este estudio las frecuencias de estos alelos son muy bajas o prácticamente inexistentes: en cuanto a América los alelos resistentes a la malaria común no están presentes en los nativos o poblaciones indígenas, presumiblemente porque sus antepasados no estaban expuestos a la malaria y esta sólo llegó a las Américas durante el comercio transatlántico de esclavos entre los siglos XVI y XIX (Yalcindag et al., 2012). Y aunque poblaciones como Colombia y Brasil no presentan niveles tan altos de estos alelos, sus frecuencias según este estudio han tendido a incrementar levemente en la filogenia (figura 8a y 9-b) comparado a su clado hermano (poblaciones de África oriental) posiblemente debido a la llegada de los esclavos negros en la época de la colonia a Colombia y Brasil ya que estas se encuentran ubicadas en regiones con mayor grado de endemidad a la Malaria comparado a las poblaciones de Asia oriental incluidas en este estudio (Gething et al., 2011; Piel et al., 2010).

Incluso en poblaciones de una misma región y grados de endemidad a la malaria muy similares como es el caso de África, se encontraron variaciones en el grado de las frecuencias alélicas, tanto en la revisión bibliográfica como en la reconstrucción ancestral (figura 8 y 9). Estas variaciones, además de ser explicadas por los distintos grados de prevalencia de malaria

presentes en África, podría deberse por una lado, a las interacciones con otras hemoglobinopatías, tales como la HbC y las α y β -talasemias, en las que se ha encontrado diferentes grados de epistasia (tanto positiva como negativa), en individuos portadores de estas variantes (Opi et al., 2014; Penman et al., 2011; Williams et al., 2005); y por otro lado, por cómo opera la misma selección natural: presiones selectivas uniformes pueden producir respuestas adaptativas divergentes, ya que la aleatoriedad de los procesos de mutación y recombinación (las cuales crean la variación en primer lugar) y la aleatoriedad de la deriva, influyen en esas frecuencias alélicas iniciales recién creadas, dando lugar a diversos resultados selectivos incluso entre poblaciones que se adaptan a la misma fuerza ambiental (Templeton, 2006). Así, esta heterogeneidad conferida por factores aleatorios como mutación y deriva, sumado a la epistasia de estos alelos, la selección actuando sobre la variación disponible, y la presión que pueda estar efectuando el ambiente (malárico o no malárico), llevaron al patrón de frecuencias alélicas que hoy se conoce actualmente para las distintas poblaciones del mundo.

Para evaluar con mayor detalle si realmente está ocurriendo epistasia para los alelos y genotipos de resistencia del gen Duffy y HbS en las distintas poblaciones humanas es necesario realizar estudios donde se evalúen además de los parámetros teóricos abordados en este trabajo, valores clínicos y de laboratorio donde se pueda demostrar que tener estos alelos de resistencia manifiesta una ventaja fisiológica para evitar o sobrellevar una infección malárica. Ahora, la reconstrucción ancestral obtenida en este estudio (cuyos detalles de construcción fueron explicados en la metodología de este documento) es una visión general y aproximada de lo que realmente ocurrió en la filogenia de las poblaciones humanas, además, esta construyó bajo el modelo de Browniano de evolución (Felsenstein, 2004) en el

cual su principal parámetro es la deriva, sin tener en cuenta otras fuerzas de cambio génico. Por tanto, valdría la pena realizar un estudio similar realizando la reconstrucción con un modelo que permita aplicar diferentes parámetros que incluya valores de selección, deriva, migración y mutación, y analizar como varían estas frecuencias a lo largo de la filogenia de estas poblaciones. De este modo habría una mejor representación no solo de la filogenia y reconstrucciones ancestral, sino de los óptimos adaptativos (cuya aproximación pudo visualizarle en los fenogramas de la figura 9) que puedan estar ocurriendo en la historia evolutiva de estos dos alelos.

8.6 CONCLUSIONES

8.6.1 Las poblaciones de este estudio evidencian un patrón de distribución en frecuencias acorde a las regiones donde la malaria está presente, y pese a los distintos tipos de selección que operan sobre ambas variantes, estas muestran un cambio de frecuencia alélica similar a lo largo de la filogenia de las poblaciones humanas.

8.6.2 Las 24 poblaciones evaluadas en este estudio muestran una correlación positiva en las frecuencias alélicas S y FYBES, lo que podría indicar que existe selección conjunta o epistasia positiva para estas, similar a lo encontrado a nivel local en la población de Buenaventura.

