



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**ÁREA HEMATOLOGÍA**

**GENÉTICA MOLECULAR DE BETA TALASÉMICOS HETEROCIGOTAS.  
INTERRELACIÓN CON PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

**IRMA MARGARITA BRAGÓS**

**DIRECTORA: DRA. ANGELA CRISTINA MILANI**

**2001**



A mi padre,  
a la memoria de mi madre,  
a mi familia.

Parte del material presentado en este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- 1- Most frequent mutations in  $\beta$ -thalassemia in a population in Rosario, Argentina.

Bragós, I. Noguera, N. Morisoli, L. Milani, A.

(2000) Haematológica. 85, 101-102.

- 2- Modified Salting-Out Method for DNA Isolation From Newborn Cord Blood Nucleated Cells.

Noguera, N. Tallano, C. Bragós, I. Milani, A.

(2000) J Cl Lab Anal. 14, 280-283.

- 3- Prevalence of  $-\alpha^{3,7}$  Thalassemia in Argentina.

Noguera, N. Bragós, I. Milani, A.

(2002) Hemoglobin. 26:1(en prensa).

y presentaciones en los congresos de la Sociedad Argentina de Hematología (Carlos Paz 1997, Mar del Plata 1999 y Mar del Plata 2001), de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Barcelona 1997), de la Agrupación de Sociedades de Hematología del Mercosur (Punta del Este-Uruguay 1998), de la Sociedad Argentina de Genética (Rosario 1999), de la Agrupación de Farmacéuticos y Bioquímicos (Florianópolis-Brasil 2000) y de la División Iberoamericana de la Sociedad Internacional de Hematología (La Habana-Cuba 2001).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la profesora Dra. Angela Cristina Milani, directora de esta Tesis Doctoral, por haberme brindado desinteresadamente su experiencia, estimulado, aconsejado y facilitado en todo momento la realización de este trabajo.

A la profesora Dra. María Cristina Rosatelli, directora del laboratorio de Genética Prenatal del Instituto de Clínica y Biología de la Universidad de Estudios de Cagliari, Italia, por haberme permitido realizar una pasantía en el laboratorio a su cargo y por ofrecerme muestras testigo de las mutaciones estudiadas.

A mi compañera Nélide Inés Noguera por su amistad, su incansable empuje y tantas horas de trabajo compartidas.

A todos los demás compañeros del Area Hematología, Héctor Rodríguez, Germán Detarsio, Arianna Pratti, Olga Lanza, Susana Pérez, Irma Acosta, Rubén Davoli, por su colaboración en la obtención de datos utilizados en este trabajo.

A Claudia y a Mariana por su compañerismo, su sentido del humor.

A la Doctora Lidia Morisoli, por su constante estímulo.

A las estadísticas Liliana Racca y Laura Gutiérrez por el análisis estadístico del presente trabajo de tesis.

## ABREVIATURAS

Ác	ácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ASB	albúmina sérica bovina
C	citosa
°C	grados centígrados
CD	codon
CHCM	concentración de hemoglobina corpuscular media
C <sub>i</sub>	concentración inicial
C <sub>f</sub>	concentración final
csp	cantidad suficiente para
dl	decilitro
DE	desviación estándar
dATP	2' desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	2' desoxicitosina 5' trifosfato
dGTP	2' desoxiguanosina 5' trifosfato
dNTP's	2' desoxirribonucleótidos 5' trifosfato
dTTP	2' desoxitimidina 5' trifosfato
DPG	difosfoglicerato

DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
Ej	ejemplo
F	fetal
fL	femtolitro
G	guanina
g	gramo
GR	glóbulos rojos
Hb	hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular media
Hto	hematocrito
hs	horas
IVS	intron
kb	kilo bases
l	litro
LCR	región de control de locus
M	molar
ml	mililitro
min	minuto
μl	microlitro
μg	microgramo
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-ARMS	<i>PCR-Amplification refractory mutation system</i>

pg	picogramos
PHHF	persistencia hereditaria de hemoglobina fetal
PM	peso molecular
%	porcentaje
Ret	reticulocitos
rpm	revoluciones por minuto
SDS	sodio dodecil sulfato
seg	segundos
T	timina
th	talasemia
UV	ultravioleta
U	unidades
V	voltios
VCM	volumen corpuscular medio
X	media aritmética

## ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1.1	Recuerdo histórico	Pág. 3
1.1.1	Estructura de la hemoglobina	Pág. 4
1.1.2	Función de la hemoglobina	Pág. 6
1.1.3	Historia de la Biología Molecular	Pág. 7
1.1.4	Primeras descripciones de hemoglobinas anormales y talasemias	Pág. 12
1.2	Hemoglobinas fisiológicas	Pág. 14
1.2.1	Hemoglobinas del embrión y del feto	Pág. 15
1.2.2	Hemoglobinas del recién nacido y del adulto	Pág. 16
1.2.2.1	Hemoglobina fetal	Pág. 16
1.2.2.2	Hemoglobina de Bart	Pág. 18
1.2.2.3	Hemoglobina A	Pág. 18
1.2.2.4	Hemoglobina A2	Pág. 19
1.3	Organización y estructura de los genes globínicos	Pág. 20
1.3.1	Organización del cluster $\beta$ y $\alpha$ globina	Pág. 21
1.3.2	Estructura de los genes $\beta$ globínicos	Pág. 24
1.3.2.1	Región promotora	Pág. 25
1.3.2.2	Gen estructural	Pág. 26
1.3.2.3	Región de poliadenilación	Pág. 27
1.3.2.4	Secuencias reguladoras	Pág. 27
1.4	Expresión de los genes $\beta$ globina	Pág. 28
1.4.1	Transcripción	Pág. 28
1.4.2	Procesamiento del pre-ARNm	Pág. 29

1.4.3	Traducción	Pág. 30
1.5	Regulación de la síntesis de globina	Pág. 31
1.6	Ensamblaje de las unidades de globina	Pág. 32
1.7	Alteraciones en la síntesis y secuencia de cadenas de globina	Pág. 33
1.7.1	TALASEMIAS	Pág. 35
1.7.1.1	$\beta$ -Talasemias	Pág. 35
1.7.1.1.1	Formas clínicas	Pág. 35
	Rasgo talasémico o talasemia menor	Pág. 35
	Talasemia mayor o anemia de Cooley	Pág. 36
	Talasemia intermedia	Pág. 37
1.7.1.1.2	Base molecular de las $\beta$ talasemias	Pág. 37
1.7.1.1.2.1	Relación entre la alteración molecular y el fenotipo	Pág. 40
	Mutaciones en la transcripción	Pág. 40
	Mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm	Pág. 41
	Mutaciones en el proceso de traducción	Pág. 46
	Deleciones que producen $\beta^0$ talasemia	Pág. 47
	$\beta$ - $\beta^0$ talasemias debidas a mutaciones desconocidas	Pág. 49
1.7.1.2	Hemoglobinopatías talasémicas	Pág. 49
1.7.1.3	$\alpha$ Talasemias	Pág. 51
	Deleciones causantes de $\alpha^+$ -talasemias	Pág. 51
	Deleciones causantes de $\alpha^0$ -talasemias	Pág. 52
	Mutaciones puntuales causantes de $\alpha$ - talasemias	Pág. 53
1.8	Distribución geográfica de la $\beta^0$ y $\alpha$ - talasemia	Pág. 53

<b>1.9</b>	<b>OBJETIVOS</b>	Pág. 56
<b>2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1	Sujetos de estudio	Pág. 57
2.1.1	Sujetos normales	Pág. 57
2.1.2	Sujetos talasémicos	Pág. 57
2.2	Protocolo de estudio	Pág. 58
2.3	Técnicas empleadas	Pág. 59
2.3.1	Recolección de muestras y conservación	Pág. 59
2.3.2	Estudio hematimétrico	Pág. 59
2.3.3	Recuento de reticulocitos	Pág. 60
2.3.4	Morfología eritrocitaria	Pág. 60
2.3.5	Dosaje de hierro	Pág. 60
2.3.6	Capacidad de saturación de la siderofilina	Pág. 60
2.3.7	Determinación de ferritina	Pág. 61
2.3.8	Electroforesis de hemoglobinas en acetato de celulosa (pH: 9,0)	Pág. 61
2.3.9	Electroforesis de hemoglobinas en agar-citrato (pH: 6,0)	Pág. 62
2.3.10	Cuantificación de hemoglobinas	Pág. 62
2.3.11	Cuantificación de hemoglobina fetal	Pág. 63
2.3.12	Cuerpos de inclusión	Pág. 63
2.3.13	Prueba de termoestabilidad	Pág. 64
2.3.14	Test de anaerobiosis	Pág. 64
2.4	Técnicas de biología molecular	Pág. 64
2.4.1	Extracción de ADN	Pág. 64
2.4.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Pág. 66

2.4.2.1	Estudio de $\beta$ talasemia	Pág. 66
2.4.2.2	Estudio del gen alfa $\square$	Pág. 69
2.4.2.2.1	Delección $-\alpha^{3,7}$	Pág. 69
2.4.2.2.2	Triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$ anti <sup>3,7</sup> )	Pág. 71
2.5	Análisis estadístico	Pág. 72
2.5.1	Estudio comparativo de los genotipos talasémicos $\beta^0$ y $\beta^+$ en hombres, mujeres $\leq 50$ años y $> 50$ años y niños.	Pág. 72
2.5.2	Estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados	Pág. 72
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	
3.1	Sujetos normales	Pág. 73
3.1.1	Patrón de Hierro	Pág. 73
3.1.2	Dosaje de Hemoglobina Fetal y de Hemoglobina A <sub>2</sub>	Pág. 74
3.2	Sujetos talasémicos	Pág. 74
3.2.1	Análisis por biología molecular y morfología eritrocitaria de las distintas mutaciones	Pág. 75
3.2.1.1	Procesamiento del ARNm	Pág. 76
3.2.1.1.1	Zonas Consenso y <i>Splice junction</i>	Pág. 76
3.2.1.1.2	Intrones	Pág. 81
3.2.1.2	Traducción. Mutación sin sentido	Pág. 84
3.3	Heterogeneidad molecular de la $\beta$ -talasemia	Pág. 84
3.3.1	Procesamiento del ARNm. Proceso de <i>splicing</i>	Pág. 86
3.3.1.1	Zonas consenso y <i>Splice junction</i>	Pág. 86
3.3.1.2	Intrones	Pág. 86

3.3.2	Traducción. Mutación sin sentido	Pág. 86
3.3.3	Mutaciones Desconocidas	Pág. 86
3.4	Sujetos $\beta$ -talasémicos heterocigotas ( $\beta^a/\beta^+$ o $\beta^0$ ) con valores de HbA2 $\geq 4\%$ y de Hb F $< 5\%$ (talasemia menor)	Pág. 88
3.4.1	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 88
3.4.2	Metabolismo Férrico	Pág. 89
3.4.3	Estudio Hematimétrico	Pág. 92
3.4.4	Recuento de Reticulocitos	Pág. 94
3.5	Asociación de $\alpha$ -talasemia heterocigota con delección $-\alpha^{3,7}$	Pág. 95
3.5.1	Estudio Hematimétrico	Pág. 95
3.5.2	Recuento de reticulocitos	Pág. 96
3.5.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 96
3.5.4	Metabolismo Férrico	Pág. 96
3.5.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 97
3.5.5.1	Estudio de $\alpha$ -talasemia	Pág. 97
3.5.5.2	Estudio de $\alpha$ talasemia ( $-\alpha^{3,7}$ )	Pág. 97
3.5.6	Morfología eritrocitaria	Pág. 98
3.6	Asociación de $\alpha$ -talasemia heterocigota con triplicación de genes $\alpha$ ( $\alpha\alpha\alpha$ anti $^{3,7}$ )	Pág. 98
3.6.1	Estudio Hematimétrico	Pág. 98
3.6.2	Recuento de reticulocitos	Pág. 99
3.6.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 99
3.6.4	Metabolismo Férrico	Pág. 99
3.6.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 100

3.6.5.1	Estudio de $\beta^0$ talasemia	Pág. 100
3.6.5.2	Estudio de triplicación de genes $\alpha$ ( $\alpha\alpha$ anti <sup>3,7</sup> )	Pág. 100
3.6.6	Morfología eritrocitaria	Pág. 101
3.7	Sujetos portadores de $\delta\beta$ talasemia	Pág. 102
3.7.1	Estudio Hematimétrico	Pág. 102
3.7.2	Recuento de reticulocitos	Pág. 102
3.7.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 102
3.7.4	Metabolismo Férrico	Pág. 103
3.7.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 103
3.7.5.1	Estudio de $\beta^0$ talasemia	Pág. 103
3.7.6	Morfología eritorcitaria	Pág. 104
3.8	Sujeto con doble heterocigosis $\beta^0$ tal/Hb S	Pág. 104
3.8.1	Estudio Hematimétrico	Pág. 104
3.8.2	Recuento de reticulocitos	Pág. 105
3.8.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 105
3.8.4	Metabolismo Férrico	Pág. 105
3.8.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 106
3.8.5.1	Estudio de $\beta$ talasemia	Pág. 106
3.8.6	Morfología eritrocitaria	Pág. 106
3.9	Doble heterocigosis $\beta^+ \beta^0$ talasemia	Pág. 107
3.9.1	Estudio Hematimétrico	Pág. 107
3.9.2	Recuento de reticulocitos	Pág. 107
3.9.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 107
3.9.4	Metabolismo Férrico	Pág. 108

3.9.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 108
3.9.5.1	Estudio de $\beta^0$ talasemia	Pág. 108
3.9.6	Morfología eritrocitaria	Pág. 109
3.10	Análisis estadístico	Pág. 110
3.10.1	Estudio comparativo de los genotipos talasémicos $\beta^0$ y $\beta^+$ en hombres, mujeres $\leq 50$ años y $> 50$ años y niños.	Pág. 110
3.10.1.1	Glóbulos Rojos	Pág. 111
3.10.1.2	Hemoglobina	Pág. 112
3.10.1.3	Hematocrito	Pág. 113
3.10.1.4	Volumen corpuscular medio (VCM)	Pág. 114
3.10.1.5	Hemoglobina corpuscular media (HCM)	Pág. 115
3.10.1.6	Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	Pág. 116
3.10.1.7	Hemoglobina A <sub>2</sub>	Pág. 117
3.10.1.8	Hemoglobina F	Pág. 118
3.10.1.9	Reticulocitos	Pág. 118
3.10.2	Estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados	Pág. 119
3.10.2.1	Volumen corpuscular medio (VCM)	Pág. 120
3.10.2.2	Hemoglobina corpuscular media (HCM)	Pág. 120
3.10.2.3	Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	Pág. 121
3.10.2.4	Hemoglobina A <sub>2</sub>	Pág. 121
3.10.2.5	Hemoglobina F	Pág. 122
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	
4.1	Discusión de los resultados	Pág. 123

4.1.1	Estudio de sujetos normales (grupo control)	Pág. 123
4.1.1.1	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 124
4.1.1.2	Patrón Férrico	Pág. 124
4.1.1.3	Análisis por Biología Molecular	Pág. 124
4.2	Heterogeneidad molecular de la $\beta$ -talasemia	Pág. 125
4.2.1	Grupo de pacientes sin identificación molecular	Pág. 128
4.3	Genética molecular de $\beta$ talasémicos heterocigotas. Interrelación con parámetros hematológicos	Pág. 129
4.3.1	Estudio hematimétrico	Pág. 129
4.3.2	Recuento de Reticulocitos	Pág. 131
4.3.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 131
4.3.4	Metabolismo férrico	Pág. 133
4.4	Causas de las diferencias fenotípicas observadas en portadores talasémicos que presentan la misma mutación	Pág. 133
4.4.1	Asociación de $\beta$ -talasemia heterocigota con delección $-\alpha^{3,7}$	Pág. 133
4.4.1.1	Estudio hematimétrico	Pág. 134
4.4.1.2	Recuento de Reticulocitos	Pág. 135
4.4.1.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 135
4.4.1.4	Metabolismo férrico	Pág. 135
4.4.1.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 135
4.4.2	Asociación de $\beta$ -talasemia heterocigota con triplicación de genes $\alpha$ ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$ )	Pág. 136
4.4.2.1	Estudio hematimétrico	Pág. 137
4.4.2.2	Recuento de Reticulocitos	Pág. 138

4.4.2.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 139
4.4.2.4	Metabolismo férrico	Pág. 139
4.4.2.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 139
4.4.3	Sujetos portadores de $\delta\beta$ talasemia	Pág. 140
4.4.3.1	Estudio hematimétrico	Pág. 141
4.4.3.2	Recuento de Reticulocitos	Pág. 142
4.4.3.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 142
4.4.3.4	Metabolismo férrico	Pág. 142
4.4.3.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 143
4.4.4	Paciente con doble heterocigosis $\beta^0$ th / Hb S	Pág. 144
4.4.4.1	Estudio hematimétrico	Pág. 145
4.4.4.2	Recuento de Reticulocitos	Pág. 145
4.4.4.3	Cuantificación de Hemoglobinas	Pág. 145
4.4.4.4	Metabolismo férrico	Pág. 146
4.4.4.5	Análisis por Biología Molecular	Pág. 146
4.4.5	Paciente con doble heterocigosis $\beta^0/\beta^+$	Pág. 147
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	Pág. 148
<b>5</b>	<b>RESUMEN</b>	Pág. 150
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	Pág. 159

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Mecanismos responsables de $\beta$ talasemia	Pág. 39
Tabla 1.2	Mutaciones encontradas en el Mediterráneo	Pág. 43
Tabla 2.1	Secuencias de oligonucleótidos <i>primers</i> PCR-ARMS	Pág. 67
Tabla 3.1	Dosaje de hierro sérico, capacidad total de saturación de la siderofilina, % de saturación y Ferritina sérica en individuos normales.	Pág. 73
Tabla 3.2	Hemoglobina F y hemoglobina A <sub>2</sub> . Tendencia central y variación en individuos normales.	Pág. 74
Tabla 3.3	Frecuencia y tipos de mutaciones responsables de $\beta$ -talasemia identificadas en este trabajo.	Pág. 87
Tabla 3.4	Hemoglobina A <sub>2</sub> . Tendencia central y variación en varones, mujeres $\leq 50$ años, mujeres $> 50$ años y niños portadores de $\beta^0$ talasemia ( $\beta^0/\beta^0$ )	Pág. 88
Tabla 3.5	Hemoglobina F. Tendencia central y variación en varones, mujeres $\leq 50$ años, mujeres $> 50$ años y niños portadores de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^0$ )	Pág. 89
Tabla 3.6	Patrón férrico. Tendencia central y variación en varones portadores de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^0$ )	Pág. 90
Tabla 3.7	Patrón férrico. Tendencia central y variación en mujeres $\leq 50$ años portadoras de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^0$ )	Pág. 90
Tabla 3.8	Patrón férrico. Tendencia central y variación en mujeres $> 50$ años portadoras de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^0$ )	Pág. 91

Tabla 3.9	Patrón férrico. Tendencia central y variación en niños portadores de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^{0\Box\Box}$ )	Pág. 91
Tabla 3.10	Estudio hematimétrico. Tendencia central y variación en varones portadores de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^{0\Box\Box}$ ) $\Box\Box$	Pág. 92
Tabla 3.11	Estudio hematimétrico. Tendencia central y variación en mujeres $\leq 50$ años portadoras de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^{0\Box\Box}$ ) $\Box\Box$	Pág. 93
Tabla 3.12	Estudio hematimétrico. Tendencia central y variación en mujeres $> 50$ años portadoras de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^{0\Box\Box}$ ) $\Box\Box$	Pág. 93
Tabla 3.13	Estudio hematimétrico. Tendencia central y variación en niños portadores de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^{0\Box\Box}$ )	Pág. 94
Tabla 3.14	Recuento de reticulocitos. Tendencia central y variación en varones, mujeres $\leq 50$ años, mujeres $> 50$ años y niños portadores de $\beta$ talasemia ( $\beta^+$ o $\beta^{0\Box\Box}$ ) $\Box\Box$	Pág. 95
Tabla 3.15	Estudio hematimétrico. Asociación $\beta^{\Box}$ -talasemia heterocigota y delección $-\alpha^{\Box3,7}$	Pág. 96
Tabla 3.16	Patrón férrico. Asociación $\beta^{\Box}$ -talasemia heterocigota y delección $-\alpha^{\Box3,7}$	Pág. 96
Tabla 3.17	Estudio hematimétrico. Asociación $\Box$ -talasemia heterocigota y triplicación de genes $\alpha(\alpha\alpha\alpha$ anti $^{3,7})$	Pág. 99
Tabla 3.18	Patrón férrico. Asociación $\Box$ -talasemia heterocigota y triplicación de genes $\alpha(\alpha\alpha\alpha$ anti $^{3,7})$	Pág. 99
Tabla 3.19	Estudio hematimétrico. $\delta\beta$ -talasemia heterocigota	Pág. 102
Tabla 3.20	Patrón férrico. $\delta\beta$ -talasemia heterocigota	Pág. 103

Tabla 3.21	Estudio hematimétrico. Doble heterocigosis $\beta$ th/ $\alpha$ S	Pág. 105
Tabla 3.22	Patrón férrico. Doble heterocigosis $\beta$ th/ $\alpha$ S	Pág. 105
Tabla 3.23	Estudio hematimétrico. Doble heterocigoto ( $\beta^+$ $\alpha$ $\beta^0$ ) y sus padres	Pág. 107
Tabla 3.24	Patrón férrico. Doble heterocigoto ( $\beta^+$ $\alpha$ $\beta^0$ )	Pág. 108
Tabla 3.25	Tamaño de las muestras utilizadas en este estudio	Pág. 110
Tabla 3.26	Valores medios y errores estándar en el recuento de glóbulos rojos ( $\times 10^{12}/l$ ) de los individuos talasémicos	Pág. 111
Tabla 3.27	Valores medios y errores estándar en el dosaje de hemoglobina (g/dl) de los individuos talasémicos	Pág. 102
Tabla 3.28	Valores medios y errores estándar en la medición del hematocrito (%) de los individuos talasémicos	Pág. 113
Tabla 3.29	Valores medios y errores estándar en la medición del VCM (fL) de los individuos talasémicos	Pág. 114
Tabla 3.30	Valores medios y errores estándar en la medición del HCM (pg) de los individuos talasémicos	Pág. 115
Tabla 3.31	Valores medios y errores estándar en la medición de CHCM (g/dl) de los individuos talasémicos	Pág. 116
Tabla 3.32	Valores medios y errores estándar en la medición de Hb A <sub>2</sub> (%) de los individuos talasémicos	Pág. 117
Tabla 3.33	Valores medios y errores estándar en la medición de Hb F (%) de los individuos talasémicos	Pág. 118
Tabla 3.34	Valores medios y errores estándar en el recuento de reticulocitos (%) de los individuos talasémicos	Pág. 118

Tabla 3.35	Tamaño muestral de las distintas mutaciones de beta talasémicos	Pág. 119
Tabla 3.36	Valores medios y errores estándar de VCM (fL) para de las distintas mutaciones de beta talasémicos	Pág. 120
Tabla 3.37	Valores medios y errores estándar de HCM (pg) para de las distintas mutaciones de beta talasémicos	Pág. 120
Tabla 3.38	Valores medios y errores estándar de CHCM (g/dl) para de las distintas mutaciones de beta talasémicos	Pág. 121
Tabla 3.39	Valores medios y errores estándar de Hb A2 (%) para de las distintas mutaciones de beta talasémicos	Pág. 121
Tabla 3.40	Valores medios y errores estándar de Hb F (%) para de las distintas mutaciones de beta talasémicos	Pág. 122
Tabla 4.1	Parámetros hematimétricos en $\beta$ talasémicos heterocigotas con triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$ anti <sup>3,7</sup> ) (Traeger-Synodinos)	Pág. 137

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Síntesis de los distintos tipos de hemoglobinas a lo largo del desarrollo humano	Pág. 16
Figura 1.2	Control genético de la hemoglobina humana	Pág. 20
Figura 1.3	<i>Cluster</i> $\beta$ globina en el cromosoma 11	Pág. 22
Figura 1.4	Formación de la hemoglobina Lepore durante la meiosis	Pág. 24
Figura 1.5	Gen de $\beta$ globina	Pág. 25
Figura 1.6	Esquema del proceso de biosíntesis de la cadena $\alpha$ globina	Pág. 29
Figura 1.7	Detalle del proceso de splicing y formación de lariat	Pág. 30
Figura 1.8	Tres deleciones en el <i>cluster</i> del gen $\beta$ globina	Pág. 48
Figura 3.1	PCR-ARMS. Mutación IVS I-nt1	Pág. 76
Figura 3.2	PCR-ARMS. Mutación IVS I-nt 6	Pág. 77
Figura 3.3	PCR-ARMS. Mutación IVS II-nt1	Pág. 78
Figura 3.4	Morfología eritrocitaria: portador de IVS I-nt 1	Pág. 79
Figura 3.5	Morfología eritrocitaria: portador de IVS I-nt 6	Pág. 79
Figura 3.6	Morfología eritrocitaria: portador de IVS II-nt1	Pág. 80
Figura 3.7	PCR-ARMS. Mutación IVS I-nt110	Pág. 81
Figura 3.8	PCR-ARMS. Mutación IVS II-nt745	Pág. 82
Figura 3.9	Morfología eritrocitaria: portador de IVS I-nt 110	Pág. 83
Figura 3.10	Morfología eritrocitaria: portador de IVS II-nt 745	Pág. 83
Figura 3.11	PCR-ARMS. Mutación CD39	Pág. 84
Figura 3.12	Morfología eritrocitaria: portador de CD39	Pág. 85
Figura 3.13	PCR alelo específica. Deleción heterocigota $-\alpha^{3,7}$	Pág. 97

Figura 3.14	Morfología eritrocitaria: asociación $\beta^0 39 / -\alpha^{3,7}$	Pág. 98
Figura 3.15	PCR alelo específica. Triplicación heterocigota $\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$	Pág. 100
Figura 3.16	Morfología eritrocitaria: asociación $\beta^+ \text{II-745} / \alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$	Pág. 101
Figura 3.17	Morfología eritrocitaria: asociación $\beta^0 39 / \alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$	Pág. 101
Figura 3.18	Morfología eritrocitaria: portador de $\delta\beta$ talasemia	Pág. 104
Figura 3.19	Morfología eritrocitaria: doble heterocigosis $\beta^0 39 / \text{Hb S}$	Pág. 106
Figura 3.20	PCR-ARMS. Doble heterocigosis $\square^+ \text{I-110} / \beta^0 39$	Pág. 108
Figura 3.21	Morfología eritrocitaria: doble heterocigota $\beta^+ \text{I-110} / \beta^0 39$	Pág. 109



## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hereditarias se conocen desde siglos, los griegos ya hablaban de ellas y en el siglo XIX el agustino Gregorio Mendel descubre las leyes que rigen la herencia biológica.

Debido al gran interés que alguna de estas enfermedades suscitaron, los científicos y los clínicos aunaron sus conocimientos para saber el origen de ellas, así los descubrimientos de unos contribuyeron a mejorar la capacidad diagnóstica de los clínicos, aclarando incluso factores genéticos responsables de muchas enfermedades.

Como resultado de sus investigaciones hoy se sabe que, aunque raras, la mayoría de las enfermedades hereditarias se deben a la mutación recesiva de un gen, quedando su origen demostrado debido a que los afectados por este tipo de enfermedades monogénicas se agrupan en familias, con una distribución mendeliana en las generaciones.

Los síndromes talasémicos constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades autosómicas, están presentes en millones de personas y constituyen a nivel mundial el trastorno genético más frecuente. Se caracterizan por la ausencia o disminución de una o más cadenas normales de globina constituyentes de la hemoglobina.

En la mayoría de estos síndromes, la detección del portador suele ser fácil, ya que presenta un fenotipo morfológico de manifiesta microcitosis.

Hasta la fecha han sido descritas casi 200 mutaciones en pacientes con  $\beta$  talasemia, esta heterogeneidad genética explicaría en parte, la variabilidad clínica de estos desórdenes.

El diagnóstico puede ser confirmado por la identificación de la mutación en el gen de  $\beta$  globina mediante el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN). La identificación de las diferentes mutaciones se ha visto mejorada en los últimos años al desarrollarse nuevos métodos de laboratorio basados principalmente en la amplificación del gen de  $\beta$  globina, mediante el empleo de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las

mutaciones conocidas son detectadas directamente por electroforesis, análisis con endonucleasas de restricción, *dot-blot* con sondas específicas para cada mutación, mientras que las desconocidas son definidas por electroforesis en un gel de gradiente desnaturizante (DGGE) o mediante el análisis del polimorfismo de cadenas sencillas (SSCP) seguido de una secuenciación directa.

## 1.1 RECUERDO HISTÓRICO

El interés por la sangre se conoce desde Hipócrates (Siglo IV AC) cuando ésta era considerada como uno de los cuatro humores que constituían la Naturaleza. Es con Galeno (Siglo II DC) cuando es aceptada como uno de los componentes del cuerpo humano, la cual definía el espíritu vital, radicando éste en el corazón, quien en última instancia era responsable de la circulación sanguínea. En 1538 Miguel Servet observó y completó la circulación pulmonar de la sangre <sup>(1)</sup>.

Desde entonces, los conocimientos sobre la función, composición y enfermedades de la sangre se han sucedido, y así en 1932 se utiliza por primera vez el término TALASEMIA para definir un tipo de anemia muy frecuente en cierta población cercana al mar, de ahí su nombre, talasemia, que procede del griego (*thalassa* y *haima*) y que significa "mar y sangre".

En su descripción original el "mar" se refería al Mar Negro, aunque posteriormente se ha hecho extensiva a otro mar, el Mediterráneo, en cuyo litoral también es frecuente esta enfermedad.

Para comprender mejor las talasemias, es necesario abordar la estructura y función de la hemoglobina (Hb), cómo se ha llegado al conocimiento actual de las alteraciones genéticas así como los primeros casos de hemoglobinas anormales y talasemias descritos en la literatura.

### 1.1.1 ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

En 1862, Félix Hopper-Seyler mediante métodos espectroscópicos estableció el papel del pigmento rojo de la sangre para unirse al oxígeno. Dos años más tarde, en 1864 logra cristalizar por primera vez una proteína, el mismo pigmento rojo de la sangre, a la que dio el nombre de HEMOGLOBINA <sup>(2)</sup>.

Teichmann, en 1872 separó el HEMO de la hemoglobina tratando la sangre con ácido acético glacial, obteniendo cristales rojo-marrones (HEMINA), los cuales contenían hierro.

La química orgánica, conforme fueron perfeccionándose los métodos analíticos, comenzó a adquirir nuevas dimensiones. A principio de siglo, debido a que los compuestos químicos eran considerados como "la materia de la vida" hicieron que los adelantos más relevantes se logaran en esta disciplina científica, y así, en 1912 Kuster estableció la estructura del hemo, y en 1919 fue sintetizado por Hans Fischer encontrándose no solamente en la hemoglobina como grupo prostético, sino también en otras proteínas respiratorias como la mioglobina y formando parte de los citocromos. El conocimiento de la naturaleza del grupo prostético, hizo posible un entendimiento mas completo de su relación con la proteína <sup>(3)</sup>.

G.S. Adair en 1920 apoyándose en el gran avance que la Bioquímica había llevado a cabo en técnicas para medir el tamaño molecular, desarrolla las membranas coloidales permeables al agua y sal pero no a la hemoglobina logrando determinar su peso molecular (PM) mediante la valoración de la presión osmótica. Estableció un PM de 67.000 daltons, que fue corroborado por Svederg mediante centrifugación analítica, con una diferencia de solo 1.000 daltons; la estimación de su PM sugirió a los científicos que la Hb era una molécula uniforme, compuesta de cuatro subunidades conteniendo cada una de ellas un grupo Hemo <sup>(4)</sup>.

En 1945 Brand describe el primer análisis completo de aminoácidos de una proteína mediante métodos químicos mientras que en 1949 fueron Stein y Moore quienes comunican el mismo análisis pero efectuado con una columna cromatográfica de almidón. Comienzan de

esta forma a desarrollarse toda una serie de técnicas para determinar la estructura de las proteínas, las cuales serán utilizadas por Ingram en 1956 para determinar la estructura de la hemoglobina mediante separación de los péptidos producidos después de que la globina fuera hidrolizada con tripsina que rompe los enlaces peptídicos a nivel de los residuos de Lisina-Arginina (mapa peptídico). Del número de residuos obtenidos se llegó a la conclusión de que la hemoglobina estaba constituida por dos mitades idénticas <sup>(5)</sup>.

En 1957, Rhinesmith, Schroeder y Pauling así como Braunitzer, indicaron que la hemoglobina era un tetrámero, compuesto de dos cadenas polipeptídicas distintas, a las que denominaron  $\alpha$  y  $\beta$  asumiéndose que cada cadena estaba pegada a un grupo Hemo.

Las inquietudes por conocer más sobre la estructura de las proteínas hizo que se desarrollaran nuevas y más avanzadas técnicas para deducirla, de esta forma Stein, Moore y Spackman en 1958 describen el autoanalizador de aminoácidos, acelerando el análisis de las proteínas <sup>(6)</sup>. En los años 60 se logra establecer la secuencia de aminoácidos en las cadenas de globina humanas normales (estructura primaria) llevada a cabo por Braunitzer, Konigsberg, Hill y Schroeder. Estos autores, basándose en el método del 2,4-dinitrofluorobenceno desarrollado por Sanger en 1949 y en el del fenilisotiocianato de Edman de 1950 logran separar los péptidos e identificar los aminoácidos que componen cada péptido <sup>(2)</sup>.

La determinación de la estructura tridimensional de la oxi y desoxihemoglobina es puesta de manifiesto por Max Perutz y col., quienes mediante difracción con rayos X demostraron que la conformación de la hemoglobina variaba al unirse al oxígeno. Esto le permitió a Perutz explicar propiedades funcionales de la hemoglobina, tales como el efecto Bohr, interacción con fosfatos orgánicos y la unión cooperativa con el oxígeno, así como la estructura de variantes anormales, responsables de diversas anomalías clínicas <sup>(7,8)</sup>.

### 1.1.2 FUNCIÓN DE LA HEMOGLOBINA

Una de las mayores inquietudes era descubrir su papel fisiológico y a medida que se profundizaba en los conocimientos de su estructura se iban despejando incógnitas en relación con su intervención en el transporte de oxígeno y CO<sub>2</sub>, así como en sus mecanismos moleculares.

De esta forma comienza el siglo XX, cuando se intenta analizar cuantitativamente la unión reversible del oxígeno a la hemoglobina. Es Christian Bohr en 1904 quien puso de manifiesto el carácter sigmoide de la curva de disociación de la hemoglobina, siendo la posición de la curva sensible a los cambios de presión de CO<sub>2</sub>. Esta curva fue comprobada por Krogh, pero hasta que las técnicas no mejoraron, no fue definitivamente establecida por Joseph Barcroft en 1928.

La base física de esta curva fue expresada en forma de ecuación matemática por A.V. Hill. Esta ecuación que tiene un valor predictivo sobre la interacción entre las subunidades de hemoglobina, fue formulada en una época en la que hasta su peso molecular era aún desconocido. Otras ecuaciones fueron descritas por G.S. Adair en 1925, las cuales definían la unión de ligandos a la hemoglobina <sup>(2)</sup>.

En 1936 Linus Pauling predijo la naturaleza de la unión del oxígeno al hemo, considerando el comportamiento cooperativo de la hemoglobina como un problema químico. Razonó que la unión del oxígeno a uno de los grupos hemo en el tetrámero, ocasionaba una alteración estructural de la proteína, provocando que el resto de los hemo presentaran más afinidad por el oxígeno, lo que puede considerarse como el primer modelo alostérico de la función de la hemoglobina.

El aumento de datos sobre el sistema CO<sub>2</sub>/CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> como solución tampón y sistema de excreción de ácidos permitió a Bohr, Hasselbalch y Krogh interpretar que el mayor efecto del CO<sub>2</sub> sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno era a través del cambio que provoca

en el pH, de tal forma que la dependencia que tiene la curva de disociación de la hemoglobina por el pH, se conoce universalmente como efecto Bohr <sup>(9)</sup>.

L.J. Henderson también trabajó con Hasselbalch poniendo de manifiesto la relación entre la tensión de CO<sub>2</sub>, y la concentración de H<sup>+</sup>/CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> en sangre, plasmándolo en una fórmula que lleva su nombre.

Hoy se sabe que los cambios en las distintas moléculas de la hemoglobina responden a las necesidades de adaptación a los distintos requerimientos de oxígeno durante el desarrollo.

### **1.1.3 HISTORIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR**

Los genetistas intentaron describir dónde estaba y qué era el material genético, así como el mecanismo mediante el cual este material conduce al desarrollo del correspondiente fenotipo.

Tres etapas perfectamente definidas pueden establecerse al respecto dentro de la trayectoria de la investigación genética hasta mediados de los años 70, fecha a partir de la cual se considera el nacimiento de la Ingeniería Genética.

La primera corresponde a los años que siguen al redescubrimiento por parte de Correns, Uries y Tschermak de las leyes de Mendel en 1900, en la cual el material genético es considerado como un elemento hipotético, denominándose factores a algo que debía existir en las células reproductoras responsable de la transmisión de los caracteres hereditarios. Se desconoce su naturaleza química e incluso su correcta localización. El *Factor* es casi una entelegma que se conoce sólo por sus efectos.

El segundo período se inicia aproximadamente una década más tarde cuando Johansen da el nombre de genes a los factores que controlan la herencia de los caracteres y gracias a los trabajos del norteamericano Morgan y su escuela, ve la luz la teoría cromosómica de la herencia, que establece las bases citológicas de la misma llegando a la conclusión de que los

genes son algo material situado en los cromosomas. Pero sigue sin conocerse su naturaleza y mediante cuáles mecanismos logran desarrollar el fenotipo que controlan.

La tercera etapa, que comprende hasta las dos últimas décadas, orienta la investigación genética a conocer la naturaleza y estructura química de los genes.

Entre 1925 y 1930, Levene deduce la estructura de los mononucleótidos y muestra su condición de sillares estructurales de los ácidos nucleicos, y en 1927 es cuando Muller y Stadler hablan por primera vez de mutaciones, demostrando que los genes por acción de los rayos X pueden mutar artificialmente <sup>(10)</sup>.

Warburg y Euler en 1936 aíslan y determinan la estructura y acciones de los nucleótidos pirimidínicos y ya en la década del 40 George Beadle y Edward Tatum deducen la relación: un gen, una proteína <sup>(11)</sup>. La hipótesis de un gen para cada proteína se generalizó algunos años después, cuando Pauling y col. demostraron que la anemia falciforme era debida a moléculas químicamente alteradas (mutadas) de hemoglobina, al descubrir que esta hemoglobina difería en su comportamiento electroforético de la hemoglobina de individuos normales, creando el concepto de enfermedad molecular <sup>(12)</sup>.

A mediados del siglo XX E. Chargaff y col, al aplicar técnicas cromatográficas cuantitativas para la separación y análisis de las cuatro bases contenidas en muestras hidrolizadas de ADN aisladas de diferentes microorganismos, logran descubrir la equivalencia de bases de ADN <sup>(13)</sup>. Basándose en este hallazgo y en los datos obtenidos mediante rayos X por Franklin y Wilkins, en 1953 J.D. Watson y F.H. Crick postularon un modelo de doble hélice complementaria para la estructura tridimensional del ADN <sup>(14,15)</sup>.

La existencia de proteínas mutantes con sustitución de un solo aminoácido se descubrió en la hemoglobina de los afectados por la anemia falciforme como enfermedad hereditaria. Fue Vernon Ingram <sup>(16)</sup> quien en 1957 analizó las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la

hemoglobina de los adultos, encontrando diferencias en la cadena  $\beta$ . Este descubrimiento sugirió que muchas mutaciones podrían representar cambios de un solo par de bases, en vez de alteraciones más drásticas de la secuencia.

En 1958 Frank Stahl junto a Matthew Meselson demostraron que las dos cadenas del ADN se separan durante la replicación. También en este año se aisló la polimerasa I del ADN, lo que permitió obtener ADN *in vitro*.

Ya en la década de los sesenta Hurwitz y col. <sup>(17)</sup> descubren el ARNm que Severo Ochoa en 1955 había sintetizado por vez primera a partir de los cuatro nucleótidos básicos, recibiendo por ello el Premio Nobel en 1959. El ARNm es el que contiene la información para ordenar los aminoácidos de las proteínas, completándose así la clave genética. Las primeras secuencias de ácidos nucleicos conocidas no fueron de ADN, sino moléculas relativamente pequeñas de ARN de transferencia (t) (75-80 nucleótidos). En 1964, Robert Holley y col. de la Universidad de Cornell, encontraron unas enzimas que rompían las cadenas de ARNt en fragmentos cada vez más pequeños, hasta poder secuenciarlas directamente por métodos de degradación consecutiva.

Con el aislamiento en 1970 por Hamilton Smith <sup>(18)</sup> de la primera enzima de restricción que corta el ADN en una secuencia determinada (diana), así como el descubrimiento de la enzima transcriptasa reversa que permite obtener copias de ADN complementario (ADNc) a partir de una molécula de ARN obtenida del citoplasma de una célula eucariota <sup>(19-21)</sup>, comienza la era de la Ingeniería Genética. Se empiezan a obtener moléculas de ADN recombinante y Cohen y col. <sup>(22)</sup> abren el camino de la clonación de cualquier gen en bacterias. De esta forma se obtienen las primeras moléculas de ADN quimérico con ADN de mamífero.

Pronto se vio que en condiciones adecuadas el ADNc hibridaba de manera específica con el ADN o ARN complementario, lo que permitió demostrar la presencia de esa secuencia complementaria. De esta forma en 1977 y 1978 Deisseroth y col. establecieron <sup>(23-24)</sup> con técnicas de hibridación en solución, que los genes de globina  $\alpha$  y  $\beta$  residían en cromosomas diferentes, localizando el gen  $\alpha$  sobre el cromosoma 16 y el  $\beta$  sobre el 11, confirmándose lo que hasta entonces había sugerido el patrón de la herencia, que las variantes  $\alpha$  y  $\beta$  residían en cromosomas separados al segregarse independientemente en hijos de padres doblemente heterocigotos.

En 1975, Southern introdujo un método de hibridación que permitía inmovilizar uno de los componentes de la reacción, el ADN objeto de estudio, transfiriéndolo sobre nitrocelulosa previa separación según tamaño mediante electroforesis en agarosa cuando éste había sido digerido con endonucleasas de restricción.

Esta técnica ha permitido confirmar la localización de los genes en los cromosomas y su ubicación precisa. Con el empleo de enzimas de restricción se ha llegado al conocimiento exacto de la organización cromosómica del grupo de genes  $\alpha$  y no  $\alpha$ , así como a la patología de cada gen <sup>(25)</sup>.

En 1977 se pone de manifiesto que los genes son discontinuos, están constituidos por exones (secuencias de ADN cromosómico apareadas con secuencias complementarias del ARNm) y por intrones (secuencias presentes en el ADN pero ausentes en el ARNm) y, volviendo a ser en los genes de globina donde se observa esto por primera vez <sup>(26-28)</sup>.

Desde la identificación de la primera enzima de restricción que rompe el ADN en dianas o secuencias determinadas en 1970, se han aislado restrictasas que cortan secuencias definidas a partir de unas 230 estirpes de bacterias, con más de 90 dianas distintas.

Cuando se obtuvieron los primeros fragmentos de restricción no había forma de secuenciarlos directamente, la única posibilidad era sintetizar cadenas complementarias de ARN y aplicarles los nuevos procedimientos de secuenciación de ARN de Fred Sanger.

El avance decisivo llegó cuando en 1975, F. Sanger descubrió el primer método directo para secuenciar fragmentos de ADN de entre 100 y 500 pares de bases, denominado "más menos", basado en la elongación de cadenas de ADN con una polimerasa <sup>(29)</sup>. Dos años más tarde, Allan Maxam y Walter Gilbert desarrollan otro método, basado en la rotura química del ADN <sup>(30)</sup> y en ese mismo año, Sanger hace público un segundo método para secuenciar ADN utilizando técnicas enzimáticas en lugar de químicas. A este método se le conoce como "*chain termination*" (terminación de cadena) y más universalmente como método de Sanger <sup>(31)</sup> por el que en 1980 recibió el Premio Nobel.

Seguimos presenciando cómo la hemoglobina y sus alteraciones, constituyen un modelo de estudio para ampliar conocimientos y así vemos que el primer diagnóstico prenatal de una enfermedad hereditaria mediante análisis del ADN con enzimas de restricción, fue el de la anemia falciforme, llevado a cabo en 1981.

Desde 1980 a 1986, las mutaciones responsables de anomalías en la molécula de hemoglobina fueron estudiadas ampliamente mediante el análisis del haplotipo (conjunto de polimorfismos definido por enzimas de restricción) del cluster de los genes  $\alpha$  y  $\beta$  de globina con una posterior clonación y secuenciación del gen mutado <sup>(32)</sup>. Pero desde 1985, año en que Mullis y col. hicieron las primeras publicaciones sobre la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) <sup>(33-34)</sup>, las técnicas basadas en la PCR y sus aplicaciones han proliferado con la misma rapidez con que la Taq polimerasa amplifica un fragmento de ADN. La PCR, debido a su sencillez y reproducibilidad, se ha convertido en poco tiempo, en la herramienta más poderosa de la Biología Molecular moderna. Mientras que las técnicas convencionales del

ADN recombinante necesitan desarrollar clones recombinantes, un organismo hésped y utilizar su mecanismo de replicación para generar múltiples copias de una molécula original, la PCR puede realizar las mismas funciones *in vitro*, con una simple reacción automatizada.

De esta forma, ha sido posible amplificar regiones de los genes de globina a partir de DNA genómico y secuenciar directamente el producto amplificado <sup>(35-37)</sup>.

Por estas razones, en 1989 la revista Science seleccionó a la PCR como el "Mayor Avance Científico de 1989" y a la Taq DNA polimerasa como "La Molécula del Año"<sup>(38)</sup> y cuatro años más tarde, en 1993, Mullis vió reconocido su descubrimiento al recibir el Premio Nobel.

#### **1.1.4 PRIMERAS DESCRIPCIONES DE HEMOGLOBINAS ANORMALES Y TALASEMIAS**

Como ya se comentó, los descubrimientos científicos fueron la base para muchos clínicos, aunque para J.B Herrick en 1910 le fue suficiente la observación de las células en sangre de una persona de raza negra con anemia, para descubrir que estas células mostraban una curiosa forma de hoz. Este fenómeno de falciformación *in vitro* fue descrito por Emmel en 1917.

En 1922, Mason introdujo el término de anemia falciforme (*sickle-cell anaemia*) sugiriendo que podría ser una enfermedad de la raza negra, aunque con el tiempo se ha comprobado que afecta también a los blancos, siendo una enfermedad heredada y no ligada al sexo.

La primera descripción de una talasemia fue hecha por los pediatras Cooley y Lee <sup>(39)</sup>, en cinco niños que presentaban anemia, hepatoesplenomegalia y una apariencia mongoloide peculiar, conociéndose desde entonces a este tipo de síndromes como anemia de Cooley.

Las publicaciones sobre este tipo de enfermedad se suceden, localizándose los casos preferentemente en el Mediterráneo. Pero es a partir de 1932 cuando comienza a conocerse universalmente como Talasemia; ese mismo año es descrita la forma heterocigota, denominándose enfermedad de Rietti-Greppi-Micheli, en honor a sus descubridores, y ya en 1949 queda claramente definida la transmisión mendeliana de la enfermedad <sup>(40)</sup>.

Cuando en 1965 se introduce la electroforesis para cuantificar hemoglobinas <sup>(41)</sup> y la síntesis de cadenas de globina <sup>(42)</sup>, se da un paso importante para la separación y caracterización de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  globina <sup>(43)</sup> y así en 1968 se habla de la  $\alpha$  y  $\beta$  talasemia, las primeras refiriéndose al déficit o ausencia de cadena  $\alpha$  globina, mientras que la  $\beta$  talasemia es como consecuencia de una síntesis disminuida o ausente de cadena  $\beta$  globina.

Pronto se empezaron a tener indicios de que las responsables de las talasemias, eran anomalías localizadas en los genes que rigen la síntesis de las diferentes cadenas de globina.

La primera vez que se identifica una mutación responsable de  $\beta$ -talasemia fue en China en el año 1979 <sup>(44)</sup>, consistía en una mutación puntual, la sustitución de una Adenina por una Timina en el codon 17 del primer exon del gen  $\beta$  globina, dicho cambio originaba un codon sin sentido, el cual no era reconocido durante el proceso de síntesis y ésta se paralizaba. Ese mismo año en Europa se habla de una hemoglobina inestable (Hb Indianapolis) que originaba un cuadro típico de  $\beta$ -talasemia, descrita por Adams y col. <sup>(45)</sup>.

A partir de 1980 y hasta 1986 un total de 40 mutaciones puntuales que originaban  $\beta$ -talasemia fue descubierto mediante el análisis del haplotipo del gen  $\beta$ -globina <sup>(32)</sup>. Desde 1987, con la introducción de la PCR, en menos de 2 años, mas de 50 alelos habían sido caracterizados y actualmente se conocen alrededor de 200 mutaciones diferentes <sup>(46)</sup>.

Las primeras mutaciones descritas en el Mediterráneo datan de 1981, comienza entonces a hablarse de distintas mutaciones. En Cerdeña es descrita por Trecartin y col. <sup>(47)</sup> la

mutación sin sentido codon 39 (C→T). Ese mismo año es caracterizada la mutación localizada en el nucleótido 110 del primer intrón (G→A)<sup>(48-49)</sup>.

En 1983 Kazazian y col.<sup>(50)</sup>, encuentran la delección de un nucleótido en el codon 6 (-A) que protege de la malaria.

A partir de entonces se han ido descubriendo y caracterizando nuevas mutaciones en todo el mundo, que han puesto de manifiesto la heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia, así, sabemos que la mayoría de las  $\beta$ -talasemias son originadas por la mutación de un único nucleótido afectando a uno de los diferentes procesos moleculares involucrados en la expresión del gen  $\beta$  globina: transcripción, procesamiento del pre-ARNm o traducción.

La elevada frecuencia de los alelos talasémicos nos hace pensar en la divergencia de las razas humanas, ya que cada grupo o etnia racial dispone de su propia batería de alelos específicos<sup>(51)</sup>.