9. CONCLUSIONES GENERALES

9.1 En este estudio se presenta evidencia de la acción de la selección natural, tanto individual como conjunta, en las frecuencias alélicas de los genes HbS y Duffy en la ciudad de Buenaventura, selección que depende de la estratificación por rangos de edad de la población y que se encuentra mayor representada en algunas comunas o zonas de la ciudad. Estos resultados tienen importantes aplicaciones en estudios epidemiológicos y en el manejo clínico de la malaria en la ciudad de Buenaventura.

9.2 La correlación positiva de los alelos S y FYB^{ES}, la cual se evidencia tanto a nivel local (Buenaventura), como en las poblaciones evaluadas en este estudio, podría estar mostrando una relación epistática positiva y coadaptación ente estos dos alelos que puede estar influenciando el *fitness* en los individuos portadores, siendo la malaria un factor de presión de selección sobre estos dos genes cuando se evalúan juntos.

10 LITERATURA CITADA

Abarca G, Navarrete M, Trejos R, Céspedes C, Saborío M. 2008. Hemoglobinas anormales en la población neonatal de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 56:995–1001.

Allison AC. 1954. Protection Afforded by Sickle Cell Trait Against Subtertian Malarial Infection. *Br. Med. J.* 6:290–294.

Allison AC. 1956. The sickle-cell and haemoglobin C genes in some African populations. *Ann. Hum. Genet.* 21:67–89.

Alvarado BE, Alzate A, Mateus JC, Carvajal R. 2006. Efectos de una intervención educativa y de participación comunitaria en el control de la malaria en Buenaventura, Colombia. *Biomédica* 26:366.

Alvear CC, Barboza M, Viola M, Moneriz C, Araque LM. 2012. Pilot study of hemoglobinopathies in newborns of the Rafael Calvo maternity clinic of Cartagena, Colombia. *Colomb. Med.* 43.

Alwan A, Modell B. 2003. Recommendations for introducing genetics services in developing countries. *Nat. Rev. Genet.* 4:61–68.

Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. 2012. Biology of human malaria plasmodia including plasmodium knowlesi. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 4:2012013.

Apostolakis S, Chalikias GK, Tziakas DN, Konstantinides S. 2011. Erythrocyte Duffy antigen receptor for chemokines (DARC): diagnostic and therapeutic implications in atherosclerotic cardiovascular disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 32:417–424.

ASH. 2017. American Society of Hematology. Sickle Cell Trait. Available at: <http://www.hematology.org/Patients/Anemia/Sickle-Cell-Trait.aspx>.

Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. 2004. 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* 104:3364–3371.

Baird JK. 2007. Neglect of Plasmodium vivax malaria. *Trends Parasitol.* 23:533–539.

Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. 1989. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by Plasmodium vivax. *J. Exp. Med.* 169:1795–1802.

- Bateson W. 1909. Mendel's principles of heredity. Cambridge University Press.
- Benson JM, Therrell BL. 2010. History and current status of newborn screening for hemoglobinopathies. *Semin. Perinatol.* 34:134–144.
- Bernal M, Collazos A, Bonilla RD, Tascón EP. 2010. Determination of the prevalence of hemoglobin S, C, D, and G in neonates from Buenaventura, Colombia. *Colomb. Med.* 41:141–147.
- Bernal MDP, Giraldo A, Bermudez AJ, Moreno E. 1995. Estudio de la frecuencia de hemoglobinopatías en las islas de San Andrés y Providencia, Colombia. *Biomédica* 15:5–9.
- Brittain T. 2002. Molecular aspects of embryonic hemoglobin function. *Mol. Asp. Med.* 23:293–342.
- Cameron BF, Smith DB, Cody B. 1984. Hemoglobin S levels in sickle cell trait individuals. *Am. J. Hematol.* 16:123–127.
- Campbell MC, Hirbo JB, Townsend JP, Tishkoff SA. 2014. The peopling of the African continent and the diaspora into the new world. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 29:120–32. doi:10.1016/j.gde.2014.09.003.
- Carlborg Ö, Haley CS. 2004. Opinion: Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat. Rev. Genet.* 5:618–625.
- Carter AJR, Nguyen AQ. 2011. Antagonistic pleiotropy as a widespread mechanism for the maintenance of polymorphic disease alleles. *BMC Med. Genet.* 12:160.
- Carter R, Mendis KN. 2002. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:564–594.
- Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. 1971. *The Genetics of Human Populations*. Freeman WH, editor. San Francisco.
- Chakraborty R. 1990. Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 47:87-94.
- Chitnis CE, Miller LH. 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of

Plasmodium vivax and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J. Exp. Med.* 180:497–506.

Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakit  SAS, Arie T, Krause MA, Guindo A, Tubman A, Fujioka H, et al. 2008. Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:991–996.

Core Team RD. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput.

Corp IBM Released. 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, IBM Corp.

Currat M, Trabuchet G, Rees D, Perrin P, Harding RM, Clegg JB, Langaney A, Excoffier L. 2002. Molecular Analysis of the β -Globin Gene Cluster in the Niokholo Mandenka Population Reveals a Recent Origin of the Senegal Mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 70:207–223.

Cyrklaff M, Sanchez CP, Kilian N, Bisseye C, Simpoire J, Frischknecht F, Lanzer M. 2011. Hemoglobins S and C Interfere with Actin Remodeling in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Sci.* 334:1283–1286.

De Bernal M, Collazos A, Bonilla RD, Tasc n EP. 2010. Determination of the prevalence of hemoglobin S, C, D, and G in neonates from Buenaventura, Colombia. *Colomb. Med.* 41:141–147

Dean L. 2005. The Duffy blood group. In: *Blood Groups Red Cell Antigens* [Internet]. Bethesda (MD), National Center for Biotechnology Information (US).

Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA. 1968. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61:949–955.

Doolan DL, Doba o C, Baird JK. 2009. Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:13–36.

Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. 1975. Invasion of erythrocytes by

malaria merozoites. *Science*. 187:748–750.

Eridani S. 2011. Sickle cell protection from malaria: a review. *Hematol. Reports* (formerly *Hematol. Rev.* 3.

Espinel A, Valenzuela N. 1991. Adaptaciones genéticas a la malaria en poblaciones afroaborígenes del Pacífico colombiano. *Rev. Antropol.* 7:117–129.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10:564–567.

Ewens WJ. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.* 3:87–112.

Falconer DS, Mackay TF. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Pearson, editor. Prentice Hall.

Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* 125:1–15.

Felsenstein J. 2004. *Inferring Phylogenies*. 1st ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Fernández JA, Osorio L, Murillo O, Escobar H, Bustamante P, Agudelo H, Martínez LP, Olaya B, Castro G. 2009. Caracterización de la mortalidad por malaria en el Valle del Cauca. *Biomédica* 29:582–590.

Fisher R. 1918. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Soc. Edinburgh* 52:399–433.

Fisher RA. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon, Oxford.

Fisher RA. 1935. The logic of inductive inference. *Journal of the Royal Statistical Society Series A* 98: 39–54.

Friedman MJ. 1978. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:1994–1997.

Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. 1998. *Bioquímica clínica y Patología molecular*. 2nd ed. Editorial Reverté S. A.

Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston GL, Tatem AJ, Hay SI. 2011. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar. J.* 10:378.

Gonzalez L, Vega J, Ramirez J-L, Bedoya G, Carmona-Fonseca J, Maestre A. 2012. Relationship between Duffy blood groups genotypes and malaria infection in different ethnic groups of Choco, Colombia. *Colomb. Med.* 43:189–195.

Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. 1999. *Modern Genetic Analysis*. Freeman WH, editor. New York: Balanced Polymorphism.

Haldane JBS. 1932. *The Causes of Evolution*. London: Longmans, Green.

Haldane JBS. 1949. Disease and evolution. *La Ric. Scientifica* 19 Suppl 19:68–75.

Hamblin MT, Di Rienzo A. 2000. Detection of the Signature of Natural Selection in Humans: Evidence from the Duffy Blood Group Locus. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1669–1679.

Hedrick PW. 2011. Population genetics of malaria resistance in humans. *Hered. (Edinb.)* 107:283–304..

Herbert Opi D, Ochola LB, Tendwa M, Siddondo BR, Ocholla H, Fanjo H, Ghumra A, Ferguson DJP, Alexandra Rowe J, Williams TN. 2014. Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and alpha-thalassemia. *EBioMedicine* 1:29–36.

Hodgson JA, Pickrell JK, Pearson LN, Quillen EE, Prista A, Rocha J, Soodyall H, Shriver MD, Perry GH. 2014. Natural selection for the Duffy-null allele in the recently admixed people of Madagascar. *Proceedings. Biol. Sci.* 281:20140930.

Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, Zimmerman PA, Barnadas C, Beall CM, Gebremedhin A, et al. 2011. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat. Commun.* 2:266.

Huttle A, Maestre GE, Lantigua R, Green NS. 2015. Sickle cell in sickle cell disease in Latin America and the United States. *Pediatr. Blood Cancer* 62:1131–1136.

Ingmundson A, Nahar C, Brinkmann V, Lehmann MJ, Matuschewski K. 2012. The exported

Plasmodium berghei protein IBIS1 delineates membranous structures in infected red blood cells. *Mol. Microbiol.* 83:1229–1243.

Ingram VM. 1957. Gene Mutations in Human Hæmoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hæmoglobin. *Nature* 180:326–328.

INS. 2017. Instituto Nacional de Salud. Available at: <http://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx>.

Kan YW, Dozy AM. 1980. Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science.* 209:388–391.

Kimura M. 1991. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn. J. Genet.* 66:367–386.

Kwiatkowski DP. 2005. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *Am. J. Hum. Genet.* 77:171–192.

Langhi DM, Bordin JO. 2006. Duffy blood group and malaria. *Hematology* 11:389–398.

Lehner B. 2011. Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends Genet.* 27:323–331.

Lentsch AB. 2002. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? *FASEB J.* 16:1093–1095.

Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, Cann HM, Barsh GS, Feldman M, Cavalli-Sforza LL, et al. 2008. Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation. *Sci.* 319:1100–1104.

Livingstone FB. 1958. Anthropological Implications of Sickle Cell Gene Distribution in West Africa. *Am. Anthr.* 60:533–562.

Livingstone FB. 1984. The Duffy blood groups, vivax malaria, and malaria selection in human populations: a review. *Hum. Biol.* 56:413–425.

Luzzatto L. 2012. Sickle cell anaemia and malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 4:2012065.

Maddison WP, Maddison DR. 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.11.

MAP. 2017. Malaria Atlas Project [Internet]. 21 July 2017.

McManus KF, Taravella AM, Henn BM, Bustamante CD, Sikora M, Cornejo OE. 2017. Population genetic analysis of the DARC locus (Duffy) reveals adaptation from standing variation associated with malaria resistance in humans. Hoekstra HE, editor. *PLoS Genet.* 13:e1006560.

Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbaoa A, Thonier V, Carod J-F, Domarle O, Colin Y, et al. 2010. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:5967–5971.

Mendez F, Carrasquilla G. 1995. Epidemiología de la malaria en el área urbana de Buenaventura: análisis de la ocurrencia en el período 1987-1993. *Colomb. Med.* 26:77–85.

Mendez F, Carrasquilla G, Muñoz A. 2000. Risk factors associated with malaria infection in an urban setting. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:367–371.

Michon P, Woolley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH. 2001. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett.* 495:111–114.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N. Engl. J. Med.* 295:302–304.

Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science.* 189:561–563.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.

Minsalud. 2013. Malaria – Memorias. Minist. salud y protección Soc. Available at: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/memorias_malaria.pdf.

Moyano M, Méndez F. 2005. Defectos eritrocíticos y densidad de la parasitemia en pacientes

con malaria por *Plasmodium falciparum* en Buenaventura, Colombia. *Rev. Panam. Salud Pública* 18:25–32.

Nickel RG, Willadsen SA, Freidhoff LR, Huang SK, Caraballo L, Naidu RP, Levett P, Blumenthal M, Banks-Schlegel S, Bleecker E, et al. 1999. Determination of Duffy genotypes in three populations of African descent using PCR and sequence-specific oligonucleotides. *Hum. Immunol.* 60:738–742.

Novitzky-Basso I, Rot A. 2012. Duffy antigen receptor for chemokines and its involvement in patterning and control of inflammatory chemokines. *Front. Immunol.* 3:266.

Olano V, Carrasquilla G, Méndez F. 1997. Transmisión de la malaria urbana en Buenaventura, Colombia: aspectos entomológicos. *Rev. Panam. Salud Pública* 1:287.

Olumese PE, Adeyemo AA, Ademowo OG, Gbadegesin RA, Sodeinde O, Walker O. 1997. The clinical manifestations of cerebral malaria among Nigerian children with the sickle cell trait. *Ann. Trop. Paediatr.* 17:141–145.

OPS. 2010. Guía para atención clínica integral del paciente con malaria. Organ. Panam. salud.