## **1.2 HEMOGLOBINAS FISIOLÓGICAS**

Existen seis tipos de cadenas de globina humana, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) y zeta ( $\zeta$ ). La cadena  $\alpha$  está formada de 141 aminoácidos, al igual que la  $\zeta$  mientras que la  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  son ligeramente más largas, constituidas por 146 aminoácidos. De las combinaciones de a dos de las diferentes cadenas de globina, se van a formar las diferentes hemoglobinas en los períodos embrionario, fetal, neonatal y adulto.

### 1.2.1 HEMOGLOBINAS DEL EMBRIÓN Y DEL FETO

Las hemoglobinas embrionarias fueron descubiertas en 1961 por Huehns y col. en la sangre de embriones humanos <sup>(52)</sup>. Vieron que eran diferentes de la HbA y HbF, siendo denominadas Hb Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ) y Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ). Posteriormente, Capp y col. <sup>(53)</sup> denominaron Hb Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) a una nueva hemoglobina, con propiedades electroforéticas semejantes a la HbA a pH alcalino, pero de migración más rápida a pH ácido. En 1984 Randhawa y col. descubren dos nuevas fracciones de hemoglobinas a las que denominaron Portland-II y III <sup>(54)</sup>.

En los embriones más jóvenes examinados (5 semanas de gestación), la proporción de Hb Gower I y II es del 42% y del 14% respectivamente del total, siendo el resto HbF. En etapas posteriores, la proporción de hemoglobinas Gower desciende hasta casi su total desaparición hacia la 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> semana de gestación <sup>(55)</sup>.

El tiempo de aparición y desaparición de la Hb Portland ha sido más difícil de determinar, ya que su migración en gel de almidón es muy similar a la HbA. En los fetos normales se puede observar a las diez semanas de gestación, mediante electroforesis de agar citrato, habiéndose cuantificado en un 20% del total de la hemoglobina <sup>(56)</sup>.

La HbF aparece de manera precoz durante la gestación, siendo el 30% del total a las cinco semanas de gestación y del 90% hacia la 8<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> semana, permaneciendo así hasta poco antes del parto.

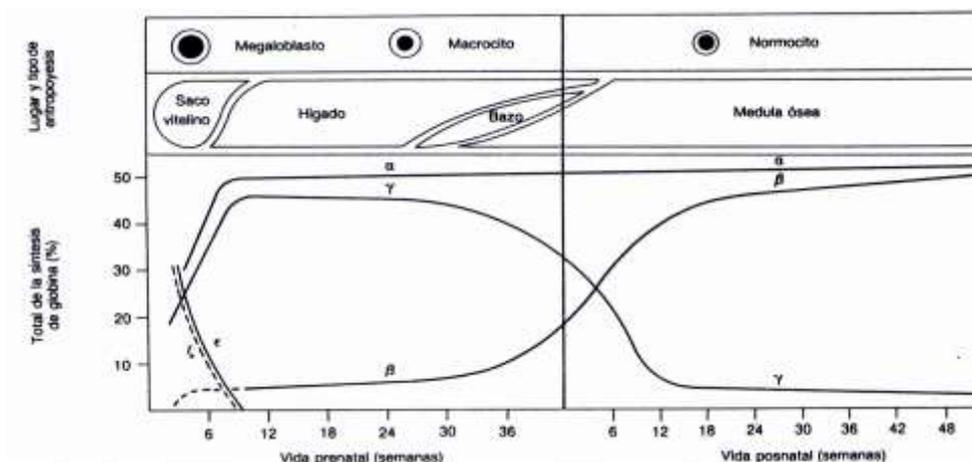
La HbA, en cantidades del 5-10%, se detecta en fetos normales desde la 6<sup>a</sup> semana de gestación, aunque electroforéticamente no es demostrable hasta la 12<sup>a</sup> semana de vida <sup>(56)</sup>.

Pequeñas cantidades de cadena  $\alpha$  pueden comprobarse por síntesis de globinas antes de la 6<sup>a</sup> semana, posteriormente se observa un ligero incremento en dicha síntesis (hacia la

12<sup>a</sup>-20<sup>a</sup> semana), sin embargo la proporción permanece constante hasta iniciarse la síntesis de la HbA.

La última en aparecer es la HbA<sub>2</sub> que comienza a producirse en el tercer trimestre de la gestación, detectándose solo trazas en la sangre del cordón umbilical. Su síntesis se va incrementado desde los seis hasta los doce primeros meses de vida, donde se alcanzan los niveles definitivos (Figura 1.1).

Estas hemoglobinas diferentes corresponden con las adaptaciones evolutivas a los cambios fisiológicos que tienen lugar en el feto durante su desarrollo <sup>(57)</sup> con objeto de realizar mejor su función principal, el transporte de oxígeno y CO<sub>2</sub>, presentando todas ellas una elevada afinidad por el oxígeno.



**Figura 1.1** Síntesis de los distintos tipos de hemoglobinas a lo largo del desarrollo humano.

## 1.2.2 HEMOGLOBINAS DEL RECIÉN NACIDO Y DEL ADULTO

### 1.2.2.1 Hemoglobina Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ )

En el recién nacido constituyen entre el 60% y el 95% del total de la hemoglobina, para descender progresivamente durante los seis primeros meses de vida, manteniéndose en

niveles superiores al 1 % en la mayoría de los casos hasta los dos años. En los adultos, los valores normales se sitúan por debajo del 1 % <sup>(56)</sup>.

La HbF es una hemoglobina heterogénea cuya cadena  $\gamma$  es diferente en 39 de los 146 aminoácidos de la cadena  $\beta$ , pudiendo poseer un residuo de Alanina o Glicina en la posición 136, siendo entonces designadas como  $^A\gamma$  y  $^G\gamma$  según lleven uno u otro. Esta cadena también puede tener ácido acético ligado al residuo Glicina N-terminal.

En el recién nacido, el 75 % es  $^G\gamma$  y el 25 % es  $^A\gamma$ , proporción que se mantiene desde el comienzo del embarazo; por el contrario, en el adulto la pequeña cantidad que posee de HbF contiene 40% de  $^G\gamma$  y 60% de  $^A\gamma$ , teniendo lugar la transición en el primer año de vida.

La cadena  $^A\gamma$  que lleva en la posición 75 una Treonina sustituyendo a un resto de Isoleucina, se designa como  $^A\gamma^T$  y se conoce como HbF Sardinia. Esta variante de HbF se ha visto en el 30% de los recién nacidos blancos y en el 20% de los negros americanos.

Desde el punto de vista funcional, la HbF tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la HbA, como consecuencia de la incapacidad de la cadena  $\gamma$  de la HbF para unirse al 2,3 DPG con la misma intensidad que lo hace la cadena  $\beta$  de la HbA, lo que le confiere una ventaja funcional en la captación de oxígeno a presiones bajas ( $pO_2$  de 45 mmHg) como sucede en el intercambio placentario.

La HbF se encuentra aumentada en algunos trastornos hereditarios, como en las  $\beta$ -talasemias, Persistencia Hereditaria de la HbF (PHHF) y drepanocitosis, y en otros trastornos adquiridos, como anemia megaloblástica, aplasia medular, algunas leucemias y ligeramente en un embarazo normal.

Los niveles de HbF pueden estar también afectados por diferencias en la atracción para el ensamblaje de unas cadenas con otras, lo que sugiere que las subunidades  $\alpha$  se combinan con menor facilidad con las  $\gamma$  que con las  $\beta$ , observándose por lo tanto HbF más

baja en recién nacidos con  $\alpha$ -talasemia que en aquellos recién nacidos normales <sup>(58)</sup> o con una deficiencia de hierro.

#### **1.2.2.2 Hemoglobina de Bart ( $\gamma_4$ )**

Se encuentra en cantidades menores del 2% en los neonatos normales. Es un tetrámero  $\gamma_4$  funcionalmente anómalo, mostrando una afinidad por el oxígeno aumentada, ausencia de la interacción hemo-hemo y de efecto Bohr. Se encuentra ligeramente aumentada en los recién nacidos con  $\alpha$ -talasemia y excepcionalmente en el adulto.

#### **1.2.2.3 Hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ )**

Aproximadamente constituye el 97% de toda la hemoglobina del adulto, mientras que en el recién nacido su cuantía es del 20% al 40%.

Consta de dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ , con dos ejes de simetría. Existen cuatro grandes áreas de contacto entre las subunidades  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_1$  que son muy importantes para mantener la solubilidad de la hemoglobina. Esta estructura se forma a partir de la unión de los aminoácidos mediante enlace peptídico, de modo que los grupos polares (Lisina, Glutamina) se disponen en la superficie, mientras que los hidrófobos (Alanina, Valina, Leucina) se disponen en el interior de la molécula, tapizando de esta forma la cavidad central y el bolsillo del hemo para así mantener su funcionalidad, efecto Bohr y poder tampón.

#### 1.2.2.4 Hemoglobina A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )

Representa en el neonato menos del 0,5 % del total de la hemoglobina, mientras que en el adulto llega a alcanzar el 2,5 %.

Su estructura no es muy heterogénea, debido a que las cadenas  $\beta$  y  $\delta$  de globina sólo se diferencian en 10 aminoácidos de los 146 de sus secuencias primarias.

Su significado fisiológico se desconoce, aunque probablemente tenga una función parecida a la HbA.

Suele encontrarse aumentada en las  $\beta$ -talasemias, en casos de hipertiroidismo y anemia megaloblástica, por el contrario, se encuentra disminuida en las  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\delta\beta$  talasemias, estados carenciales de hierro y en las anemias sideroblásticas <sup>(59)</sup>.

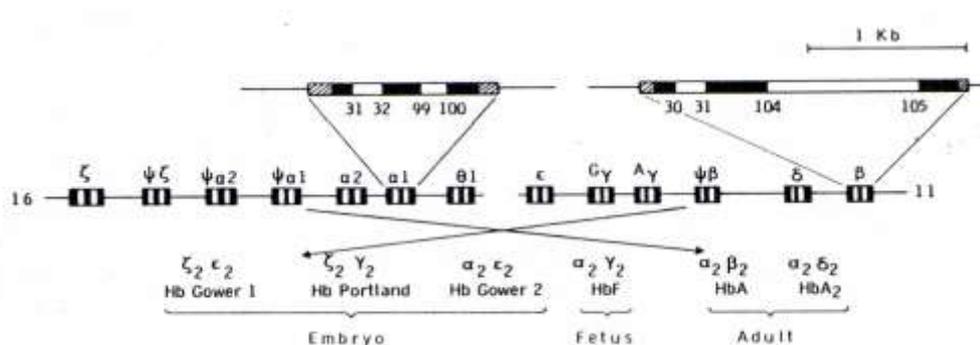
La explicación más factible a estas alteraciones es que las cadenas  $\alpha$  se combinan más fácilmente con las cadenas  $\beta$  que con las  $\delta$ , por lo que habrá más posibilidades de formarse uniones  $\alpha/\delta$  en las  $\beta$ -talasemias y heterocigotos A/S que en las  $\alpha$ -talasemias <sup>(9)</sup>.

Por todo lo dicho, se comprende por qué el déficit o anomalía de las cadenas  $\alpha$  se manifiesta en todas las etapas del desarrollo. Después del parto la síntesis de cadena  $\beta$  va aumentando y, dado que la apetencia de la cadena  $\alpha$  es mayor por la  $\beta$  que por la  $\gamma$ , las cantidades de Hb de Bart ( $\gamma_4$ ) se cuantifican mejor en el neonato que en el adulto. En cuanto a las variantes estructurales de cadena  $\alpha$  que puedan aparecer, van a tener el mismo porcentaje de hemoglobina anómala en el período neonatal que en el adulto, mientras que las de cadena  $\beta$  se van a manifestar más claramente durante el período adulto.

Las alteraciones de cadena  $\gamma$  se detectan mejor en el período fetal y neonatal debido a que desaparecen rápidamente después de nacimiento.

### 1.3 ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS GENES GLOBÍNICOS

Los genes que controlan la síntesis de las cadenas de globina se encuentran en dos bloques multigénicos (*cluster*). El que comprende los genes tipo  $\alpha$  se encuentra situado cerca del telómero del brazo corto (banda p13.3) del cromosoma 16 <sup>(23)</sup> y el que agrupa a los genes tipo  $\beta$  está en la porción distal del cromosoma 11, más allá de la banda p14 <sup>(24)</sup>. En ambos bloques, los genes están dispuestos de acuerdo con la secuencia ontogénica de su expresión, es decir, en la dirección 5'  $\rightarrow$  3' se encuentran primero genes embrionarios ( $\zeta$ ,  $\epsilon$ ), seguidos de los fetales ( $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ) y adultos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) <sup>(60,61)</sup> (Figura 1.2).

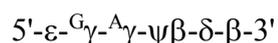


**Figura 1.2** Control genético de la hemoglobina humana. Los clusters de los genes de globina están en los cromosomas 11 ( $\beta$ ) y 16 ( $\alpha$ ). En cada estadio del desarrollo, son activados o reprimidos genes diferentes en estos clusters.

La gran cantidad de información acumulada sobre la estructura de las globinas de diferentes animales, ha permitido conocer la evolución molecular de la hemoglobina. Sobre la base de estos datos se ha calculado que el proceso evolutivo de las especies de los genes  $\alpha$  y  $\beta$  ancestrales comenzó a divergir hace aproximadamente 500 millones de años. Posteriormente, cada bloque ha continuado evolucionando independientemente, a través de diferentes procesos genéticos, como son las duplicaciones seguidas de diferentes tipos de mutaciones.

### 1.3.1 ORGANIZACIÓN DEL CLUSTER $\beta$ y $\alpha$ GLOBINA

El bloque  $\beta$  ocupa una región de aproximadamente 70 kilobases (kb), en la cual están localizados cinco genes funcionales ( $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ ) y un pseudogen  $\psi\beta$ , dispuestos en el cromosoma en el siguiente orden:

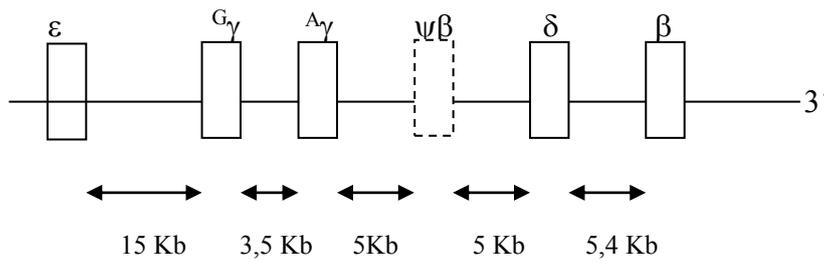


separados entre sí por una cantidad variable de pares de bases (pb), conocidas como distancias intergénicas, observándose que los genes que han aparecido en una duplicación relativamente reciente, están situados más próximos que los que evolutivamente son más antiguos, como sucede con los genes  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $G\gamma$  y  $A\gamma$ , mientras que las distancias son mayores con el gen  $\epsilon$ .

El ADN intergénico está constituido por secuencias repetitivas del mismo, a las que se les denomina Alu I o Kpn I, cuya función se desconoce.

Los pseudogenes son estructuras génicas con alta homología a los auténticos genes, pero no corresponden a cadenas polipeptídicas conocidas, en los que se han encontrado anomalías estructurales que pueden prevenir su expresión normal. Se especula que su aparición se deba a fenómenos de duplicación génica, seguidos por mutaciones que le confieren alteraciones que impiden su expresión.

En el bloque  $\beta$  (Figura 1.3) se encuentra un solo gen embrionario  $\epsilon$ , situado 15 kb antes que el gen  $G\gamma$ , dos genes ( $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ) que se encuentran separados por una distancia de 3,5 kb y que presentan una gran homología en sus secuencias, tanto en la región estructural como en las adyacentes, esto sugiere que los dos genes resultarían ser el producto de un proceso de duplicación relativamente reciente.



**Figura 1.3** Cluster  $\beta$  globina en el cromosoma 11

Al determinar la secuencia de bases de toda la región, se encontraron las siguientes diferencias entre los genes  $G\gamma$  y  $A\gamma$  <sup>(62)</sup>:

1. - Sustitución de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición -25 de la región 5' no traducida.
2. - Deleción de los nucleótidos 1.080-1.100 en el segundo intrón (IVS-2).
3. - Sustitución de Citosina por Guanina en el codon 136, codificando una Alanina en vez de Glicina. Esta es la única diferencia en la secuencia de aminoácidos entre las dos cadenas y de ahí su terminología de  $G\gamma$  y  $A\gamma$ .
4. - Doce sustituciones nucleotídicas en la región 3' del segundo intrón.
5. - Cinco sustituciones nucleotídicas en la región 3' no traducida.
6. - Un número variable de sustituciones y otros tipos de mutaciones en la región 3' intergénica.

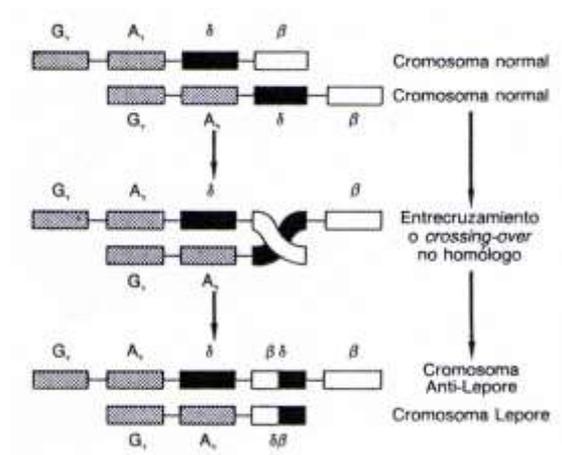
Por otro lado, el gen  $A\gamma$  presenta un alelo que contiene Treonina en lugar de Isoleucina en la posición 75, designándose  $A\gamma^T$ .

Esta estructura duplicada de los genes  $\gamma$  permite la deleción de uno de ellos y la correspondiente triplicación en el otro cromosoma mediante un mecanismo de entrecruzamiento, de hecho se han encontrado cromosomas con tres genes  $\gamma$  (5' -  $G\gamma$  -  $G\gamma$  -  $A\gamma$  - 3') y el producto recíproco que contiene solo el gen  $A\gamma$ . En ambos casos el fenotipo de los

recién nacidos heterocigotos fue normal. También se han encontrado, aunque raramente, cromosomas con una constitución anómala que presentan dos genes  $\gamma$  iguales, tanto  $G\gamma - G\gamma$  como  $A\gamma - A\gamma$ . Probablemente estos cromosomas se producen por medio de un proceso de conversión genética. Este hallazgo sugiere, que probablemente este mecanismo genético sea de uso general para mantener constante la estructura de los genes duplicados <sup>(63)</sup>.

Los dos genes  $\delta$  y  $\beta$  se expresan al final de la vida fetal y durante la vida adulta; se encuentran en la parte 3' terminal del bloque  $\beta$  (Figura 1.3), separados entre sí por una distancia de 5,4 kb. Representan, como los dos  $\gamma$ , el producto de una duplicación de un gen ancestral seguida de una evolución relativamente independiente. Este hecho queda demostrado por la similitud entre sus dos productos polipeptídicos que difieren tan solo en 10 aminoácidos. La mayoría de estos cambios es debida a la sustitución de una sola base en un mismo codon, aunque existen cambios de dos y hasta tres bases en el mismo codon.

Es probable que las diferencias que existen entre los dos genes, influyan en los niveles de transcripción de ambos. Por el contrario, su analogía es suficiente para producir entrecruzamientos (*crossing-over*) desiguales. Esta recombinación conlleva a la formación de genes híbridos, de hecho se han caracterizado cromosomas con un solo gen  $\delta\beta$  (Lepore) y el correspondiente con la triplicación que contiene el gen fusionado recíproco  $\beta\delta$  (antiLepore), además de los genes  $\delta$  y  $\beta$  normales <sup>(66)</sup> (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Formación de la hemoglobina Lepore por entrecruzamiento o recombinación no homóloga de los genes durante la meiosis.

El *cluster*  $\alpha$  está constituido por un gen embrionario ( $\zeta_2$ ), dos genes fetal/adulto ( $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ ), tres pseudo genes ( $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_2$  y  $\psi\alpha_1$ ) y un gen ( $\theta_1$ ) de función desconocida. La organización de la región 5' muestra la existencia de al menos 4 genes, 16pHG, Dist 1, MPG y Prox 1, los cuales se expresan en forma constitutiva.

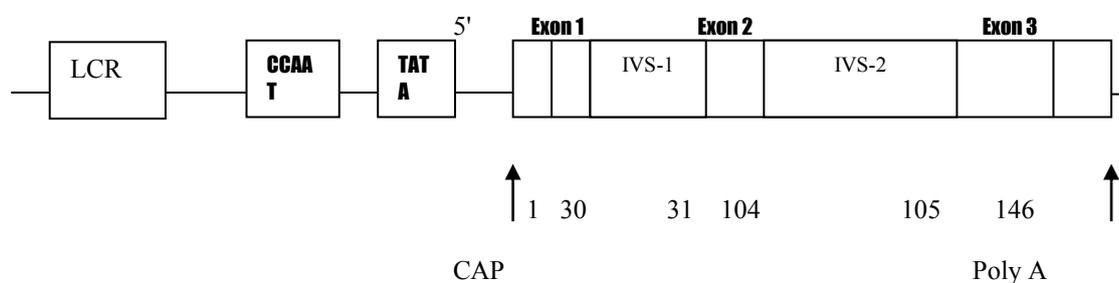
$$5' - \zeta_2 - \alpha_2 - \alpha_1 - \psi\zeta_1 - \psi\alpha_2 - \psi\alpha_1 - \theta_1 - 3'$$

### 1.3.2 ESTRUCTURA DE LOS GENES $\beta$ GLOBÍNICOS

Los genes globínicos están constituidos por tres dominios fundamentales: El gen estructural, la región promotora que se encuentra a su izquierda (extremo 5'), la región de poliadenilación que se sitúa a la derecha (extremo 3'). También encontramos las denominadas secuencias reguladores o remotas <sup>(57)</sup>.

### 1.3.2.1 Región Promotora

Está constituida por las secuencias nucleotídicas esenciales para la iniciación exacta y eficiente de la transcripción, es el lugar donde se fija la ARN polimerasa II para iniciar esta etapa. Estas secuencias comprenden aproximadamente un tramo de 150 pb a la izquierda del gen donde hay tres grupos de secuencias que se han mantenido constantes en los diferentes genes <sup>(65-66)</sup>. El primer bloque que se observa, está a una distancia aproximadamente de -30 bp del sitio CAP, tiene una secuencia rica en A y T y recibe el nombre de "TATA *box*", es la encargada de iniciar la transcripción. El sitio CAP es la zona situada inmediatamente delante del codon de iniciación y se transcribe al ARNm. Aproximadamente a -70 bp del sitio CAP se encuentra el segundo bloque conservado, que incluye la secuencia CCAAT, designado por ello como "CCAAT *box*", la cual es importante para determinar el nivel de la transcripción. Esta secuencia está duplicada en el gen  $\gamma$ , mientras que en el gen  $\delta$ , existen tres secuencias parecidas, pero ninguna coincide con la "CCAAT *box*". El tercer bloque, es algo más variable, se encuentra situado a unas -100 bp del sitio CAP, es el GGGGGCG, pudiendo aparecer por duplicado en algunos genes (Figura 1.5). A pesar de estas diferencias, la estructura de la región promotora está notablemente conservada en los diferentes genes globínicos humanos, lo cual representa una sólida prueba, aunque indirecta, de su importancia en la transcripción <sup>(67)</sup>.



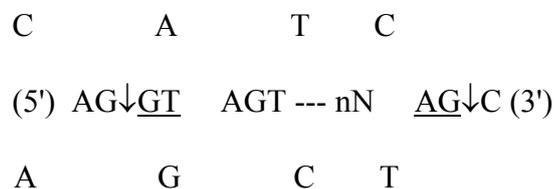
**Figura 1.5** Gen  $\beta$  Globina

### 1.3.2.2 Gen Estructural

El prototipo de gen estructural de las globinas contiene tres secuencias codificadoras (EXONES) separadas por dos secuencias transcriptas pero no traducidas (INTRONES) <sup>(68)</sup>.

En los genes  $\beta$ , el primer exón está constituido por los codones del 1 al 30, el segundo exón (del codon 31 al 104) se encuentra separado por 130 pb que constituyen el primer intrón (IVS-1), mientras que el segundo intrón (IVS-2) contiene 850 bp y delimita al tercer exón (del codon 105 al 146) (Figura 1.5).

A pesar de la aparente homología encontrada entre los intrones de los diferentes genes globínicos existen notables variaciones en sus secuencias, excepto en la región de contacto con los exones. Estas secuencias conservadas universalmente en los genes de los organismos eucariotas, son necesarias para el empalme (*splicing*) correcto y reciben el nombre de secuencias consenso. La forma general que presentan es la siguiente:



donde N representa cualquier nucleótido y n un número igual o mayor a 11. Las flechas indican los sitios dentro de la secuencia consenso donde ocurre el empalme. Los dinucleótidos subrayados GT y AG son invariables y se piensa que son imprescindibles para que ocurra el empalme correcto <sup>(69,70)</sup>. La importancia de estas secuencias se demuestra por el hecho de que mutaciones que alteran las secuencias de consenso normales, o que crean otras parecidas, modifican el procesamiento normal del ARNm y constituyen la base molecular de muchos tipos de talasemias <sup>(51)</sup>.

A pesar de existir gran especulación sobre el significado de los intrones, su función no ha sido dilucidada. Existe la hipótesis de que los intrones separan regiones de los genes que

codifican dominios funcionales diferentes en una proteína. Así en el caso de las globinas, los intrones dividen el gen en exones que codifican regiones funcionales diferentes. El exón central, codifica los aminoácidos en contacto con el grupo hemo y también la mayoría de los que constituyen los contactos  $\alpha_1\beta_2$ , mientras que los residuos que forman los contactos  $\alpha_1\beta_1$  están codificados por el tercer exón <sup>(71)</sup> por lo que los intrones realmente separan regiones codificadoras bien definidas en la estructura terciaria de la cadena polipeptídica.

### **1.3.2.3 Región de Poliadenilación**

Es la región inmediatamente situada en el extremo 3' del gen estructural, se transcribe al ARNm y contiene secuencias importantes para el procesamiento del extremo 3' del mismo y para la adición del ácido poliadenílico (Poly A), proceso que recibe el nombre de poliadenilación. El Poly A es considerado esencial para el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma y para su estabilidad (Figura 1.5).

El extremo 3' de las secuencias no codificadoras de los genes de las globinas que se transcribe, constituye la región de mayor variación en la estructura de los mismos, con excepción de la secuencia AATAAAA situada a unos 20 pb del sitio donde tiene lugar la escisión del ARNm y la posterior poliadenilación. Se ha demostrado que sustituciones de bases en esa secuencia son responsables de ciertos tipos de talasemias debidas a una alteración en el procesamiento y poliadenilación del ARNm de la globina <sup>(51)</sup>.

### **1.3.2.4 Secuencias Reguladoras**

En el *cluster*  $\beta$  globina, existe una secuencia situada entre 6 y 20 kb cadena arriba del gen  $\beta$  que contiene elementos reguladores cis-activos, los cuales controlan la expresión del *cluster*. Esta región se denomina  *$\beta$ -locus control region* ( $\beta$ -LCR) y en ella se localizan las

zonas de hipersensibilidad HS1, HS2, HS3 y HS4 <sup>(72-74)</sup> a los que se unirán los factores de la transcripción específicos del eritrocito (GATA-1 y NF-E2).

#### **1.4 EXPRESIÓN DE LOS GENES $\beta$ GLOBINA**

La expresión de los genes  $\beta$  globina tiene varias fases: Transcripción, Procesamiento del pre-ARNm y Traducción (Figura 1.6).

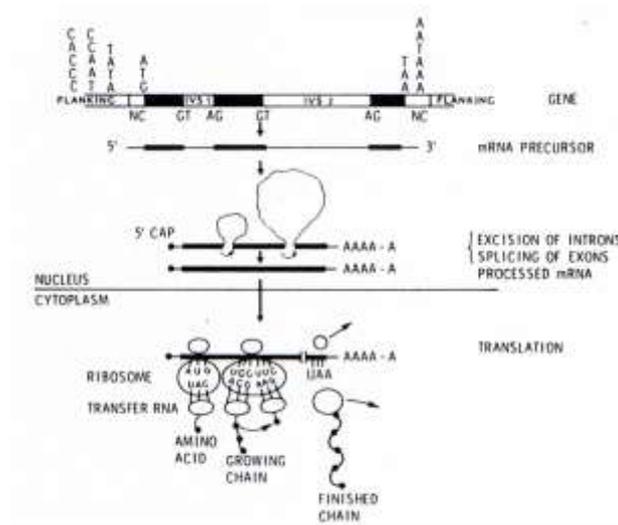
##### **1.4.1 TRANSCRIPCIÓN**

La regulación molecular de la transcripción es llevada a cabo a través de complejas interacciones entre factores generales de la transcripción y específicos del eritrocito con las secuencias presentes en el  $\beta$ -LCR y en la región promotora del gen  $\beta$  <sup>(74)</sup>.

Los factores específicos de la transcripción son proteínas nucleares con dos dominios bien diferenciados, uno se une a una secuencia específica del ADN, mientras que el otro coopera con otros factores de la transcripción para determinar la cantidad de ARNm que debe ser transcripta <sup>(75,76)</sup>.

Estas dos proteínas se conocen con el nombre de GATA-1 y NF-E2. La primera se une específicamente a una secuencia presente en las zonas de hipersensibilidad HS2, HS3, HS4 y a la región promotora, mientras que NF-E2 sólo lo hace a las zonas de hipersensibilidad HS2, HS3, HS4. Parece ser, que hasta que esta interacción no es llevada a cabo no comienza el proceso de la transcripción <sup>(77,78)</sup>.

La transcripción a un pre-ARNm está dirigida por la ARN polimerasa II y es iniciada en el sitio CAP, continúa a través de los exones e intrones hasta más allá del sitio de adición del Poly A. El "TATA *box*" fija la iniciación de la transcripción a 30 pb corriente arriba del extremo 5', mientras que la "CCAAT *box*" determina el nivel de la transcripción <sup>(57)</sup>.



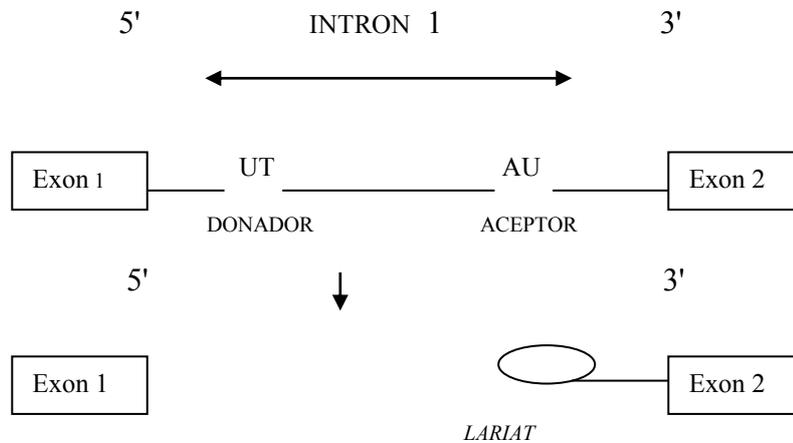
**Figura 1.6** Esquema del proceso de biosíntesis de la cadena  $\beta$  globina. En la fase de Transcripción se sintetiza el pre-ARNm en el interior del núcleo. Durante el Procesamiento se modifica y acorta el transcrito primario (*splicing*). En el citoplasma, por el proceso de Traducción, el ARNm maduro se pega a los ribosomas para comenzar la síntesis proteica.

### 1.4.2 PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNm

El extremo 5' es modificado por el proceso denominado "*capping*" que consiste en la adición del CAP (7-metil-guanosina) al nucleótido 1 del ARNm. Esta estructura contribuye al aumento en la eficacia de la traducción y estabilidad del ARNm <sup>(79)</sup>.

En el extremo 3' tiene lugar la escisión del ARNm por la secuencia AAUAAA <sup>(80)</sup> seguida de la adición, en ese mismo punto, de la cola de Poly A, aproximadamente unas 200 pb, que aumenta la estabilidad del ARNm <sup>(81)</sup>.

El proceso comienza con la escisión del extremo 5' del intrón (extremo donador) y la formación de un rizo hacia el interior del intrón, uniéndose covalentemente a un residuo de Adenina del extremo 3' (extremo aceptor) formándose una estructura conocida como "*lariat*" (Figura 1.7) <sup>(82,83)</sup>.



**Figura 1.7** Detalle del proceso de *splicing* y formación de *lariat*

### 1.4.3 TRADUCCIÓN

El ARNm es el molde sobre el que los residuos de aminoácidos se unen unos a otros de forma ininterrumpida en dirección 5'→3', siendo necesaria la intervención del ARNt (ARN de transferencia), el encargado de transportar los aminoácidos hasta los ribosomas, en donde tendrá lugar la síntesis, todo ello catalizado por una serie de enzimas complejas. A esta etapa se le conoce como elongación (Figura 1.6).

El punto de inicio de la elongación, es un triplete de bases universales AUG denominado codon de iniciación, que se corresponde con el aminoácido Metionina (que es removida en la cadena de β globina) precedido de la secuencia AGGA. La finalización de la traducción es llevada a cabo por los codones denominados sin sentido o de terminación (UAA/UGA/UAG), separándose el polipéptido del ARNt por acción de una hidrolasa y disgregándose las dos partes del ribosoma, que participarán en nuevas síntesis de cadenas polipeptídicas <sup>(80)</sup>.

## 1.5 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLOBINA

Todos los procesos anteriormente descritos son muy complejos, y están sometidos a una serie de mecanismos de regulación que hacen posible:

1. -La expresión selectiva de los genes de globina en las células hematopoyéticas y la supresión en las no eritroides.

2. -El mantenimiento del equilibrio de la cantidad de globina producida por los genes  $\alpha$  y  $\beta$ , así como la síntesis de ambos tipos de cadenas en los momentos y cantidades requeridas.

3. -El acoplamiento de la cadena de globina y del grupo hemo.

La expresión selectiva de los genes de globina en el tejido hematopoyético parece estar regulada por las proteínas GATA-1 y NF-E2 que forman parte de una cadena de factores que lleva a las células *stem* pluripotentes a la diferenciación en eritrocitos, mediante la activación de un subconjunto de genes cuya expresión es característica de los hematíes. A pesar de las investigaciones, los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el control de la regulación son poco claros y aún no están bien definidos <sup>(77,78)</sup>.

Por el contrario, se sabe que el equilibrio entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  está regulado por los niveles de ARNm producidos durante la transcripción, habiéndose observado, que la cantidad de ARNm  $\alpha$  es dos veces superior al ARNm  $\beta$ , debido a un nivel transcripcional diferente de los dos genes <sup>(84)</sup>.

Por último, la regulación de la síntesis de hemoglobina a nivel de la traducción se realiza fundamentalmente por la inhibición de la iniciación de la traducción en ausencia del grupo hemo, mediante la activación de un factor de iniciación (eIF-2), acoplándose de esta forma la síntesis de globina y la del grupo prostético <sup>(70,83)</sup>.

## 1.6 ENSAMBLAJE DE LAS UNIDADES DE GLOBINA

Las propiedades fisiológicas de la hemoglobina, dependen del ensamblaje ordenado de las subunidades en las células hematopoyéticas.

Una vez que las cantidades adecuadas de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  han sido sintetizadas, y el hemo ha sido insertado, se formarán unos dímeros  $\alpha\beta$  que facilitan la atracción electrostática de la subunidad  $\alpha$  cargada positivamente con la subunidad  $\beta$  de carga negativa <sup>(85)</sup>.

Una síntesis eficiente de hemoglobina requiere la producción equilibrada de cadena  $\alpha$  y  $\beta$ , permitiéndose un ligero desajuste en la biosíntesis debido a los eficaces mecanismos proteolíticos de los precursores eritroides, los cuales contribuyen a evitar las consecuencias que derivarían de la acumulación de alguna de las cadenas que se produzca en exceso. Este mecanismo de control se pone de manifiesto en situaciones en que existe un déficit de síntesis de una de las cadenas, pero sin embargo, no son capaces de contrarrestar el desequilibrio de síntesis de hemoglobinas que se produce como consecuencia de genes defectuosos, cuya expresión se encuentra disminuida, produciéndose en estos casos, cuadros conocidos con el nombre de talasemias <sup>(86)</sup>.

## **1.7 ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS Y SECUENCIA DE CADENAS DE GLOBINA**

Clásicamente se han reconocido dos tipos de anomalías en la patología de la hemoglobina:

1. -TALASEMIAS. Son un grupo heterogéneo de mutaciones heredables que dan lugar a una expresión anómala de los genes de globina, resultando en una ausencia o disminución de cadenas de globina.

2. - HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES. Son mutaciones en la secuencia codificante de un gen, que alteran la estructura primaria de la cadena de globina. Se han descrito más de 890 variantes de hemoglobina <sup>(87)</sup>, de las cuales, alrededor de la mitad no dan lugar a patología alguna. En los casos patológicos las mutaciones pueden producir polimerización de la hemoglobina anormal, precipitación de la hemoglobina dentro del hematíe (hemoglobinas inestables), cambios de afinidad por el oxígeno o aumento de la oxidación del hierro del grupo hemo (metahemoglobinas).

Actualmente está bien establecida la existencia de hemoglobinopatías talasémicas, es decir, alteraciones del ADN que producen además de una cadena anormal de hemoglobina, una menor producción de esta cadena.

### **1.7.1 TALASEMIAS**

Se clasifican según la cadena afectada en:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  y según su forma de manifestarse, en portador silente, rasgo talasémico, talasemia intermedia, enfermedad de Cooley ( $\beta$ -talasemias), enfermedad de la HbH e hidropesía fetal ( $\alpha$ -talasemias), dependiendo de la gravedad de cada una de ellas.

Las  $\alpha$  y  $\beta$  talasemias son además subdivididas en formas  $\alpha^0$  y  $\beta^0$ , en las cuales no se produce la cadena afectada y en formas  $\alpha^+$  y  $\beta^+$  cuando la cadena es sintetizada pero en cantidad reducida <sup>(88)</sup>.

La repercusión fisiopatológica y las consecuencias clínicas derivadas de estos trastornos vienen dadas, en primer lugar, porque al sintetizarse menor cantidad de una cadena de globina se forma menos hemoglobina normal, dando lugar a la aparición de una anemia microcítica e hipocrómica. Por otro lado, existe otro mecanismo que juega un papel fundamental en la anemia que caracteriza a la talasemia, consiste en que la cadena producida en cantidad normal al no poder aparearse con la cadena deficitaria, se agrupa en homotetrámeros más o menos estables o precipita en el interior del glóbulo rojo produciendo alteraciones en su maduración y supervivencia. En la  $\beta$ -talasemia, el exceso de cadena  $\alpha$  es incapaz de formar un homotetrámero estable, por lo que precipita rápidamente en los precursores eritrocitarios, destruyéndolos dentro de la médula ósea, fenómeno conocido como eritropoyesis ineficaz, o lo hace en el eritrocito dando lugar a su destrucción en el sistema retículoendotelial esplénico. En la  $\alpha$ -talasemia, el exceso de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$  sin aparear se agrupa en homotetrámeros hemoglobínicos, conocidos respectivamente como Hb Bart ( $\gamma_4$ ) y HbH ( $\beta_4$ ) que es inestable y llega a ser insoluble cuando el eritrocito envejece, precipitándose en ese momento, lo que produce la destrucción de los hematíes viejos. En este tipo de talasemias la anemia hemolítica puede ser leve, moderada o grave y el grado de eritropoyesis ineficaz es mucho menor que en la  $\beta$ -talasemia <sup>(89)</sup>.

Otra consecuencia importante que se deriva de la formación de Hb de Bart y HbH es que estas hemoglobinas poseen gran afinidad por el oxígeno al no presentar el efecto hemo-hemo, lo que las inhabilita para transportar este gas, ya que no pueden cederlo a los tejidos.

Como se acaba de exponer, en la  $\beta$ -talasemia nos encontramos con una anemia microcítica e hipocrómica a la que se le añade un cierto componente hemolítico. El exceso de hierro que se produce por la síntesis disminuida de globina, se acumula dentro de la célula eritroide, depositándose en sus mitocondrias, este fenómeno conduce a una disminución en la función de las enzimas mitocondriales, incluyendo las que se emplean en la síntesis del grupo hemo, la cual también se ve disminuida.

La anemia talasémica puede también verse influenciada por la deficiencia de ácido fólico, que se desarrolla en los sujetos afectados por las formas severas, a causa de los masivos requerimientos de esta sustancia como consecuencia de la hiperplasia eritroide medular.

### **1.7.1.1 $\beta$ -TALASEMIAS**

#### **1.7.1.1.1 FORMAS CLÍNICAS**

Aunque la  $\beta$ -talasemia tiene un fenotipo considerado dependiente de algunos factores tales como la naturaleza de la mutación que la desarrolla, clínicamente se pueden diferenciar tres estados, el rasgo talasémico o talasemia menor, la enfermedad o talasemia mayor y la talasemia intermedia.

#### **RASGO TALASÉMICO O TALASEMIA MENOR**

Se corresponde con la forma heterocigota, es decir, la mayoría de los individuos con rasgo talasémico son portadores de un gen  $\beta$  normal ( $\beta^A$ ) y otro gen  $\beta$  talasémico ( $\beta^T$ ) donde se localiza la mutación.

Se caracteriza por no tener, en general, una clínica llamativa y ser muchas veces un hallazgo casual. El diagnóstico se basa en la microcitosis, con un volumen corpuscular medio

de entre 60 y 75 fl, morfología anormal de los hematíes y una concentración de HbA<sub>2</sub> entre 4 y 6 %.

Se han descrito también, casos de  $\beta$ -talasemia heterocigota con valores normales de HbA<sub>2</sub>, de dos tipos <sup>(90)</sup>:

**A.-Tipo I o silente:** fue descrito por primera vez por Schwartz y se caracteriza por una morfología de los hematíes normal o mínimamente alterada e índices eritrocitarios normales <sup>(91)</sup>. La síntesis de cadenas sin embargo, se encuentra alterada ( $\alpha/\beta = 1,6$ ). Su interacción con una  $\beta$ -talasemia de HbA<sub>2</sub> elevada, da lugar a un cuadro generalmente de talasemia intermedia.

**B.-Tipo II.** Presentan una morfología de serie roja anormal y un mayor desequilibrio en la síntesis de cadenas ( $\alpha/\beta = 2,5$ ) con valores normales de HbA<sub>2</sub>.

### **TALASEMIA MAYOR O ANEMIA DE COOLEY**

Corresponde a la forma más grave de la enfermedad, los individuos que la padecen son portadores de dos genes talasémicos ( $\beta^T/\beta^T$ ), es decir, son homocigotos.

La evolución a largo plazo es fatal, debido a la siderosis hepática y miocárdica, acompañada de esplenomegalia, deformaciones óseas y anemia hemolítica. La anemia es como consecuencia de una eritropoyesis ineficaz, hemólisis y reducida hemoglobinización de los glóbulos rojos, lo que les hace ser transfusión dependiente.

En el laboratorio se reconoce por el aumento de HbF, oscilando entre 50-60 % y hasta el 95%, con una HbA<sub>2</sub> normal o ligeramente aumentada, y en algunos casos con total ausencia de HbA. El estudio de los padres corrobora el diagnóstico.

## TALASEMIA INTERMEDIA

Esta denominación se reserva para casos sintomáticos que espontáneamente mantienen niveles de hemoglobina entre 7 y 10 g/dl y que solo ocasionalmente reciben transfusiones. Por lo tanto, es una forma clínica de menor gravedad que la talasemia mayor. En general, es como resultado de la combinación de defectos genéticos <sup>(92,93)</sup>:

- a) Homocigosis para genes  $\beta^+$  talasémicos de menor gravedad;
- b) Combinación del gen  $\beta^0$ -talasémico grave con una  $\beta^+$ -talasemia particularmente benigna (como una  $\beta$ -talasemia silente Tipo I);
- c) Presencia de factores genéticos que aumentan la producción de cadenas  $\gamma$  globina (persistencia hereditaria de Hb F,  $\delta\beta$ -talasemia o mutaciones de  $\beta$ -talasemia asociadas con un incremento de cadenas  $\gamma$ ) las cuales se combinan con el exceso de cadenas  $\alpha$  para formar Hb F;
- d) Herencia de una  $\beta$ -talasemia heterocigota asociada a una triplicación de genes  $\alpha(\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$  o  $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha)$  y la presencia de variantes de hemoglobinas inestables en estado heterocigoto ( $\beta$ -talasemia dominante) <sup>(94-98)</sup>.
- e) Asociación de  $\alpha$ -talasemia con una  $\beta$ -talasemia homocigota o doble heterocigota, produciendo un equilibrio en la síntesis de cadenas de globina <sup>(99,100)</sup>.

### 1.7.1.1.2 Base molecular de las $\beta$ -Talasemias

La mayoría de los defectos génicos responsables de las  $\beta$ -talasemias es la mutación de un único nucleótido (mutación puntual) que afecta a uno de los diferentes procesos moleculares involucrados en la expresión del gen  $\beta$  globina; transcripción, procesamiento del

pre-ARNm y traducción. Al contrario que en las  $\alpha$ -talasemias, solamente una minoría de las  $\beta$ -talasemias están producidas por deleciones en el gen.

Los diferentes mecanismos responsables de la  $\beta$ -talasemia representan modelos de inactivación de los genes en mamíferos, y el análisis de los defectos en las talasemias ha permitido entender algunos aspectos generales de la expresión de los genes.

En la Tabla 1.1 se pueden observar las mutaciones para la  $\beta$ -talasemia y los mecanismos moleculares por los cuales se va a alterar la expresión del gen  $\beta$ -globina.

Alrededor de 200 mutaciones han sido descritas hasta el momento <sup>(46)</sup>. Entre las mutaciones puntuales cuyo fenotipo es conocido, la mayoría no tiene síntesis de cadena  $\beta$  ( $\beta^0$ ).

Este gran número de defectos tiene una peculiar distribución entre las diferentes poblaciones, de modo que, en cada población hay un número limitado de mutaciones, generalmente entre 5 y 8 que representan el 90% de los defectos moleculares <sup>(46)</sup>.

MECANISMOS	TIPO	FENOTIPO
1. TRANSCRIPCIÓN	$\beta^+$	Leve
2. PROCESAMIENTO DEL ARNm		
a. Sitio CAP	$\beta^+$	Leve
b. Proceso de <i>Splicing</i>		
b.1 Zonas Consenso	$\beta^+$	Leve/Severa
Zonas de Empalme ( <i>Splice junction</i> )	$\beta^0$	Severa*
b.2 Exones	$\beta^+$	Leve
b.3 Intrones	$\beta^0$	Severa
	$\beta^+$	Leve
c. Escisión y Poliadenilación	$\beta^+$	Leve
3. TRADUCCIÓN		
a. Codon de Iniciación	$\beta^0$	Severa
b. Terminación Prematura		
b.1 Mutación sin sentido	$\beta^0$	Severa
b.2 Alteración en el marco de lectura ( <i>Frameshift</i> )	$\beta^0$	Severa*

**Tabla 1.1** Mecanismos responsables de  $\beta$ -talasemia. \*Algunas veces son moderadas, debido a que la producción de Hb F puede verse aumentada.

Los defectos genéticos pueden agruparse en tres categorías:

1. -Grandes deleciones: pérdida de un gran fragmento de ADN (de 300 a más de 2000 nucleótidos) que contiene a los genes de globina o deleciones que remueven el LCR.

2. -Pequeñas deleciones o inserciones: la pérdida, y más raramente la inserción de 1, 2 o 4 nucleótidos produce un desplazamiento de bases a lo largo del ADN (*frameshift mutation*), de modo que el mensaje transmitido por el ARNm es incorrecto y no permite la síntesis de una cadena de globina completa y estable.

3. -Mutaciones puntuales: caracterizadas por la sustitución de una única base en el ADN.

Generalmente, cada mutación está contenida en un haplotipo específico (conjunto de polimorfismos definidos por enzimas de restricción en el *cluster* del gen  $\beta$  globina). La asociación entre una mutación específica y un determinado haplotipo, es muy alta, pero no absoluta, de hecho algunas mutaciones han sido detectadas con diferentes haplotipos, este tipo de asociaciones puede ser explicado por diferentes mecanismos; recombinación durante la meiosis, inversión del gen o por mutaciones recurrentes <sup>(32)</sup>.

#### **1.7.1.1.2.1 RELACIÓN ENTRE LA ALTERACIÓN MOLECULAR Y EL FENOTIPO**

##### **MUTACIONES EN LA TRANSCRIPCIÓN**

Se han descrito mutaciones de alelos que afectan a las secuencias conservadas en la región promotora del gen  $\beta$  globina (Tabla 1.1), ocurren en el "TATA *box*", en la zona proximal de la "CACCC *box*" y en la zona distal de la "CACCC *box*" <sup>(101)</sup>. Todas ellas producen una reducción del ARNm y generalmente están asociadas con un fenotipo leve; otras mutaciones están localizadas en el extremo 5' del ARNm transcrito.

Seis de estos tipos de mutaciones han sido localizadas en el Mediterráneo (Tabla 1.2) y en todos los casos, la mutación es puntual, exceptuando la localizada en China <sup>(102)</sup> que es como consecuencia de una deleción de 4 pb.

## MUTACIONES QUE AFECTAN AL PROCESAMIENTO DEL ARNm

Los complejos mecanismos que envuelven la modificación del pre-ARNm son esenciales para que la traducción del ARNm maduro sea eficiente. Esta complejidad queda reflejada en la patología molecular de las mutaciones durante el procesamiento. El estudio de algunas de estas mutaciones ha permitido obtener información sobre los mecanismos del procesamiento y conocer la importancia de las secuencias conservadas que en él participan.

El efecto de estas mutaciones es variable, desde una disminución de cadena  $\beta$  ( $\beta^+$  talasemia) hasta su completa ausencia ( $\beta^0$  talasemia).

### A.- Mutación en el sitio de unión del CAP

Una sola mutación ha sido encontrada en esta posición, la sustitución de A→C en el nucleótido 1 en un homocigoto <sup>(36)</sup> (Tabla 1.1). El paciente presenta una talasemia leve, mientras que el estado heterocigoto muestra un VCM y una HbA<sub>2</sub>, en los límites de la normalidad.

Esta mutación puede actuar a nivel de la transcripción <sup>(66)</sup> o en el *capping*, con un efecto secundario sobre la traducción, aunque el mecanismo por el cual esta mutación origina este fenotipo no está bien definido.