Ortega DC, Fong C, Cardenas H, Barreto G. 2015. Evidence of over-dominance for sickle cell trait in a population sample from Buenaventura, Colombia. *Int. J. Genet. Mol. Biol.* 7:1–7.

Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290.

Pathak K, Kishore S, Anshu, Shivkumar VB, Gangane N, Sharma S. 2003. Study of haemoglobin S percentage and haematological parameters in sickle cell trait. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 46:420–4.

Pauling L, Itano HA. 1949. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science.* 110:543–548.

Penman BS, Habib S, Kanchan K, Gupta S. 2011. Negative epistasis between alpha-thalassaemia and sickle cell trait can explain interpopulation variation in South Asia. *Evolution.* 65:3625–3632.

- Perea JA. 2016. Enfermedades transmitidas por vectores y zoonosis. Semana 52. 2016. Inf. epidemiológico. Secr. Dist. Salud Buenaventura.
- Perea JA. 2017. Enfermedades transmitidas por vectores y zoonosis. Semana 44. 2017. Inf. epidemiológico. Secr. Dist. Salud Buenaventura.
- Pérez GJ. 2007. Historia, geografía y puerto como determinantes de la situación social de Buenaventura. Cent. Estud. económicos Reg. CEER 91:13.
- Petrou M. 2010. Screening for beta thalassaemia. *Indian J. Hum. Genet.* 16:1–5.
- Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. 2010. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat. Commun.* 1:104.
- Pinkevych M, Petravic J, Chelimo K, Kazura JW, Moormann AM, Davenport MP. 2012. The dynamics of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Comput. Biol.* 8:e1002729.
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evol. (N. Y.)* 49:1280–1283.
- Reid M, Lomas-Francis C. 2004. *The Blood Group Antigen Facts Book*. 2nd ed. New York: Elsevier Academic Press.
- Revell LJ. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol. Evol.* 3:217–223.
- Russo G, Faggioni G, Paganotti GM, Djeunang Dongho GB, Pomponi A, De Santis R, Tebano G, Mbida M, Sanou Sobze M, Vullo V, et al. 2017. Molecular evidence of *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon. *Malar. J.* 16:74.
- Sáenz-Renaud G. 2005. Hemoglobinas anormales. *Acta Médica Contarricense* 47:173–179.
- Sanderson MJ. 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 19:101–109.

Satizabal Soto JM, Neuta Arciniegas PA, Somoyar Ordosgoiti P, Torres Muñoz J. 2013. Tamizaje de hemoglobinopatías en neonatos de Cali, Colombia. *Rev. GASTROHNUP* 15:54–57.

Silva JR, Malambo D, Silva DF, Fals Borda E, Fals O, Rey J. 1998. Tamizaje de hemoglobinopatías en una muestra de la población infantil de Cartagena. *Pediatr. (Santiago)*. 33:86–89.

Slatkin M. 2008. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat. Rev. Genet.* 9:477–485.

Smith E, McGettrick HM, Stone MA, Shaw JS, Middleton J, Nash GB, Buckley CD, Ed Rainger G. 2008. Duffy antigen receptor for chemokines and CXCL5 are essential for the recruitment of neutrophils in a multicellular model of rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 58:1968–1973.

Templeton AR. 2006. *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. 1st ed. Wiley L, editor. Hoboken, New Jersey.

Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero J, Padilla J, Arévalo-Herrera M, Herrera S. 2015. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar. J.* 14:201.

Voet D, Voet JG. 2006. *Bioquímica*. 3rd ed. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana.

WHO. 2017. Malaria. World Heal. Organ. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.

Williams TN. 2006. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:388–394.

Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Peto TEA, Weatherall DJ, Gupta S, Recker M, Penman BS, Uyoga S, Macharia A, et al. 2005. Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha-thalassemia and the sickle cell trait. *Nat. Genet.* 37:1253–1257.

Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson TJ, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau H, et al. 2012. Multiple independent introductions of Plasmodium

falciparum in South America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:511–516.

Zimmerman PA. 2004. The enigma of *Plasmodium vivax* malaria and erythrocyte Duffy negativity. In: Dronamraju KR, editor. *Infect. Dis. Host-Pathogen Evol.* 1st ed. Cambridge University Press. p. 141–172.

Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Puijalon O. 2013. Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to *Plasmodium vivax*. In: *Adv Parasitol.* Vol. 81. p. 27–76.