### B.- Mutaciones en el proceso de empalme (*splicing*)

#### 1. - Mutaciones en las secuencias consenso para *el splicing*

Los dinucleótidos invariables del extremo donador 5' (GT) y los del extremo aceptor 3' (AG) son absolutamente necesarios para el *splicing*. Su sustitución o deleción, inactiva completamente el proceso normal de *splicing*, resultando una  $\beta^0$  talasemia. Existen, además, otros sitios presentes en el ARNm, no usados normalmente y denominados zonas crípticas

(*cryptic splice sites*) que pueden ser utilizados para generar moléculas de ARNm anómalas o no funcionales. Así, se ha visto que el extremo donador (nucleótido 1) del intrón 1 (IVS-1) activa a dos zonas crípticas localizadas en el exón 1 y una tercera zona situada en el primer intrón; en el caso de la mutación IVS-2 nt 1 (G→A) se activa una zona críptica donadora en el IVS-2 <sup>(103,104)</sup> y una zona críptica aceptora de la posición 579 en el IVS-2 es usada en presencia de esta mutación <sup>(105)</sup>. Estas mutaciones están asociadas a una  $\beta^0$  talasemia severa a excepción de la IVS-2 nt 1 (G→A) con un comportamiento de talasemia intermedia en estado homocigoto, debido a la asociación con la mutación en la posición -158 (C→T) del gen  $\alpha\gamma$ , el cual bajo una situación de eritropoyesis de estrés parece producir cadena  $\gamma$  en la vida adulta <sup>(106-108)</sup>.

Por otro lado, las mutaciones en las zonas consenso, reducen la eficacia del empalme y tienen un efecto variable en la producción de cadena  $\beta$ , conduciendo a un fenotipo  $\beta^+$  que puede variar desde leve a severo, así, la sustitución de G→C o G→A en el nucleótido 5 del IVS-1 originan una forma severa de  $\beta^+$ -talasemia, mientras que la sustitución de G→T en la misma posición y la mutación T→C en el nucleótido 6 del mismo intrón producen solamente una ligera reducción en la síntesis de cadena  $\beta$  <sup>(104,108-110)</sup>.

Las mutaciones de estas secuencias consenso, al igual que las que ocurren en los dinucleótidos invariables, activan las zonas crípticas presentes en el pre-ARNm <sup>(51,111)</sup>.

Todas estas mutaciones han sido detectadas en la cuenca del Mediterráneo (Tabla 1.2).

MECANISMOS	TIPO	MECANISMOS	TIPO
1. TRANSCRIPCIÓN	$\beta^+$	b.3 Intrones	
-92 (C→T)	$\beta^+$	IVS- I -nt 110 (G→A)	$\beta^+$
-90 (C→T)	$\beta^+$	IVS- I -nt 116 (T→G)	$\beta^0$
-87 (C→G)	$\beta^+$	IVS-II-nt 705 (T→C)	$\beta^+$
-87 (C→T)	$\beta^+$	IVS-II-nt745 (C→G)	$\beta^+$
-86 (C→A)	$\beta^+$	c. Escisión y poliadenilación	
+22 (G→A)	$\beta^+$	AAT <u>A</u> AA→AAT <u>G</u> AA	$\beta^+$
2. PROCESAMIENTO DEL ARNm		3. TRADUCCIÓN	
a. Sitio CAP: ninguna	$\beta^+$	a. Codon de iniciación: ninguna	
b. Proceso de Splicing		b. Terminación prematura	
b.1 Zonas consenso y splice junction		b.1 Mutación sin sentido	
IVS-I-5'end (-44bp)	$\beta^0$	CD 15 (T <u>G</u> G→T <u>G</u> A)	$\beta^0$
IVS-I-nt 1 (G→A)	$\beta^0$	CD 37 (G→A)	$\beta^0$
IVS-I-nt 2 (T→G)	$\beta^0$	CD 39 (C→T)	$\beta^0$
IVS-I-nt 5 (G→T)	$\beta^+$	b.2 Frameshift	
IVS-I-nt 5 (G→A)	$\beta^0$	CD 1 (-G)	$\beta^0$
IVS-I-nt 6 (T→C)	$\beta^+$	CD 5 (-CT)	$\beta^0$
IVS-I-nt 130 (G→A)	$\beta^0$	CD 6 (-A)	$\beta^0$
IVS-I-3'end (G→C)	$\beta^0$	CD 8 (-AA)	$\beta^0$
IVS-II-nt 1 (G→A)	$\beta^+$	CD 819 (+G)	$\beta^0$
IVS-II-nt 844 (C→G)	$\beta^+$	CD 11 (-T)	$\beta^0$
IVS-II-nt 850 (-G)	$\beta^0$	CD 76 (-C)	$\beta^0$
b.2 Exones		CD 94 (+TG)	$\beta^0$
CD 27 (G→T) [Hb Knossos]	$\beta^+$	CD 126 (-T)	$\beta^+$

**Tabla 1.2** Mutaciones encontradas en el Mediterráneo.

## **2. - Mutaciones en los exones que originan un lugar alternativo para el *splicing***

La secuencia que comprende desde el codon 24 al 27 (GTGGTGAGG) es similar al extremo donador; se ha visto que la sustitución de nucleótidos de esta zona puede modificar la secuencia, haciéndola más similar al extremo donador, de tal forma, que compite con el auténtico extremo donador <sup>(46)</sup>.

Cuatro son las mutaciones descritas en esta región, las cuales, como se dijo anteriormente, activan las zonas crípticas. Una de ellas es una mutación "silente", en el sentido que la sustitución en el codon 24 (GCT→GGA) no origina cambio de aminoácido en la cadena de globina, sino que disminuye un 75% la acumulación del ARNm normal, originando con ello una  $\beta^+$ -talasemia severa <sup>(112)</sup>.

Las otras tres mutaciones descritas, se localizan en los códones 19 (A→G), 26 (G→A) y 27 (G→T), dando origen todas ellas a hemoglobinas anómalas, Hb Malay, HbE y Hb Knossos (propia del Mediterráneo, Tabla 1.2) respectivamente. Como consecuencia del cambio en el codon, el rendimiento de cadena  $\beta$  globina se encuentra reducido, debido a la activación de las zonas crípticas y consecuentemente el *splicing* no se produce con normalidad, originando todas ellas una  $\beta^+$ -talasemia leve <sup>(113-115)</sup>.

## **3. - Mutaciones en los intrones que originan un lugar alternativo para el *splicing***

En los intrones del gen  $\beta$  globina existen secuencias que se parecen notablemente a las regiones consenso del *splicing*. La sustitución de nucleótidos en estas regiones las hace ser más similares a las verdaderas zonas del *splicing* y activar las zonas crípticas. Un total de seis mutaciones han sido descritas, de las cuales cinco, han sido detectadas en el Mediterráneo (Tabla 1.2).

La sustitución de G→A en el nucleótido 110 dentro del primer intrón provoca la activación de una zona aceptora críptica, ya que se ha creado un nuevo dinucleótido invariable AG. Aproximadamente el 90% del pre-ARNm se une a esta zona alterada, originando un ARNm maduro anómalo <sup>(48)</sup>, el 10% restante es normal, con un fenotipo de β<sup>+</sup> talasemia severa.

Otro mecanismo observado es el que se origina cuando la sustitución tiene lugar en la posición 116 del IVS-I (T→G), se crea una nueva zona *de splicing* tan eficiente que el aceptor normal no es utilizado, originándose una β<sup>0</sup>-talasemia <sup>(116)</sup>.

Las mutaciones que se localizan en el segundo intrón (C→T nt 654, T→C nt 705, C→G nt 745) crean una nueva zona donadora en la misma posición que la mutación y al mismo tiempo se produce la activación de una zona críptica aceptora localizada después del nucleótido 579, obteniéndose dos ARNm anómalos, uno es el que resulta del *splicing* que ha utilizado el donador normal y el aceptor de la zona críptica, mientras que el segundo emplea el nuevo donador y el aceptor normal. En cualquiera de las formas, lo que se obtiene es una β<sup>+</sup>-talasemia severa <sup>(32,117,118)</sup>.

### **C.- Mutaciones que afectan a la escisión y poliadenilación**

Varias mutaciones que afectan a la escisión y a la señal de poliadenilación del extremo 3' han sido descritas (Tabla 1.1), aunque solo una en el Mediterráneo (Tabla 1.2) <sup>(92)</sup>. Los mecanismos por los cuales se obtiene una síntesis reducida de cadena β no están claros, se cree que la poliadenilación, probablemente, sea llevada a cabo en la señal AATAA situada a 1 kb cadena abajo y que dicha unión sea inestable.

## **MUTACIONES EN EL PROCESO DE TRADUCCIÓN**

### **A.- Codon de iniciación**

En el gen  $\beta$ , en la posición 49 a la izquierda del sitio CAP, aparece un codon AUG que corresponde con la señal para iniciar la traducción. Las posibles mutaciones que se originen en este codon, suprimen la traducción y originan una  $\beta$ -talasemia. Tres son las anomalías localizadas en este codon hasta el momento y ninguna de ellas en el Mediterráneo <sup>(51,119,120)</sup>.

### **B.- Terminación prematura**

#### **1. - Mutación sin sentido**

La sustitución de una de las bases de un triplete que codifica a un aminoácido, origina uno de los tres codones de terminación (TAG, TAA y TGA) lo cual da lugar a la terminación prematura de la traducción del ARNm. Estas mutaciones se denominan "sin sentido" y originan una  $\beta^0$ -talasemia. Las dos más frecuentes son la sustitución de CAG→TAG en el codon 39 y la sustitución en el codon 17 de AAG→TAG. La primera es una de las más prevalentes en la población mediterránea (Tabla 1.2) <sup>(121-124)</sup>, mientras que la segunda es la primera mutación sin sentido descrita en 1979 por Chang y col. en la población china <sup>(44)</sup>.

En este tipo de mutaciones se observa una pequeña cantidad de ARNm en el núcleo y en el citoplasma de los precursores eritroides, esta reducción, probablemente, depende de la degradación intranuclear del ARNm mutado, lo cual sugiere que el control de la traducción del ARNm se lleva a cabo a nivel nuclear durante el procesamiento del ARNm o bien durante el transporte del mismo al citoplasma.

## **2. - Frameshift (Alteración del marco de lectura)**

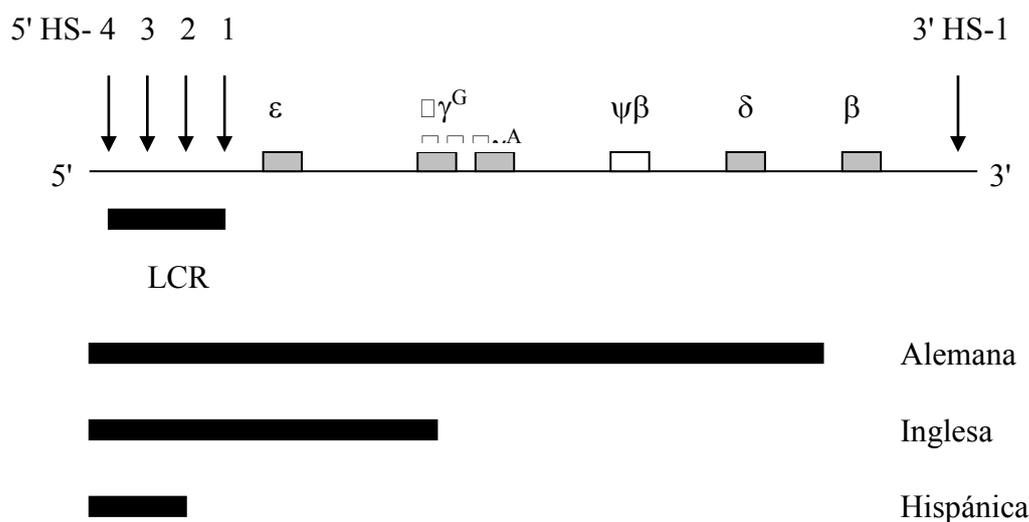
Este segundo tipo de mutaciones que originan la terminación prematura de la traducción, incluye inserciones o deleciones de 1, 2 o 4 nucleótidos en la región codificadora del gen  $\beta$  globina <sup>(98)</sup>. Al modificarse el marco normal de lectura, se origina primero una secuencia de aminoácidos anómala y aproximadamente a 50 nucleótidos de esta mutación se forma un codon de terminación. El resultado final, es una  $\beta^0$ -talasemia severa, aunque existen excepciones como es la mutación codon 6 (-A) en la población mediterránea que se comporta como una talasemia intermedia en el estado homocigoto, aunque en estos casos, lo más probable es que vaya asociada a la sustitución de C→T en el nucleótido -158 del gen  $G\gamma$  del promotor <sup>(46)</sup>.

### **DELECIONES QUE PRODUCEN $\beta$ -TALASEMIA**

El *cluster* del gen  $\beta$ , puede verse afectado por grandes deleciones, algunas de las cuales incluye la deleción de los genes  $\delta$  y  $\beta$  y dan lugar a una  $\delta\beta$ -talasemia o bien a una Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF), otras afectan solamente al gen  $\beta$  globina produciendo una  $\beta^0$ -talasemia <sup>(46)</sup>.

La deleción más común, típica del mundo hindú, elimina 619 pb que comprenden un tercio del IVS-2, el exon 3 y secuencias del extremo 3' del gen  $\beta$  <sup>(125)</sup>. Existen otros tipos de deleciones que se inician antes del gen  $\beta$ , con una extensión variable, caracterizadas por permanecer íntegro el gen  $\beta$  pero inactivo. La no expresión del gen  $\beta$  globina es consecuencia de la deleción en el extremo 5', que incluye a la región  $\beta$ -LCR, inactivando el proceso de transcripción <sup>(73)</sup> (Figura 1.8).

Este tipo de anomalías ha sido observado en estado heterocigoto y se les denomina  $\gamma\delta\beta$ -talasemia <sup>(126,127)</sup>, presentando una hemólisis neonatal, mientras que en la edad adulta se observa microcitosis e hipocromía sin aumento de HbA<sub>2</sub>, (talasemia silente tipo II).



**Figura 1.8** Tres deleciones en el *cluster* del gen  $\beta$  globina. A pesar de dejar intacto el gen  $\beta$  causan fenotipo de  $\beta$  Th. Al comienzo de la figura se muestran sitios hipersensibles a la DNasa I (5'HS) señalados con las flechas 1-4 y el enhancer 3' (3'HS-1). Las tres deleciones, Alemana, Inglesa e Hipánica hacen perder 3 de los 5 sitios hipersensibles produciendo la inactivación del gen  $\beta$  en cis.

Por su parte, las  $\delta\beta$ -talasemia, son originadas generalmente por deleciones que pierden o inactivan los genes  $\delta$  y  $\beta$  <sup>(128)</sup>.

Por último, las PHHF, son situaciones asintomáticas en las que persiste la síntesis de cantidades apreciables de HbF durante la vida adulta, produciendo fenotipos semejantes a  $\delta\beta$ -talasemia. Con todo, la síntesis deficiente de cadena  $\beta$  es casi completamente compensada por la producción aumentada de cadenas  $\gamma$ .

Las formas delecionadas (PHHF-1 y PHHF-2), se caracterizan por la ausencia de expresión del gen  $\beta$  y la elevada producción de cadenas  $G\gamma$  y  $A\gamma$  <sup>(129)</sup>. Por el contrario, las formas no delecionadas conservan la actividad del gen  $\beta$  y son en su mayoría resultado de mutaciones puntuales en regiones reguladoras de los genes  $\gamma$ , con elevada producción de cadenas  $G\gamma$  y  $A\gamma$  <sup>(130-131)</sup>.

### **$\beta$ TALASEMIAS DEBIDAS A MUTACIONES DESCONOCIDAS**

En 1984, Semenza y col. publicaron el primer caso de portador silente de talasemia, cuya mutación no estaba ligada al cluster  $\beta$  globina <sup>(132)</sup>. La hipótesis más aceptada es que estas mutaciones están localizadas en una zona distante del gen  $\beta$  globina, lo más probable es encontrarlas en la región LCR 5' del gen  $\epsilon$  globina <sup>(51,133)</sup>.

#### **1.7.1.2 HEMOGLOBINOPATÍAS TALASÉMICAS**

Bajo esta denominación se engloban una serie de hemoglobinopatías que dan lugar a cuadros de talasemia. Se pueden dividir en tres grupos, según el mecanismo por el cual se produce la talasemia:

1. -Hemoglobinopatías producidas por la fusión de dos genes vecinos.
2. -Hemoglobinopatías asociadas con un procesamiento anormal del ARNm.
3. -Hemoglobinas inestables.

#### **1. - Hemoglobinopatías producidas por la fusión de dos genes vecinos**

Algunas hemoglobinopatías, como la Hb Lepore, Hb Miyada o Hb P-Nilotic son producto de un gen resultante de la fusión de dos genes cercanos conociéndose como hemoglobinas de fusión.

Baglioni fue el primero en sugerir la cercanía entre los genes  $\delta$  y  $\beta$  y describir la fusión de estos genes como causa de hemoglobina Lepore <sup>(64)</sup> (Figura 1.4). Según la posición del gen en que ocurre la recombinación entre los genes  $\delta$  y  $\beta$  se originan distintos tipos de cadena Lepore, habiéndose descrito tres; Lepore Hollandia ( $\delta 22/\beta 50$ ), Lepore Baltimore ( $\delta 50/\beta 86$ ) y Lepore Boston ( $\delta 87/\beta 116$ ). El tipo más frecuente es el Lepore Boston, en los que los primeros 87 aminoácidos son idénticos a la cadena  $\delta$  y desde el 116 al 146 su secuencia se corresponde con la de la cadena  $\beta$ .

La expresión del gen Lepore, al igual que la de otros productos de fusión  $\delta\beta$ , se encuentra disminuida, dando lugar a un fenotipo de  $\beta$ -talasemia <sup>(134)</sup>.

## **2. - Hemoglobinopatías asociadas con un procesamiento anormal del ARNm**

Un total de 11 hemoglobinopatías de este tipo han sido descritas hasta hoy, aunque las más comunes son la HbE (codon 26 GAG→AAG), Hb Malay (codon 19 AAC→AGC) y Hb Knossos (codon 27 GCC→TCC) <sup>(113-115)</sup>. Todas ellas, son como consecuencia de la sustitución de un nucleótido en distintos codones de los exones del gen  $\beta$  globina, y en dos casos, responden al mecanismo más frecuente de mutación, la inserción y delección de nucleótidos entre dos codones. En cualquier caso, el resultado final es una  $\beta$  talasemia <sup>(46)</sup>.

## **3. - Hemoglobinas inestables**

Algunas hemoglobinas inestables pueden producir un déficit de ARNm y conducir a un cuadro parecido a talasemia, en estos casos son el resultado de mutaciones sin sentido, originando la sustitución de un aminoácido en los residuos 60, 110, 112 y 127, en otras se han observado delecciones o inserciones entre 1 y 11 nucleótidos. Las más estudiadas son  $\beta$  Indianapolis (sustitución C→T en el codon 112) y la  $\beta$  Houston (sustitución CAG→CCG en el codon

127). Se sabe que en estas hemoglobinas la unión  $\alpha_1\beta_1$ , es muy débil y que el tetrámero formado por  $\alpha_2\beta^A\beta^X$  es rápidamente degradado <sup>(45)</sup>. Cuando la mutación es debida a inserción o deleción de nucleótidos, se forman unas cadenas  $\beta$  de globina sin COOH<sup>-</sup> terminal, de modo que no puede llevarse a cabo el dímero  $\alpha_1\beta_1$ , estas cadenas son tan inestables que no participan en el tetrámero de hemoglobina <sup>(51)</sup>.

### 1.7.1.3 $\alpha$ TALASEMIAS

Las  $\alpha$  talasemias, a diferencia de las  $\beta$  talasemias, en su gran mayoría son producidas por deleciones, debido a la particular estructura de los genes del *cluster*  $\alpha$ . La presencia de regiones homólogas duplicadas facilita que ocurran recombinaciones no homólogas durante la meiosis. Este mecanismo ha generado las dos deleciones más frecuentes que causan  $\alpha$  th, debidas a la pérdida de un solo gen  $\alpha$ .

### DELECIONES CAUSANTES DE $\alpha^+$ -TALASEMIAS

Los genes  $\alpha$  están divididos en segmentos homólogos (X; Y y Z) y no homólogos (I, II y III). La recombinación entre los segmentos Z, los cuales están separados por 3,7 kb, da lugar a la deleción *rightward* ó  $-\alpha^{3,7}$  <sup>(135)</sup>, produciendo un genotipo  $-\alpha^{3,7}/$ . Dependiendo del punto de recombinación existen a su vez tres subtipos:  $-\alpha^{3,7I}$ ,  $-\alpha^{3,7II}$  y  $-\alpha^{3,7III}$  y otro genotipo,  $\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}/$ . La deleción  $-\alpha^{3,7}$  es característica de poblaciones africanas, mediterráneas y chinas. Los individuos portadores de  $\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$  son normales desde el punto de vista fenotípico y hematológico aunque tengan un exceso de ARNm de cadena alfa <sup>(136)</sup>. Esta alteración se observa con frecuencia en poblaciones del Mediterráneo, oeste de Africa, Jamaica y población negra americana <sup>(137)</sup>.

La recombinación entre los segmentos X, los cuales están separados por 4,2 kb, da lugar a la delección *leftward* ó  $-\alpha^{4,2}$  produciendo un genotipo  $-\alpha^{4,2}/$  y otro  $-\alpha\alpha^{\text{anti } 4,2}/$ . Estas mutaciones se observan en la población china, siendo poco frecuentes en áreas del Mediterráneo <sup>(135)</sup>. También han sido descritas las delecciones de 3,5 kb, 5,3 kb y 2,7 kb como causantes de  $\alpha^+$  th.

En general las  $\alpha^+$  th son asintomáticas, el VCM es prácticamente normal, la HCM puede estar en el límite inferior o ligeramente disminuida y los demás parámetros hematológicos son normales. Su detección en el laboratorio, sólo es posible mediante técnicas de biología molecular.

### **DELECCIONES CAUSANTES DE $\alpha^0$ -TALASEMIAS**

Las  $\alpha^0$  th se producen por delecciones mas o menos amplias que abarcan desde 5,2 kb a más de 100 kb <sup>(138)</sup>. En los casos de heterocigosis el cuadro clínico es similar al hallado en los portadores de  $\beta$  th con VCM y HCM disminuidos, pero con niveles de Hb A<sub>2</sub> y F normales. Son importantes en caso de asociarse a otras formas de  $\alpha$  th, es decir doble heterocigosis ( $\alpha^0 \alpha^+$ ) u homocigosis ( $\alpha^0 \alpha^0$ ), porque implican formas más graves de enfermedad (Hb H, hidropesía fetal por Hb de Bart).

Existen algunas formas de  $\alpha^0$  th en las que la región deleccionada se encuentra corriente arriba del extremo 5' del *cluster*  $\alpha$ , permaneciendo intactos los genes  $\alpha$ . Estas delecciones, al silenciar la expresión de los genes  $\alpha$ , permitieron descubrir una secuencia de ADN, localizada 40 kb corriente arriba del gen  $\zeta$ , la cual controla la expresión de los genes  $\alpha$  y es conocida como elemento regulatorio mayor  $\alpha$  ó HS-40 <sup>(139)</sup>.

La gran mayoría de las  $\alpha^0$  th deleción son debidas a recombinaciones "ilegítimas", término que es utilizado para enfatizar la ausencia de zonas obvias de homología, las cuales podrían justificar el punto de ruptura y recombinación.

### **MUTACIONES PUNTUALES CAUSANTES DE $\alpha$ -TALASEMIAS**

Una minoría de  $\alpha$ - talasemias son producidas por mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o sustituciones de uno o más nucleótidos. Comunmente afectan al gen  $\alpha_2$  ( $\alpha^T\alpha$ ) y ocasionalmente al gen  $\alpha_1$  ( $\alpha\alpha^T$ ).

### **1.8 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA $\beta$ Y $\alpha$ TALASEMIA**

La distribución geográfica de las talasemias está relacionada con dos factores, a) el origen y la ventaja selectiva de las mutaciones talasémicas en regiones palúdicas y b) la divergencia de las razas humanas.

Debido a que individuos portadores de rasgo talasémico presentan una menor morbilidad a la malaria que individuos normales, hace pensar que la  $\beta$ -talasemia heterocigota es un factor de protección frente al paludismo <sup>(51)</sup>. Una situación similar ha sido bien documentada para la  $\alpha$ -talasemia <sup>(140)</sup>. Por lo tanto, las talasemias constituyen variaciones genéticas de los hematíes que les proporcionan a los heterocigotos una protección selectiva frente a la malaria por *Plasmodium malariae*.

La elevada heterogeneidad de alelos talasémicos, pone de manifiesto la gran divergencia de las razas humanas, cada etnia o grupo racial tiene su propia batería de alelos <sup>(51)</sup> y cuando la misma mutación aparece en dos grupos raciales diferentes, se podría explicar por dos orígenes independientes de la mutación <sup>(141,142)</sup>.

De esta forma tuvieron su origen y fueron seleccionadas mutaciones que tienen dicho efecto protector, alcanzando altas tasas de prevalencia en países Mediterráneos (Sur de Europa, Oriente Medio, Norte de África), África Tropical, Sudeste Asiático y Sur de China, sin embargo, la  $\beta$  talasemia ocurre esporádicamente en todos los grupos raciales y ha sido observada en estado homocigota en personas anglosajonas puras, por lo que el *background* racial no excluye la posibilidad de su diagnóstico.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), calcula que tienen lugar anualmente de 20.000 a 40.000 nuevos casos de  $\beta$ -talasemia homocigota, más de la mitad de los cuales ocurren en Asia. En Europa, las mayores prevalencias de heterocigotos ocurren en Italia donde existen zonas de alta frecuencia como el valle del Po, Calabria y Sicilia donde llega al 10% y Cerdeña, donde puede llegar al 20%, Grecia (8 %) y Chipre (18 %). En España, la frecuencia de la  $\beta$ -talasemia heterocigota con HbA<sub>2</sub> elevada es, aunque alta (0,1-2 %), inferior a la de otros países mediterráneos. La distribución no es homogénea y se encuentran frecuencias mayores entre gitanos (5,6%) y en la isla de Menorca (5 %) <sup>(143)</sup>.

Se estima que hay más de 4 millones de heterocigotos  $\beta$  talasémicos en el Sur de Europa y alrededor de 200.000 en España y Portugal.

La llegada de los primeros genes talasémicos a América se produjo con la conquista española, aunque probablemente hayan llegado más con los portugueses que se dirigieron al Brasil. En Argentina, un gran ingreso se produjo con la inmigración mediterránea a fines del siglo XIX y comienzos del XX.

Con respecto a los grupos aborígenes de América, estudios realizados en Méjico, países del Caribe, Venezuela y Brasil, demuestran que casi no existen en estos grupos, no así en los grupos mixtos, sobre todo en los afroamerindios en que pueden presentarse algunos

casos de  $\alpha$  talasemia. En los países que recibieron una fuerte inmigración proveniente de Italia como Brasil, el rasgo  $\beta$  talasémico en los individuos de origen italiano es del 6,4 % <sup>(144)</sup>.

Con respecto a nuestro país, no existen estudios realizados en aborígenes, pero es fácil encontrar las formas heterocigotas de  $\beta$  talasemia en zonas colonizadas por inmigrantes mediterráneos.

Estudios en la provincia de Buenos Aires dan una incidencia de  $\beta$  talasemia sobre la población total de 0,8% <sup>(145)</sup>. En Rosario y el sur de la provincia de Santa Fe dado que esta zona ha sido colonizada sobre todo por italianos, la prevalencia es mayor <sup>(146)</sup>.

Las  $\alpha^+$  th son raramente menores al 10% en regiones donde existe malaria y en algunos países como Nepal, India (Andhra Pradesh) y la costa norte de Papua Nueva Guinea llegan al 80%. En el oeste de Africa oscilan entre 20 y 30% y en la zona del Mediterráneo entre el 5 y 10%.

## 1.9 OBJETIVOS

Como mencionáramos anteriormente, las talasemias están presentes en millones de personas.

Son cada vez más numerosos los países que aún sin tener grandes problemas sanitarios por estas patologías, se dedican a conocer su prevalencia y planifican amplias campañas para su detección.

En nuestro país los estudios epidemiológicos sobre  $\beta$  talasemia, aunque escasos y fragmentarios, han evidenciado una cierta heterogeneidad genotípica. En Rosario, no hay datos publicados sobre la frecuencia de las distintas mutaciones que producen  $\beta$  talasemia.

Debido a esto y dada la ascendencia genética fundamentalmente mediterránea, se diseñó el presente estudio para optar al grado de Doctora y con los siguientes objetivos:

1- Determinar la heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia que nos permitirá no sólo dar el adecuado asesoramiento genético sino también establecer fehacientemente la existencia de formas graves o leves en el feto mediante el diagnóstico prenatal.

2- Interrelacionar el fenotipo de la mutación responsable de la  $\beta$ -talasemia ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ) con los parámetros hematológicos.

3- Tratar de establecer la causa de las diferencias fenotípicas observadas en portadores talasémicos que presentan la misma mutación.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1 SUJETOS DE ESTUDIO**

### **2.1.1 SUJETOS NORMALES**

Con el objetivo de obtener nuestros valores normales en el patrón de hierro y en el dosaje de hemoglobina A<sub>2</sub> y hemoglobina F, se realizó el estudio de un grupo control constituido por 150 individuos normales (59 varones, 70 mujeres en edad gestacional no embarazadas y 21 niños de 1 a 13 años), considerados normales al tener los valores hematimétricos dentro de los rangos normales, morfología de serie roja normal y no presentar ninguna alteración en el estudio de hemoglobinas por electroforesis.

### **2.1.2 SUJETOS TALASÉMICOS**

Desde 1996 hasta fines de 2000, se han estudiado 124 individuos mayores de un año (79 mujeres no embarazadas, 30 varones y 15 niños), no emparentados entre sí, originarios de Rosario y su zona de influencia.

En unos casos se trató de sujetos asintomáticos o con leves manifestaciones clínicas que acudieron a nuestro Servicio (Servicio de Hematología- Sala 9- Hospital Provincial del Centenario) por haber presentado microcitosis en un análisis de sangre rutinario coincidiendo con un ingreso quirúrgico, proceso infeccioso banal o chequeo de salud, y otros eran pacientes diagnosticados como portadores de  $\beta$  talasemia con anterioridad.

Durante la realización de este trabajo de tesis fue derivado a nuestro Servicio un paciente de 15 meses (hijo de un matrimonio de portadores de  $\beta$  talasemia incluidos en este estudio) por presentar un cuadro de anemia severa con requerimiento transfusional importante.

## 2.2 PROTOCOLO DE ESTUDIO

A todas las muestras mencionadas anteriormente (2.1.2) se les practicaron las siguientes determinaciones:

1. Estudio hematimétrico:

Cuantificación de hematíes, hemoglobina y hematocrito.

Determinación de los índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM

Observación de la morfología eritrocitaria

Recuento de reticulocitos

2. Metabolismo férrico:

Dosaje de hierro y capacidad de saturación de la siderofilina (TIBC)

Determinación de ferritina sérica

3. Estudio de hemoglobinas

Electroforesis de hemoglobinas en acetato de celulosa a pH 9,0

Electroforesis de hemoglobinas en agar-citrato a pH 6,1

Cuantificación de hemoglobina Fetal

Test de cuerpos de inclusión

Test de inestabilidad térmica

Test de anaerobiosis

4. Estudios moleculares

Búsqueda de la mutación responsable de  $\beta$  talasemia

Presencia de la delección  $-\alpha^{3,7}$

Presencia de la triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$ ) en aquellos individuos en los

que el dosaje de Hb estuvo por debajo de 11 g/dl (varones y mujeres > 50 años) y por debajo

de 10,5 g/dl (mujeres  $\leq$  50 años y niños).

## **2.3 TÉCNICAS EMPLEADAS**

### **2.3.1 Recolección de muestras y conservación**

En condiciones basales se extrajeron 20 ml de sangre venosa que se repartieron en un tubo seco y en 2 tubos con K<sub>3</sub>EDTA como anticoagulante en la proporción establecida por Dacie y Lewis en 1970 <sup>(147)</sup>. Una de las fracciones anticoaguladas se utilizó para realizar los estudios hematimétricos. El resto de la sangre de este tubo se procesó para realizar el estudio convencional de Hemoglobinas.

Se realizaron extendidos con sangre sin anticoagulante, los cuales fueron teñidos con el colorante May Grünwald Giemsa para el estudio de la morfología de serie roja. La sangre del tubo restante con anticoagulante se utilizó para la extracción de ADN, conservándose a -20° C para su posterior estudio por técnicas de biología molecular.

El suero obtenido del tubo seco se empleó en la determinación de hierro, capacidad total de saturación de la siderofilina y ferritina.

### **2.3.2 Estudio hematimétrico**

Se determinaron por impedancia eléctrica en un contador automático Cell Dyn-Abbott 1400 los siguientes parámetros:

- Recuento de hematíes (GR), expresados en número de hematíes x 10<sup>12</sup>/l.
- Valor hematocrito (Hto), expresado en ml de hematíes/100 ml de sangre total (%).
- Concentración de Hemoglobina (Hb), expresada en g/dl.
- Volumen Corpuscular Medio (VCM), expresado en femtolitros (fL).
- Hemoglobina Corpuscular media (HCM), expresada en picogramos (pg).
- Concentración de Hemoglobina Corpuscular media (CHCM), expresada en g/dl.

### **2.3.3 Recuento de reticulocitos**

Se realizó según el método de Dacie <sup>(147)</sup>. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

### **2.3.4 Morfología eritrocitaria**

Para la observación microscópica de la morfología eritrocitaria se efectuaron extendidos de sangre sin anticoagulante que fueron secados en forma inmediata <sup>(148)</sup> y teñidos con el colorante May Grünwald Giemsa.

### **2.3.5 Dosaje de hierro**

El dosaje de hierro así como la capacidad de saturación de la siderofilina y la ferritina fueron realizados en las muestras de suero de estos individuos, quienes no estaban realizando terapéutica con hierro o la habían suspendido por lo menos una semana antes de efectuar la determinación.

La determinación de hierro se llevó a cabo por el método recomendado por el International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) <sup>(149)</sup>.

### **2.3.6 Capacidad de saturación de la siderofilina**

La determinación de la capacidad total de saturación de la siderofilina se realizó mediante el método recomendado por el ICSH <sup>(150)</sup>. Las lecturas fueron efectuadas en un espectrofotómetro Turner Model 330.

### **2.3.7 Determinación de ferritina sérica**

Esta determinación se realizó mediante test inmunoenzimático in vitro (Enzymun-Test Ferritina- Boehringer Mannheim) <sup>(151)</sup>.

El estudio convencional de Hemoglobinas comprendió:

### **2.3.8 Electroforesis de Hemoglobinas en Acetato de Celulosa (pH= 9,0)**

#### **REACTIVOS**

Agua destilada.

Tetracloruro de carbono (Cl<sub>4</sub>C) (Anedra).

Solución salina isotónica (ClNa 0,9 g/dl) (Anedra).

Buffer Tris-EDTA-Borato pH 9.0 (Anedra).

Tiras de acetato de celulosa (Byosystems S.A.).

Solución colorante Negro de Amido (Merck, Darmstadt) [0,5% en agua destilada, alcohol metílico (CH<sub>3</sub>OH) y ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) (45:45:10)] (Anedra).

Solución decolorante: agua destilada, alcohol metílico y ácido acético (45:45:10) (Anedra).

#### **PROCEDIMIENTO**

El hemolizado fue preparado según método descrito por Efremov y Huisman <sup>(152)</sup>, utilizando Cl<sub>4</sub>C para la eliminación de estromas. La solución de hemoglobinas fue ajustada aproximadamente a 10 g/dl, siendo procesadas inmediatamente. Las muestras que no pudieron ser procesadas en el día se conservaron a -20° C en forma de oxihemoglobina por un máximo de una semana.

En este hemolizado se investigó la presencia de hemoglobinas anormales, efectuando las corridas electroforéticas en tiras de acetato de celulosa, usando buffer Tris-EDTA-Borato

pH 9,0, según técnica descrita por Efremov y Huisman <sup>(152)</sup>. Se utilizaron como testigos los siguiente hemolizados: - sangre de adultos normales (Hb A y A<sub>2</sub>); - sangre de cordón (Hb F); - sangre de paciente heterocigota para Hb S y - sangre de paciente heterocigota para Hb C. Las tiras se inspeccionaron a los 20 minutos de iniciada la electroforesis, con el fin de visualizar la presencia de Hb H. Una vez finalizada la electroforesis, aproximadamente a las 2 hs., fueron teñidas con colorante Negro de Amido durante 5 minutos y posteriormente decoloradas con solución decolorante.

### **2.3.9 Electroforesis de Hemoglobinas en Agar Citrato (pH= 6,0)**

#### **REACTIVOS**

Placas de Agar Citrato Titán IV (Helena ref. 2400).

Buffer Citrato pH 6,0 (Helena ref. 5121).

Solución salina isotónica (ClNa 0,9 g/dl) (Anedra).

Solución colorante de O-toluidina (Erovne) [(1% en agua destilada, alcohol metílico (CH<sub>3</sub>COH) y ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) (45:45:10)] (Anedra).

Solución reveladora: Agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 Vol.

#### **PROCEDIMIENTO**

Se empleó el hemolizado del apartado anterior (2.3.8) usando buffer citraro pH 6,0, según método descrito por Milner PF <sup>(153)</sup>. Para las corridas electroforéticas se utilizaron placas de agar y los controles de hemoglobinas citados en 2.3.8.

### **2.3.10 Cuantificación de Hemoglobinas (S, C, A<sub>2</sub>)**

#### **REACTIVOS**

Buffer Tris-EDTA-Borato pH 9,0 (Anedra).

Tiras de Acetato de Celulosa (Byosystems S.A.).

#### PROCEDIMIENTO

La cuantificación de hemoglobinas se realizó eluyendo las distintas fracciones hemoglobínicas que se detectaron en la electroforesis sobre acetato de celulosa a pH 9,0 sin colorear. Se eluyó cada banda en buffer de corrida y se leyeron las densidades ópticas de los eluidos en espectrofotómetro a 415 nm según recomendaciones del ICSH (Comité Internacional de estandarización en Hematología) <sup>(154)</sup>.

#### **2.3.11 Cuantificación de Hemoglobina Fetal**

##### REACTIVOS

Hidróxido de Sodio (OHNa) 1/12 N (Anedra).

Solución neutralizante: sulfato de amonio (Anedra) y ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50% y HCl fumante, 2,5 ml/l].

##### PROCEDIMIENTO

Con el mismo hemolizado utilizado en el apartado anterior (2.3.8) se efectuó la determinación de Hb Fetal por el método de desnaturalización alcalina de Singer <sup>(155)</sup>, realizando la lectura final de densidad óptica en espectrofotómetro a 540 nm.

#### **2.3.12 Cuerpos de Inclusión**

##### REACTIVOS

Solución colorante: Azul Brillante de Cresil (Merck, Darmstadt) (2% en solución fisiológica).

##### PROCEDIMIENTO

El estudio de cuerpos de inclusión se efectuó en muestras de sangre entera según el método propuesto por Papayannopoulou T. y Stomatoyannopoulos G <sup>(156)</sup>.

### **2.3.13 Prueba de Termoestabilidad**

#### PROCEDIMIENTO

Con el hemolizado utilizado en el apartado anterior (2.3.8) se efectuó la detección de hemoglobinas inestables según el método de Carrell <sup>(157)</sup>

### **2.3.14 Test de anaerobiosis**

#### REACTIVOS

Metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) 2% (Anedra).

#### PROCEDIMIENTO

Según método de Daland G.A. <sup>(158)</sup>.

## **2.4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **2.4.1 Extracción de ADN**

#### REACTIVOS

Hidroximetil aminometano (Tris)  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})$  (Merck, Darmstadt).

Acido Etilen Diamino Tetracético di sódico ( $\text{Na}_2$ -EDTA) (Merck, Darmstadt).

Acido Clorhídrico (HCl) (Merck, Darmstadt).

Nonidet P<sub>40</sub> (Sigma Chemical Co, USA).

Cloruro de Potasio (ClK) (Merck, Darmstadt).

Triton 100-X (Merck, Darmstadt).

Proteinasa K (Boehringer Mannheim GmbH, Germany).

Cloruro de Sodio (ClNa) (Merck, Darmstadt, Germany).

Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck, Darmstadt, Germany).

#### PROCEDIMIENTO

Se realizó mediante la técnica de Salting Out <sup>(159)</sup>, según el siguiente protocolo:

1. Colocar 500 µl de sangre en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
2. Agregar 1 ml de buffer Tris-EDTA (TE) [Tris-HCl 0,01 M pH 8,0; EDTANa<sub>2</sub> 0,001M; Nonidet P<sub>40</sub> 0,1%].
3. Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Repetir los pasos 2-3-4 hasta obtener un precipitado sin eritrocitos.
6. Resuspender el precipitado en 250 µl de buffer K (ClK 0,05M; Cl<sub>2</sub>Mg 0,0025M; Tris HCl 0,01M; Tritón 0,5%; Proteinasa K 0,05 mg/ml).
7. Incubar 1 hora a 55° C o toda la noche a 37° C.
8. Retirar del baño y agregar 250 µl de ClNa 2,5M, mezclar.
9. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos.
10. Transferir la capa superior acuosa a otro tubo, agregar 1 ml de etanol absoluto y mezclar por inversión hasta obtener la precipitación del ADN.
11. Recuperar el ADN con una pipeta pasteur de vidrio y pasar por etanol al 70%.
12. Secar al aire unos minutos y resuspender el ADN en agua destilada estéril.

## **2.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

### **2.4.2.1 Estudio de $\beta$ Talasemia**

La reacción en cadena de la polimerasa fue utilizada para identificar la presencia de seis mutaciones responsables del fenotipo  $\beta$  talasémico según la técnica publicada por JM Old y colaboradores en 1990 <sup>(160)</sup>: Reacción en Cadena de la Polimerasa- *Amplification Refractory Mutation System*.

#### **REACTIVOS**

Cebadores (CyberSyn, USA).

Cloruro de Magnesio ( $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) (Promega Corporation, USA)

Dexorribonucleótidos Trifosfatos (dNTP's) (Promega Corporation, USA).

Taq DNA polimerasa (Promega Corporation, USA).

Buffer de trabajo (10X PCR Buffer) (Promega Corporation, USA).

En la tabla 2.1 se detallan los cebadores utilizados para la PCR-ARMS

MUTACIÓN	SECUENCIA (5'→3')	CON	pb
IVS-I nt 1 M (G-A)*	TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAT	C	281
IVS-I nt 1 N*	TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAC	C	281
IVS-I nt 6 M (T-C) *	TTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG	C	286
IVS-I nt 6 N*	TTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG	C	286
IVS-I nt 110 M(G- A)*	ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACT	C	390
IVS-I nt 110 N*	ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC	C	390
CD 39 M (C→T)*	CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTA	C	436
CD 39 N*	CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTG	C	436
IVS-II nt 1 M (G→A)*	AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT	C	634
IVS-II nt 1 N	AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC	C	634
IVS-II nt 745 M (G→G) <sup>+</sup>	TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGG	B	738
IVS-II nt 745 N	TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC	B	738

M: mutado

N: normal

**Tabla 2.1** Secuencias de oligonucleótidos *primers* empleados para la PCR-ARMS.

Mutación (\*). Como control interno se emplean los oligonucleótidos Control A y Control B amplificando una región de 861 pb.

Mutación (+). Como control interno, se emplean los oligonucleótidos R37 y R47, amplificando una región de 527 pb.

Control A: 5'-CAATGTATCATGCCTCMGCACC-3' (+1.088 +1.111)  
Control B: 5'-GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA-3' (+1.959 +1.936)  
*Common C*: 5'-ACCTCACCTGTGAGCCAC-3' (-147 -166)  
R37: 5'-CCAATCTACTCCCAGGAGCA-3' (-76 -57)  
R47: 5'-CACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3' (+451 +432)

## PROCEDIMIENTO

Sobre una mezcla de reacción conteniendo 200 µM de cada dNTP's, 2,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 60 pmol de cada *primer* (directo y reverso) para el control interno de amplificación, 25 pmol del *common primer*, 25 pmol de cada *primer* para la secuencia normal y mutada, 5 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de ClK, 2 U de Taq ADN polimerasa y cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O para 50 µl, se agregó 1 µg de ADN extraído. Se cubrió cada tubo con una gota de aceite mineral y se sometieron las mezclas de reacción a 25 ciclos de amplificación usando un ADN Thermal Mini Cycler (MJ Research Watertown, Massachusetts).

Condiciones de reacción:

25 ciclos de:

- Desnaturalización a 93°C por 1 minuto.
- Hibridación a 65°C por 1 minuto.
- Extensión a 72°C por 1,5 minutos.
- Extensión final durante 3 minutos a 72°C.

La técnica consta de dos ensayos, los denominados normal y mutado. Ambos se realizan en tubos eppendorf diferentes, necesiándose para los dos, buffer de reacción, dNTP's, oligonucleótidos controles, así como el oligonucleótido directo (*Common Primer*) y la enzima (Taq polimerasa), lo único que varía es el oligonucleótido reverso que en el caso del

ensayo normal es el denominado normal mientras que para el ensayo mutado se debe utilizar el oligonucleótido cuya secuencia corresponde con la mutación se desea estudiar (Tabla 2.1).

Visualización de los amplificados:

Los productos de la amplificación se sometieron a electroforesis horizontal en un mini gel de agarosa (Sigma) al 3% en buffer conteniendo Tris Base 40 mmol/l, acetato sódico 20 mmol/l y EDTA 0,2 mmol/L pH=8,3) (Sigma), con bromuro de etidio ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ ) 0,5  $\mu$ g/ml (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) y durante aproximadamente 1 hora a 100 V.

Como marcador de peso molecular se usó el 100 *bp ladder* (Promega Corporation, USA).

Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador (Vilber Lourmat) y posteriormente fotografiados con una cámara digital (Kodak Digital Science DC 120 Zoom).

#### **2.4.2.2 Estudio del gen alfa**

##### **2.4.2.2.1 Delección $-\alpha^{3,7}$**

Para asegurarnos de contar con una población homogénea y con el objetivo de descartar la presencia conjunta de una delección en el gen  $\alpha$  ( $-\alpha^{3,7}$  delección) que no es detectable por métodos convencionales, se procedió a la búsqueda de dicha delección en todas las muestras de DNA de los portadores talasémicos.

La reacción en cadena de la polimerasa alelo específica fue utilizada para identificar la presencia de la delección *rightward* ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ), según la técnica descrita por Smetanina <sup>(161)</sup>.

#### REACTIVOS

Cebadores (Cybersyn, USA).

Albúmina Sérica bovina (ASB) (Sigma Chemical Co).

Hidroximetil Aminometano (Tris)  $NH_2(CH_2OH)$  (Merck, Darmstadt).

Acido Clorhídrico (ClH) (Merck, Darmstadt).

$\beta$ -mercapto etanol (Sigma Chemical Co).

Sulfato de Amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Merck, Darmstadt).

Cloruro de Magnesio (Cl<sub>2</sub>Mg) (Merck, Darmstadt).

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co).

Desoxirribonucleótidos Trifosfatos (dNTP's) (Promega Corporation, USA).

Taq DNA Polymerasa (Promega Corporation, USA).

#### CEBADORES UTILIZADOS

Común: 5'-CCCTCCCCCTGCCAAGTCCACCCC-3' (+5671 +5695 promotor  $\alpha$ 2)

Reverso normal: 5'-GGGAGGCCCATCGGGCAGGAGGAAC-3' (+7431 +7409)

Reverso mutado: 5'-GGGGGGAGGCCCAAGGGCAAGAA-3' (+ 11254 + 11231)

#### PROCEDIMIENTO

Mezcla de reacción:

H<sub>2</sub>O destilada csp 100  $\mu$ l, buffer 10X 10  $\mu$ l [buffer Tris-Hcl 67 mM pH 8,8; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16,6 mM; ASB 0,1%; 2-mercaptoetanol 10mN; Cl<sub>2</sub>Mg 4mM]; DMSO 8,6  $\mu$ l, dNTP's 6 mM; cebador común 50 pmoles; cebador reverso normal 50 pmoles.

Una segunda mezcla de reacción para el alelo mutado es realizada de la misma forma pero reemplazando al cebador reverso normal por el cebador reverso mutado.

Condiciones de reacción:

- Desnaturalizar a 99° C durante 5-7 min.
- Agregar 2,5 U de Taq DNA Polymerasa a cada tubo.
- Cubrir cada tubo con una gota de aceite mineral.

Someter las muestras a 25 ciclos de amplificación usando un ADN Thermal Mini Cycler (MJ Research Watertown, Massachusetts).

- Desnaturalización a 95 °C: 1 min.
- Hibridación a 68 °C: 1 min.
- Extensión a 72 °C: 2,5 min.
- Extensión final a 72 °C: 10 min.

Visualización de los amplificadores:

Los productos de la amplificación se sometieron a electroforesis horizontal en un mini gel de agarosa (Sigma) al 1% en buffer conteniendo Tris Base 40 mmol/l, acetato sódico 20 mmol/l y EDTA 0,2 mmol/L pH=8,3) (Sigma), con bromuro de etidio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) 0,5 µg/ml (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) y durante aproximadamente 1 hora a 100 V.

Como marcador de peso molecular se usó el 100 *bp ladder* (Promega Corporation, USA).

Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador (Vilber Lourmat) y posteriormente fotografiados con una cámara digital (Kodak Digital Science DC 120 Zoom).

#### 2.4.2.2.2 Triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha$ anti<sup>3,7</sup>)

Para detectar la presencia de la triplicación de genes alfa  $\alpha\alpha$  (anti<sup>3,7</sup>), se utilizó al igual que para la alfa talasemia, la PCR mediante amplificación alelo específica según la técnica descrita por Smetanina<sup>(161)</sup>.

#### CEBADORES UTILIZADOS

*Primer* directo: 5'-CCCTCCCCGAGCCAAGCCTCCTCCC-3' (+9354 +9378)

*Primer* reverso: 5'- GGGAGGCCCATCGGGCAGGAGGAAC -3' (+7431 +7409)

## **2.5 ANALISIS ESTADÍSTICO**

### **2.5.1 Estudio comparativo de los genotipos talasémicos $\beta^0$ y $\beta^+$ en hombres, mujeres $\leq 50$ años y $> 50$ años y niños.**

Se aplicó la técnica de Análisis de la Variancia a dos criterios de clasificación (Talasemia y grupo) para seis variables de interés, correspondiente a un diseño no balanceado dado que los tamaños de las muestras eran diferentes para las combinaciones de Talasemia y Grupo <sup>(162)</sup>.

Se presenta para cada variable estudiada el valor de la media aritmética y su correspondiente error estándar según tipo de Talasemia y Grupo.

Se verificó a través de pruebas gráficas y tests de hipótesis el cumplimiento de los supuestos necesarios para la aplicación del ANOVA: igualdad de variancias y normalidad de los residuos para todas las variables bajo estudio <sup>(163)</sup>.

### **3.5.2 Estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados**

Se utilizó la técnica Análisis de la Variancia a un criterio de clasificación para cinco variables de interés correspondiente a un diseño balanceado.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1 SUJETOS NORMALES

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el patrón de hierro y en el dosaje de hemoglobina A2 y hemoglobina F en el grupo control constituido por 150 individuos normales (59 varones, 70 mujeres en edad gestacional no embarazadas y 21 niños de 1 a 13 años), considerados normales al tener los valores hematimétricos dentro de los rangos normales, morfología de serie roja normal y no presentar ninguna alteración en el estudio de hemoglobinas por electroforesis.

#### 3.1.1 Patrón de Hierro

El estudio del hierro sérico ( $\mu\text{g/dl}$ ), la capacidad total de saturación de la siderofilina (TIBC) ( $\mu\text{g/dl}$ ), el porcentaje de saturación de la siderofilina (%) y el dosaje de ferritina sérica ( $\text{ng/ml}$ ) de los sujetos controles, se muestran en la Tabla 3.1

Sujetos Normales	Hierro Sérico $\mu\text{g/dl}$	TIBC $\mu\text{g/dl}$	Sat. Siderofilina (%)	Ferritina sérica $\text{ng/ml}$
Hombres N= 59	117,96 $\pm 25,81$	315,04 $\pm 31,89$	38,58 $\pm 7,98$	120 $\pm 80$
Mujeres N= 70	108,05 $\pm 16,70$	313,78 $\pm 43,25$	34,87 $\pm 7,05$	87,5 $\pm 62,5$
Niños N= 21	99,77 $\pm 17,02$	324,3 $\pm 44,44$	31,23 $\pm 6,28$	70 $\pm 50$

**Tabla 3.1** Dosaje de hierro sérico (Sideremia), capacidad total de saturación de la siderofilina (TIBC), porcentaje de saturación de la siderofilina y ferritina sérica. Medición de la tendencia central y de la dispersión obtenidas en sujetos normales. (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

### 3.1.2 Dosaje de Hemoglobina Fetal y de Hemoglobina A2

En la tabla 3.2 se muestran los resultados de Hb F y Hb A2.

Sujetos Normales	Hb F (%)	Hb A2 (%)
Hombres N= 59	1,46 ± 0,57	2,81 ± 0,39
Mujeres N= 70	1,51 ± 0,60	2,71 ± 0,36
Niños N= 21	2,09 ± 0,61	2,48 ± 0,34

**Tabla 3.2** Dosaje de Hb F y de Hb A2. Se observan los valores promedio y desviación standard expresados en % en sujetos normales. (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

### 3.2 SUJETOS TALASÉMICOS

Con el objetivo de conocer la heterogeneidad molecular de la  $\alpha$ -talasemia y de interrelacionar los parámetros hematológicos con el genotipo talasémico, durante el desarrollo de este trabajo de tesis se estudiaron 124 sujetos (79 mujeres no embarazadas, 30 varones y 15 niños mayores de un año).

En todos se investigó el metabolismo férrico (a los fines de excluir la deficiencia de hierro) y la delección  $\alpha$ -talasemia ( $-\alpha^{3,7}$ ) con el objeto de tener una población lo más homogénea posible.

También se investigó la presencia de la triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$  anti<sup>3,7</sup>) en aquellos individuos en los que el dosaje de Hb estuvo por debajo de 11 g/dl (varones y mujeres > 50 años) y por debajo de 10,5 g/dl (mujeres  $\leq$  50 años y niños), estudiándose entonces 48 individuos (7 varones, 2 mujeres > 50 años, 30 mujeres  $\leq$  50 años y 9 niños).

Un individuo presentó la delección  $-\alpha^{3,7}$ , dos presentaron triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha$  anti<sup>3,7</sup>), dos fueron portadores de una  $\delta\beta$  talasemia y uno mostró una doble heterocigosis  $\beta$ tal/HbS. Estos seis individuos fueron por lo tanto excluidos del grupo en el que se estudió la interrelación de los parámetros hematológicos con el genotipo  $\beta$ -talasémico y en ellos se analizaron las diferencias fenotípicas al compararlos con portadores  $\beta$ -talasémicos que presentaron la misma mutación. Se identificaron entonces, 118 sujetos no emparentados, portadores de  $\beta$  talasemia heterocigota, con metabolismo de hierro normal y sin asociación a ninguna otra de las patologías de la hemoglobina estudiadas.

Los dos individuos portadores de  $\delta\beta$  talasemia fueron excluidos del grupo en el que se analizó la heterogeneidad molecular de la  $\beta$  talasemia ya que estas talasemias presentan, en su gran mayoría, deleciones y no mutaciones puntuales que fue lo investigado en este trabajo, quedando por lo tanto constituido este grupo por 122 individuos.

Los 124 individuos presentaron tests de cuerpos de inclusión, de inestabilidad térmica y de anaerobiosis negativos, a excepción del paciente con doble heterocigosis  $\beta$ tal/HbS que presentó el test de anaerobiosis positivo.

### **3.2.1 ANÁLISIS POR BIOLOGÍA MOLECULAR Y MORFOLOGÍA ERITROCITARIA DE LAS DISTINTAS MUTACIONES**

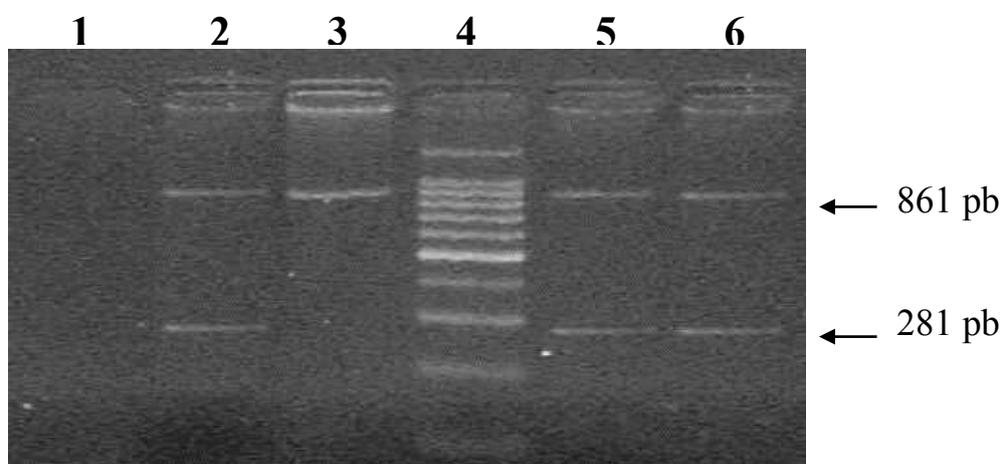
Se han estudiado un total de seis mutaciones diferentes (las más frecuentes en la zona del Mediterráneo) que afectan a uno de los procesos moleculares involucrados en la expresión del gen de  $\alpha$ -globina, procesamiento del ARNm y traducción.

### 3.2.1.1 Procesamiento del ARNm

#### 3.2.1.1.1 Zonas Consenso y *Splice junction*

Las tres mutaciones investigadas en estas regiones fueron: IVS-I-nt1 (G→A) ( $\beta^0$ ), IVS-I-nt6 (T→C) ( $\beta^+$ ), IVS-II-nt1 (G→A) ( $\beta^0$ ) (Figuras 3.1, 3.2 y 3.3).

IVS-I-nt1 (G→A) ( $\beta^0$ ):



**Figura 3.1** Estudio por PCR-ARMS de la mutación  $\beta^0$  IVS-I-nt 1 (281 pb).

Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente).

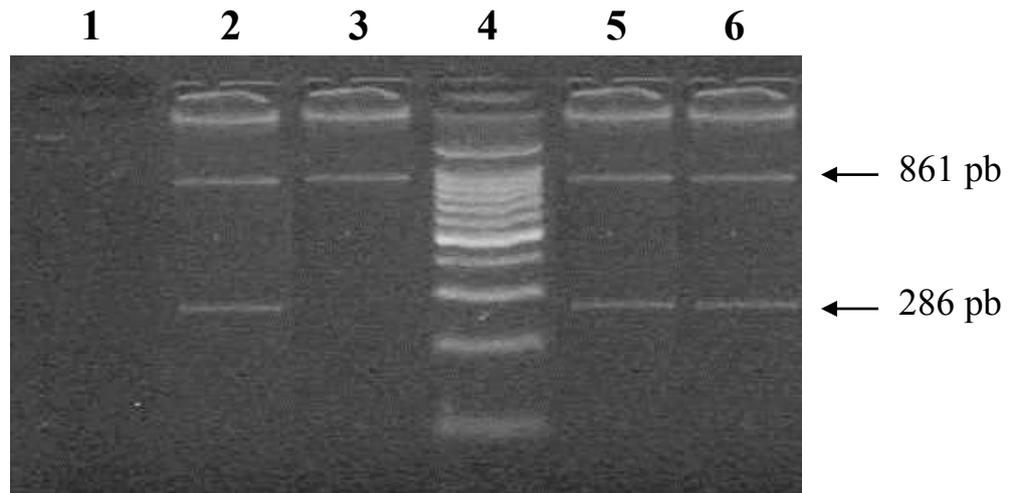
Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 6: individuo heterocigoto (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente: positivo para la mutación en estudio).

La banda superior de 861 pb corresponde al control interno de amplificación.

Esta mutación fue detectada en 6 alelos (4,9%).

IVS-I-nt6 (T→C) ( $\beta^+$ ):



□□

**Figura 3.2** Estudio por PCR-ARMS de la mutación  $\beta^+$  IVS-I-nt 6 (286 pb).

Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente).

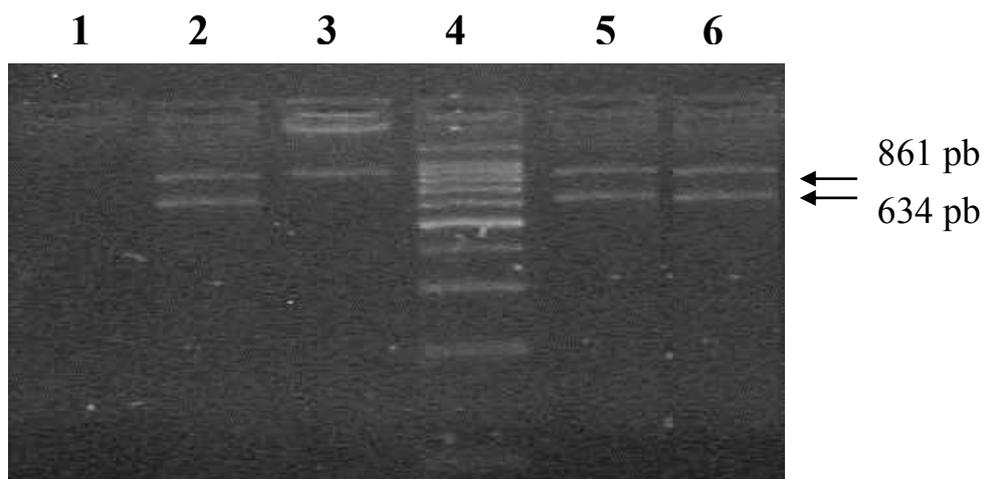
Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 8: individuo heterocigoto (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente: positivo para la mutación en estudio).

La banda superior de 861 pb corresponde al control interno de amplificación.

Esta mutación fue hallada en 3 alelos (2,5%).

IVS-II-nt1 (G→A) ( $\beta^0$ ):



**Figura 3.3** Estudio por PCR-ARMS de la mutación  $\beta^0$  IVS-II-nt 1 (634 bp).

Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente).

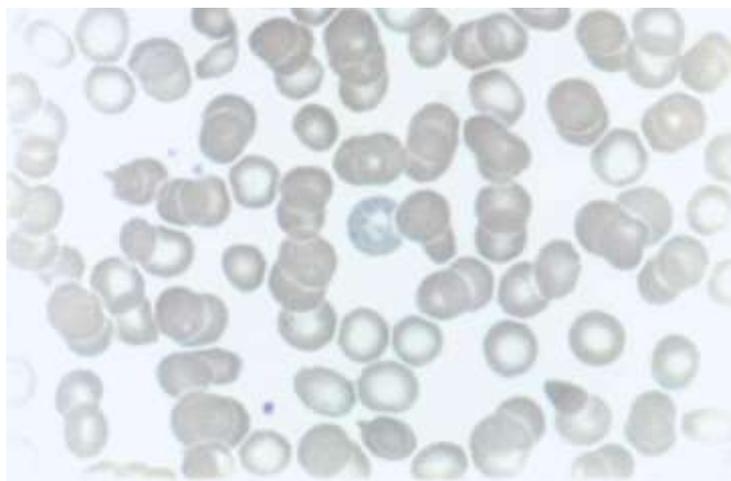
Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 6: individuo heterocigoto (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente: positivo para la mutación en estudio).

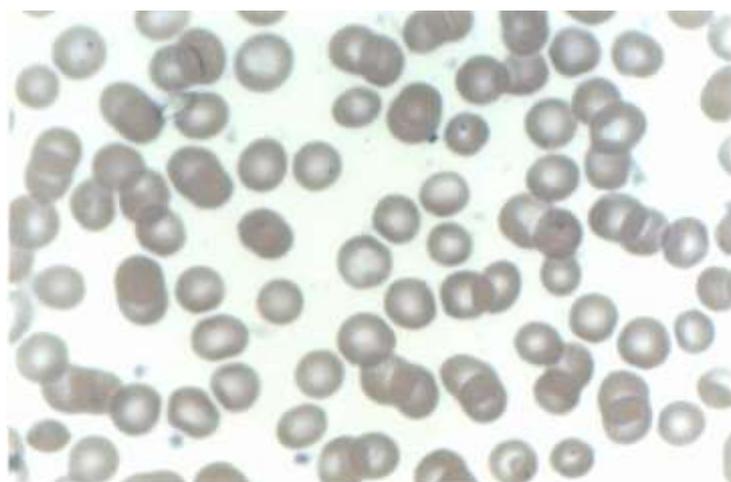
La banda superior de 861 pb corresponde al control interno de amplificación.

Esta mutación correspondió a 2 alelos (1,6%).

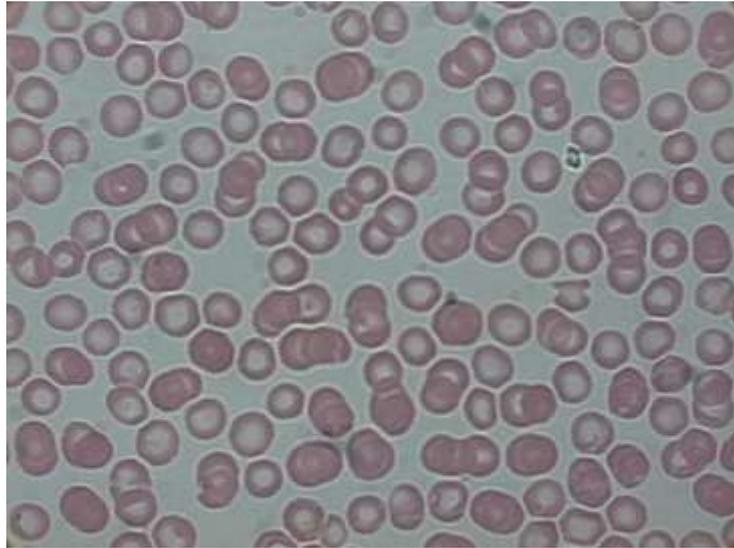
En las Figuras 3.4, 3.5 y 3.6 se observa la morfología de la sangre periférica de individuos portadores de las mutaciones IVS-I-nt 1, IVS-I-nt 6 e IVS-II-nt 1.



**Figura 3.4** Morfología eritrocitaria de la sangre periférica de un portador de la mutación  $\beta^0$  IVS-I-nt 1: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo.



**Figura 3.5** Morfología de la sangre periférica de un individuo portador de la mutación  $\beta^+$  IVS-I-nt 6: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, ligera hipocromía, ligera poiquilocitosis. Punteado basófilo

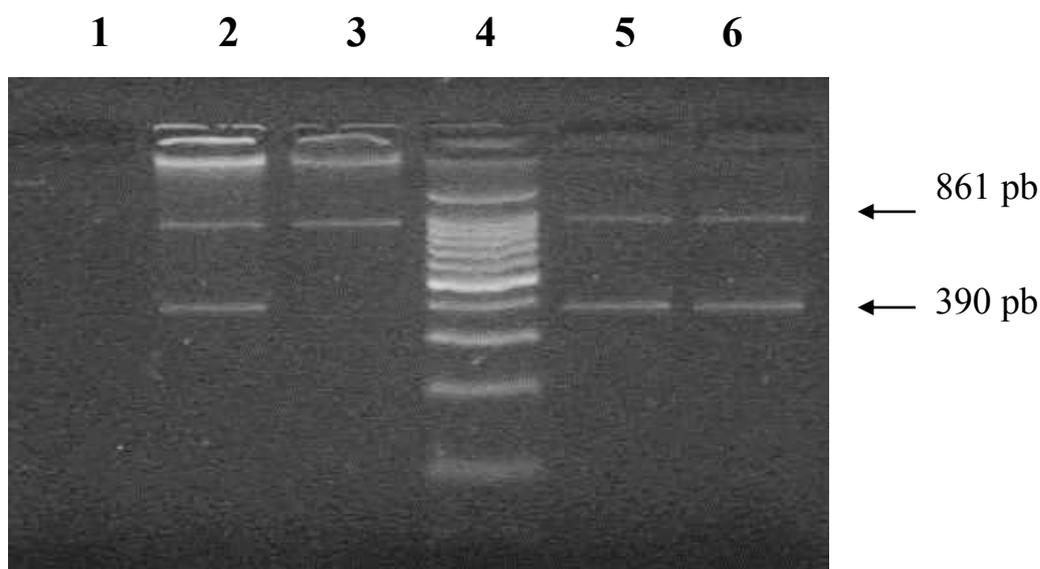


**Figura 3.6** Morfología de la sangre periférica de un individuo portador de la mutación  $\beta^0$  IVS-II-nt 1: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo

### 3.2.1.1.2 Intrones

Se estudiaron dos mutaciones: IVS-I-nt110 (G→A) ( $\beta^+$ ) e IVS-II-nt745 (C→G) ( $\beta^+$ ).  
(Figuras 3.7 y 3.8).

IVS-I-nt110 (G→A) ( $\beta^+$ ):



**Figura 3.7** Estudio por PCR-ARMS de la mutación  $\beta^0$  IVS-I-nt 110 (390 bp).

Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente).

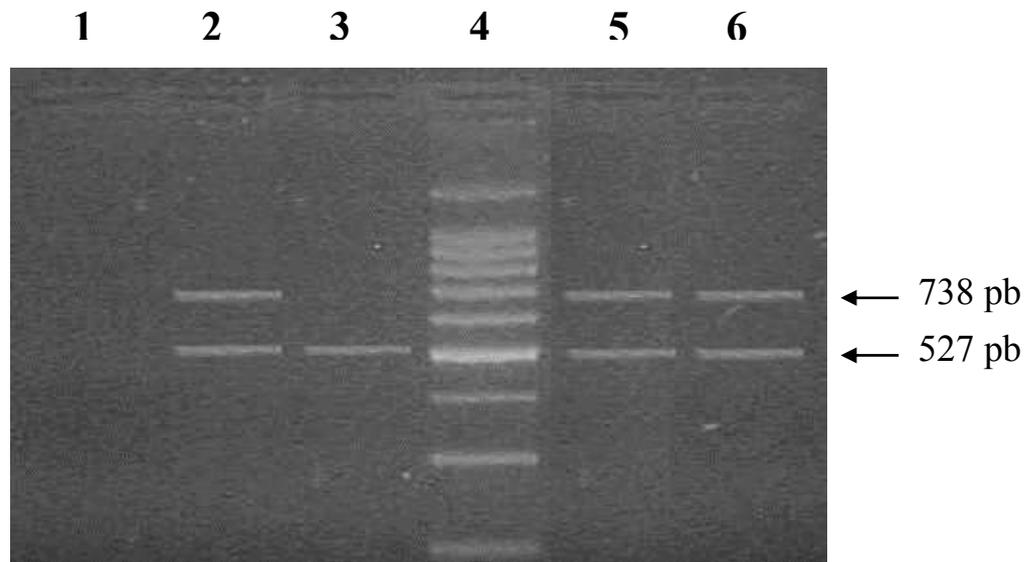
Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 6: individuo heterocigoto (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente: positivo para la mutación en estudio).

La banda superior de 861 pb corresponde al control interno de amplificación.

Esta mutación se detectó en 27 alelos (22,1%)

IVS-II-nt745 (C→G) ( $\beta^+$ ):



**Figura 3.8** Estudio por PCR-ARMS de la mutación  $\beta^+$  IVS-II-nt745 (738 bp).

Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal ( $\square\square\square\square\square\square$  con *primers* normal y mutado respectivamente).

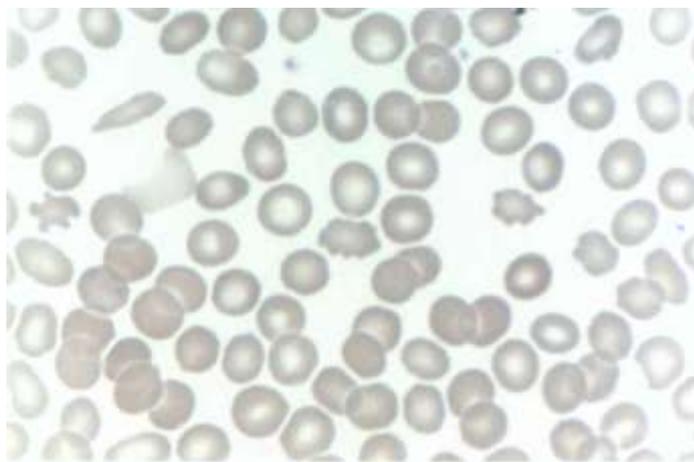
Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 6: individuo heterocigoto ( $\square\square\square\square\square\square$  con *primers* normal y mutado respectivamente: positivo para la mutación en estudio).

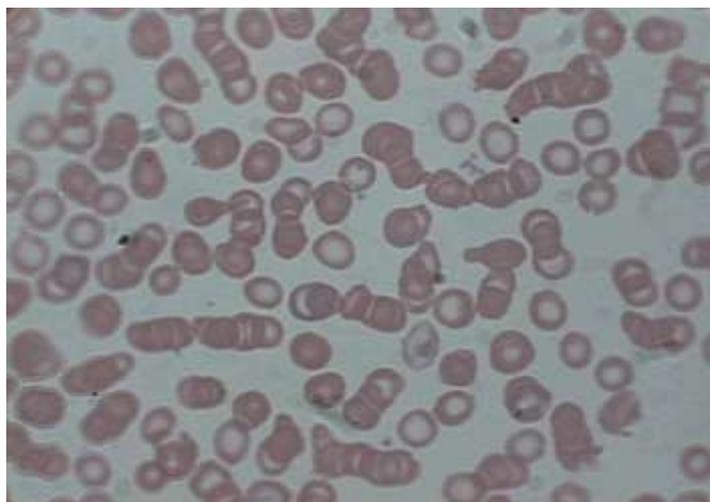
La banda inferior de 527 pb corresponde al control interno de amplificación.

En 5 alelos fue hallada esta mutación (4,1%).

En las Figuras 3.9 y 3.10 se observa la morfología de la sangre periférica de individuos portadores de las mutaciones  $\beta^+$  IVS-I-nt 110 y  $\beta^+$  IVS-II-nt745.



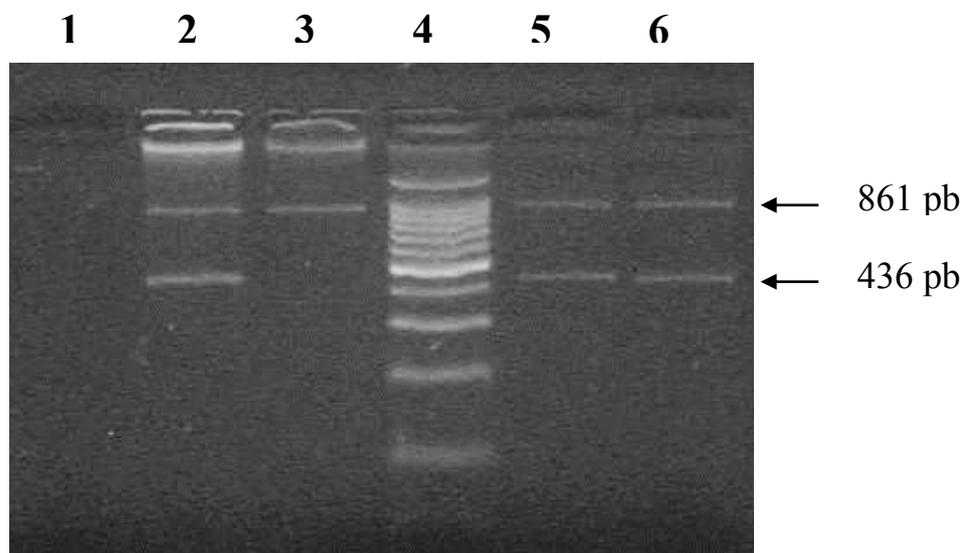
**Figura 3.9** Morfología de la sangre periférica de un individuo portador de la mutación  $\beta^+$  IVS-I-nt 110: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo



**Figura 3.10** Morfología de la sangre periférica de un individuo portador de la mutación  $\beta^+$  IVS-II-nt745: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo

### 3.2.1.2 Traducción. Mutación sin sentido

Se estudió la mutación CD39 (T→C) ( $\beta^0$ ) (Figura 3.11).



**Figura 3.11** Estudio por PCR-ARMS de la mutación  $\beta^0$  39 (TAG →CAG) (436 bp).

Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente).

Calles 4 y 5: individuo heterocigoto (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente: positivo para la mutación en estudio).

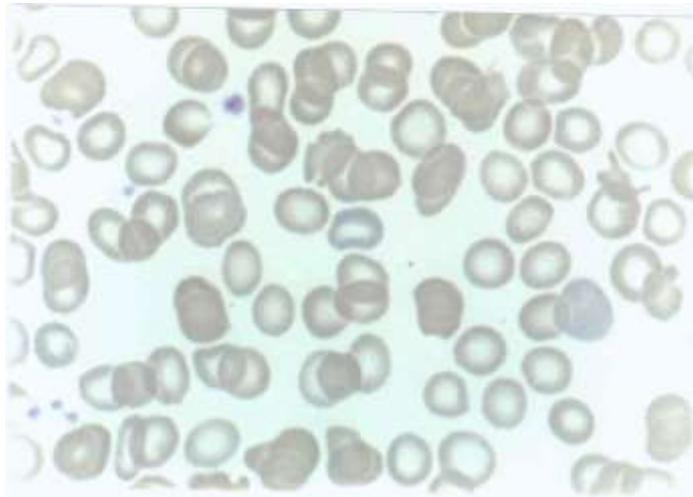
Calle 6: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 7 y 8: individuo heterocigoto (□□□□□□□□ con *primers* normal y mutado respectivamente: negativo para la mutación en estudio).

La banda superior de 861 pb corresponde al control interno de amplificación.

Esta mutación correspondió al 57,4% (70 alelos).

En la Figura 3.12 se aprecia la morfología de la sangre periférica de un individuo portador de la mutación  $\beta^0$  39.



**Figura 3.12** Morfología de la sangre periférica de un individuo portador de la mutación  $\beta^0$  39: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo.

### 3.3 HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA $\beta$ -TALASEMIA

La heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia se determinó estudiando las seis mutaciones mencionadas en 122 sujetos no relacionados entre sí.

El origen de éstos fue: 109 (89,3%) italianos, 12 (9,8 %) españoles y 1 (0,9 %) griego.

Las mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm se identificaron en el 35,2% de los individuos, la que afecta a la traducción en el 57,4%, mientras que para el 7,4% restante no fue posible su identificación (Tabla 3.3).

### **3.3.1 PROCESAMIENTO DEL ARNm. Proceso de *Splicing***

A este grupo pertenecieron el 9 % de los cromosomas identificados.

#### **3.3.1.1 Zonas consenso y *Splice junction***

La mutación  $\beta^+$  IVS-I-nt 6 (C→T) afectó a 3 alelos (2,5%).

La mutación  $\beta^0$  IVS-I-nt 1 (G→A) fue hallada en seis alelos y responsable del 4,9% de los casos en general.

La mutación  $\beta^0$  IVS-II-nt 1 (G→A) fue detectada en dos pacientes (1,6%).

#### **3.3.1.2 Intrones**

La mutación  $\beta^+$  IVS-I-nt 110 (G→A) fue hallada en 27 individuos y representó el 22,1%.

La mutación  $\beta^+$  IVS-II-nt 745 (C→G) fue identificada en 4 pacientes (4,1%).

### **3.3.2 TRADUCCION. Mutación sin sentido**

La mutación  $\beta^0$  39 fue hallada en 70 individuos (57,4%).

### **3.3.3 MUTACIONES DESCONOCIDAS**

Estudiando las seis mutaciones mencionadas, en 9 sujetos (7,4%), no fue posible poner de manifiesto la alteración molecular responsable de la  $\alpha$ -talasemia.

En la siguiente tabla se observan la frecuencia y tipos de mutaciones responsables de  $\beta$ -talasemia identificadas en este trabajo.

MUTACIONES	Nº DE ALELOS	%	FENOTIPO
<b>1-PROCESAMIENTO DEL ARNm</b>			
Proceso de Splicing			
a.-Zonas consenso y splice junction			
IVS-1-nt 1 (G→A)	6	4,9	β <sup>0</sup>
IVS-1-nt 6 (T→C)	3	2,5	β <sup>+</sup>
IVS-2-nt 1 (G→A)	2	1,6	β <sup>0</sup>
b- Intrones			
IVS-1-nt 110 (G→A)	27	22,1	β <sup>+</sup>
IVS-2-nt 745 (C→G)	5	4,1	β <sup>+</sup>
<b>2-TRADUCCIÓN</b>			
Terminación Prematura			
Mutación sin sentido			
CD39 (C→T)	70	57,4	β <sup>0</sup>
3-DESCONOCIDAS	9	7,4	
TOTAL	122	100	

**Tabla 3.3** Frecuencia y tipos de mutaciones responsables de  $\alpha$ -talasemia identificadas en este trabajo. Hospital Provincial del Centenario, Rosario, 1996-2000.

### 3.4 SUJETOS $\beta$ -TALASÉMICOS HETEROCIGOTAS ( $\beta^A/\beta^+$ o $\beta^0$ ) CON VALORES DE Hb A<sub>2</sub> $\geq$ 4% Y DE Hb F < 5% (TALASEMIA MENOR)

A continuación se exponen los resultados del estudio del grupo de sujetos no relacionados entre sí y con  $\beta$ -talasemia heterocigota sin asociación a ninguna otra de las patologías de la hemoglobina estudiadas. Este grupo está formado por 109 sujetos [71 mujeres (60  $\leq$  50 años, 11 > 50 años) 25 varones y 13 niños de 1 a 13 años]. Se descartaron los 9 individuos en los que no se pudo detectar la mutación responsable de  $\beta$ -talasemia.

#### 3.4.1 Cuantificación de Hemoglobinas

La Tabla 3.4 recoge los valores obtenidos en el dosaje de Hb A<sub>2</sub> en el grupo de varones, mujeres  $\leq$  50 años, mujeres > 50 años y niños portadores de  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  o  $\beta^0$ )

	Hb A <sub>2</sub> (%)							
	Varones		Mujeres $\leq$ 50 años		Mujeres > 50 años		Niños	
	$\beta^+$ n 10	$\beta^0$ n 15	$\beta^+$ n 16	$\beta^0$ n 44	$\beta^+$ n 3	$\beta^0$ n 8	$\beta^+$ n 5	$\beta^0$ n 8
X	5,4	5,4	5,2	5,2	4,96	4,95	5,8	5,5
DE	0,67	0,51	0,49	0,67	0,05	0,51	0,55	0,48
Mínimo	4,5	4,4	4,6	4,1	4,9	4,2	4,9	4,7
Máximo	6,5	6,1	6,1	6,9	5	5,90	6,4	6

**Tabla 3.4** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en dosaje de Hb A<sub>2</sub> de varones, mujeres  $\leq$  50 años, mujeres > 50 años y niños con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  o  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

La Tabla 3.5 recoge los valores obtenidos en el dosaje de Hb F en el grupo de varones, mujeres  $\leq 50$  años, mujeres  $> 50$  años y niños portadores de  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ )

	Hb F (%)							
	Varones		Mujeres $\leq 50$ años		Mujeres $> 50$ años		Niños	
	$\beta^+$ n 10	$\beta^0$ n 15	$\beta^+$ n 16	$\beta^0$ n 44	$\beta^+$ n 3	$\beta^0$ n 8	$\beta^+$ n 5	$\beta^0$ n 8
X	1,75	2,4	2,03	2,5	2,4	2,08	2,9	2,5
DE	0,71	0,97	0,64	1,17	1,30	0,67	1,03	1,29
Mínimo	0,9	1,4	1,3	0,7	1,1	1	1,8	1,2
Máximo	3,2	4,8	3,6	4,9	3,7	3,20	4,6	4,9

**Tabla 3.5** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en dosaje de Hb F de varones, mujeres  $\leq 50$  años, mujeres  $> 50$  años y niños con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

### 3.4.2 Metabolismo Férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico en varones, mujeres  $\leq 50$  años, mujeres  $> 50$  años y niños portadores de  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ) aparecen en las Tablas 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9.

	Sideremia ( $\mu\text{g/dl}$ )		Transferrina ( $\mu\text{g/dl}$ )		Saturación %		Ferritina ( $\text{ng/ml}$ )	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	116,9	101,9	295,9	296,53	40,1	36,13	108,9	134,2
D E	13,94	16,85	18,69	35,30	4,49	5,17	45,10	52,96
V. Mínimo	97	80	270	261	35	30	55	60
V. Máximo	144	133	327	355	47,6	49	200	200

**Tabla 3.6** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio del patrón férrico de varones heterocigotas con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

	Sideremia ( $\mu\text{g/dl}$ )		Transferrina ( $\mu\text{g/dl}$ )		Saturación %		Ferritina ( $\text{ng/ml}$ )	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	102,37	107,17	332	301,5	34,54	36,6	75,18	77,96
D E	20,59	16,37	53,42	40,11	8,65	7,03	27,32	35,58
V. Mínimo	80	76	241	235	25	25	35	38
V. Máximo	126	144	396	414	44	54	135	200

**Tabla 3.7** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio del patrón férrico de mujeres  $\leq 50$  años heterocigotas con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

	Sideremia ( $\mu\text{g/dl}$ )		Transferrina ( $\mu\text{g/dl}$ )		Saturación %		Ferritina ( $\text{ng/ml}$ )	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	104,33	110,62	308,33	303	38	37,23	93,66	97,2
D E	11,37	22,46	66,06	32,08	11,13	9,59	54,92	25,77
V. Mínimo	90	85	244	249	25	26	33	50
V. Máximo	127	143	376	363	49	48	140	135

**Tabla 3.8** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio del patrón férrico de mujeres > 50 años heterocigotas con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\square\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

	Sideremia ( $\mu\text{g/dl}$ )		Transferrina ( $\mu\text{g/dl}$ )		Saturación %		Ferritina ( $\text{ng/ml}$ )	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	99	98,62	327	331,75	34,1	35,5	63,6	53,37
D E	21,59	20,36	39	46,65	8,6	7,3	23,55	23,40
V. Mínimo	75	76	274	294	25	25	40	22
V. Máximo	133	134	383	436	44,5	45	90	88

**Tabla 3.9** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio del patrón férrico de niños heterocigotas con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\square\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

### 3.4.3 Estudio Hematimétrico

En la Tabla 3.10 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar (D.E) de los valores hematimétricos de varones heterocigotas.

Nº de casos  $\beta^+$ : 10

Nº de casos  $\beta^0$ : 15

	GR ( $10^{12}/l$ )		Hb (g/dl)		Hto (%)		VCM (fL)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	6.42	6.06	12,2	11,19	40	37	62,2	60,5	19	18,5	30,7	30,6
D E	0,58	0,33	0,96	0,61	3,03	2,65	3,07	2,87	1,15	0,87	0,73	1,02
V. Mínimo	5.86	5.66	11,1	10,9	36	34	59	57	17,7	17	29,6	28,8
V. Máximo	7.56	6.91	13,8	12,8	45	43	67	65	20,7	19,4	31,6	33,1

**Tabla 3.10** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio hematimétrico de varones heterocigotas con  $\beta$ -talasemia menor ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

En la Tabla 3.11 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar (D.E) de los valores hematimétricos de mujeres  $\leq 50$  años heterocigotas.

Nº de casos  $\beta^+$ : 16

Nº de casos  $\beta^0$ : 44

	GR (10 <sup>12</sup> /l)		Hb (g/dl)		Hto (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	5.35	5.29	10,5	10,0	34,2	32,3	64,2	61,1	19,6	18,8	30,7	30,9
D E	0,48	0,36	0,47	0,47	1,47	1,60	3,73	4,51	1,34	1,20	0,60	0,94
V. Mínimo	4.72	4.71	10	10	32	30	56	57	17,4	17,5	30	28,3
V. Máximo	6.1	6.32	11,2	11,7	36	38	68	66,8	22,2	21,6	31,6	31,9

**Tabla 3.11** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio hematimétrico de mujeres  $\leq$  de 50 años heterocigotas con  $\beta$ -talasemia menor ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

En la Tabla 3.12, se muestran los resultados de la media y la desviación estándar (D.E) de los valores hematimétricos de mujeres  $>$  50 años heterocigotas.

Nº de casos  $\square\beta^+$ : 3

Nº de casos  $\beta^0$ : 8

	GR (10 <sup>12</sup> /l)		Hb (g/dl)		Hto (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	6,15	6,01	11,4	10,8	37	35,4	60,6	59	18,5	18,1	30,5	30,6
D E	0,08	0,32	0,36	0,57	1	1,85	1,15	0,5	0,30	0,45	0,75	0,68
V. Mínimo	6,06	5,66	11	10,7	36	33	59	58	18,2	17,5	30	29
V. Máximo	6,22	6,43	11,7	12,2	38	38	62	61	18,8	19	31,4	31,6

**Tabla 3.12** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio hematimétrico de mujeres  $>$  de 50 años heterocigotas con  $\beta$ -talasemia menor ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

En la Tabla 3.13 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar (D.E) de los valores hematimétricos de niños heterocigotas.

Nº de casos  $\beta^+$ : 5

Nº de casos  $\beta^0$ : 8

	GR ( $10^{12}/l$ )		Hb (g/dl)		Hto (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$	$\beta^+$	$\beta^0$
X	5.38	5.81	9,64	10,1	31,4	33,5	58,2	57,4	17,9	17,4	30,8	30,4
D E	0,17	0,23	0,10	0,32	2,33	1,54	2,12	3,93	0,50	0,99	1,97	1,15
V. Mínimo	5.20	5.60	9,5	9,6	29	32	56	57	17	16,2	28	29
V. Máximo	5.80	6.13	10,5	10,9	36	36	62	64	18,7	19	33	32

**Tabla 3.13** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio hematimétrico de niños heterocigotas con  $\beta$ -talasemia menor ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

#### 3.4.4 Recuento de Reticulocitos

En la Tabla 3.14 se reseñan los resultados obtenidos del estudio reticulocitario de varones, mujeres  $\leq 50$  años, mujeres  $> 50$  años y niños.

	Reticulocitos (%)							
	Varones		Mujeres ≤ 50 años		Mujeres > 50 años		Niños	
	$\beta^+$ n 10	$\beta^0$ n 15	$\beta^+$ n 16	$\beta^0$ n 44	$\beta^+$ n 3	$\beta^0$ n 8	$\beta^+$ n 5	$\beta^0$ n 8
X	1,95	2,28	2,03	2,45	1,66	2,57	1,16	1,53
DE	1,21	0,90	0,99	1,25	1,20	1,40	0,38	1,14
Mínimo	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	1	0,8	0,9
Máximo	4,2	3,8	4	5,2	2,9	5,2	1,5	3,4

**Tabla 3.14** Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el recuento de reticulocitos de varones, mujeres ≤ 50 años, mujeres > 50 años y niños con  $\beta$ -talasemia heterocigota ( $\beta^+$  ó  $\beta^0$ ). (Hospital Provincial del Centenario 1996-2000)

### 3.5 ASOCIACIÓN DE $\alpha$ -TALASEMIA HETEROCIGOTA CON DELECIÓN

$-\alpha^{3,7}$

La asociación  $\beta$ -talasemia heterocigota con delección  $-\alpha^{3,7}$  fue hallada en sólo un paciente entre los 124 individuos estudiados.

Se trató de una mujer de 28 años, de origen italiano.

#### 3.5.1 Estudio Hematimétrico

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en el estudio hematimétrico

GR ( $10^{12}/l$ )	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
4.9	11,2	37	75	22,8	30,3

**Tabla 3.15** Valores obtenidos en el estudio hematimétrico del sujeto con  $\beta$ -talasemia heterocigota y deleción  $-\alpha^{3,7}$ .

### 3.5.2 Recuento de reticulocitos

Este individuo presentó un valor de reticulocitos de 2%.

### 3.5.3 Cuantificación de Hemoglobinas

El resultado del dosaje de Hb A<sub>2</sub> fue de 5,2 % y el de Hb F de 1,4 %

### 3.5.4 Metabolismo Férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico en este paciente se encuentran en la siguiente tabla.

Sideremia ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	TIBC ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	Saturación (%)	Ferritina (ng/ml)
97	292	33	65

**Tabla 3.16** Valores obtenidos en el estudio del patrón férrico del paciente con  $\beta$ -talasemia heterocigota y deleción  $-\alpha^{3,7}$ .

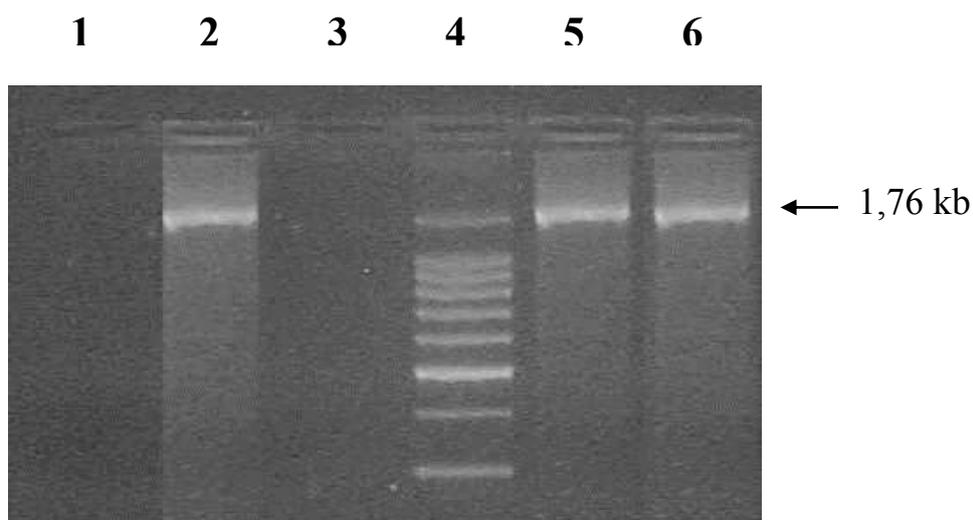
### 3.5.5 Análisis por Biología Molecular

#### 3.5.5.1 Estudio de $\alpha\alpha$ talasemia

La mutación responsable de la  $\beta$  talasemia fue detectada por PCR-ARMS. Se trató de la mutación sin sentido CD39 ( $\beta^0$ ) (Figura 3.11).

#### 3.5.5.2 Estudio de $\alpha$ talasemia

La deleción  $-\alpha^{3,7}$  fue estudiada por PCR mediante amplificación alelo específica (Figura 3.13).



**Figura 3.13** Detección de la deleción  $-\alpha^{3,7}$

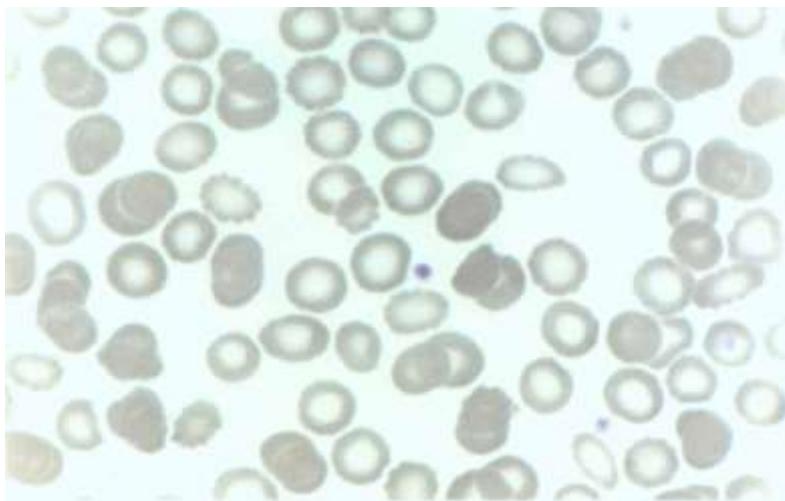
Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal con *primers* normal y mutado respectivamente.

Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 6: individuo portador de la deleción con *primers* normal y mutado respectivamente.

### 3.5.6 Morfología eritrocitaria



**Figura 3.14** Morfología de la sangre periférica de un individuo con asociación  $\beta^{039} / -\alpha^{3,7}$ : anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo

## 3.6 ASOCIACIÓN DE $\beta$ -TALASEMIA HETEROCIGOTA CON TRIPLICACION DE GENES $\alpha$ ( $\alpha\alpha\alpha$ $\square$ anti<sup>3,7</sup>) $\square$

La asociación  $\beta$ -talasemia heterocigota con triplicación de genes  $\alpha$  ( $\alpha\alpha\alpha$  anti $\square\square\square$ ) fue hallada en dos pacientes entre los 48 estudiados.

Se trató de un niño de 10 años (a), de una mujer de 36 años (b), ambos de origen italiano.

### 3.6.1 Estudio Hematimétrico

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en el estudio hematimétrico.

GR (10 <sup>12</sup> /l)	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
(a) 5,7	8,8	28,5	51	15,8	30,9
(b) 5,0	8,6	27	53	17,1	32,2

**Tabla 3.17** Valores obtenidos en el estudio hematimétrico de los sujetos con  $\beta$ -talasemia heterocigota y triplicación de genes  $\alpha$ .

### 3.6.2 Recuento de reticulocitos

El individuo (a) presentó un valor de reticulocitos de 2,2% y el (b) de 3,4%.

### 3.6.3 Cuantificación de Hemoglobinas

El resultado del dosaje de Hb A<sub>2</sub> fue de 6 % (a), 5,3 % (b) y el de Hb F de 2,6 % (a) y 4,9% (b).

### 3.6.4 Metabolismo Férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico en estos pacientes se encuentran en la siguiente tabla.

Sideremia ( $\mu$ g/dl)	TIBC ( $\mu$ g/dl)	Saturación (%)	Ferritina (ng/ml)
(a) 133	274	48,5	66
(b) 131	268	48,8	80

**Tabla 3.18** Valores obtenidos en el estudio del patrón férrico de los pacientes con  $\beta$ -talasemia heterocigota y triplicación de genes  $\alpha$ .

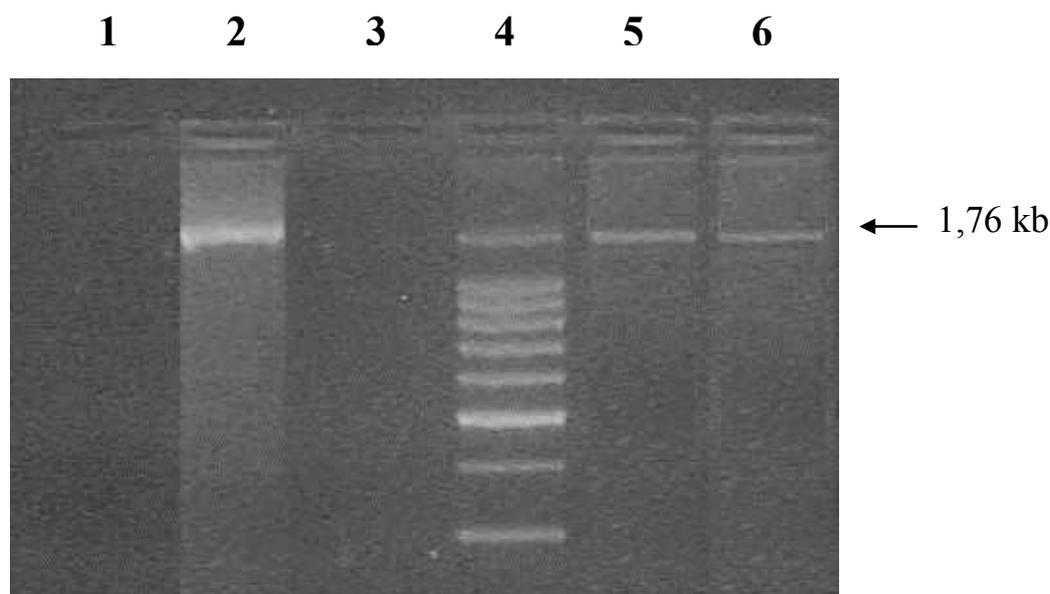
### 3.6.5 Análisis por Biología Molecular

#### 3.6.5.1 Estudio de $\alpha\alpha$ talasemia

La mutación responsable de la  $\beta\alpha$  talasemia en el caso (a) fue la  $\beta^+$  IVS II-745 (Figura 3.8) y la responsable de la  $\alpha\beta$  talasemia en el caso (b) fue la mutación sin sentido CD39 ( $\beta^0$ ) (Figura 3.11).

#### 3.6.5.2 Estudio de triplicación de genes $\alpha$ ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}\alpha^{3,7}}$ )

La triplicación de genes alfa ( $\alpha^{\text{anti}\alpha^{3,7}}$ ) fue estudiada por PCR mediante amplificación alelo específica (Figura 3.15).



**Figura 3.15** Detección de la triplicación de genes alfa.

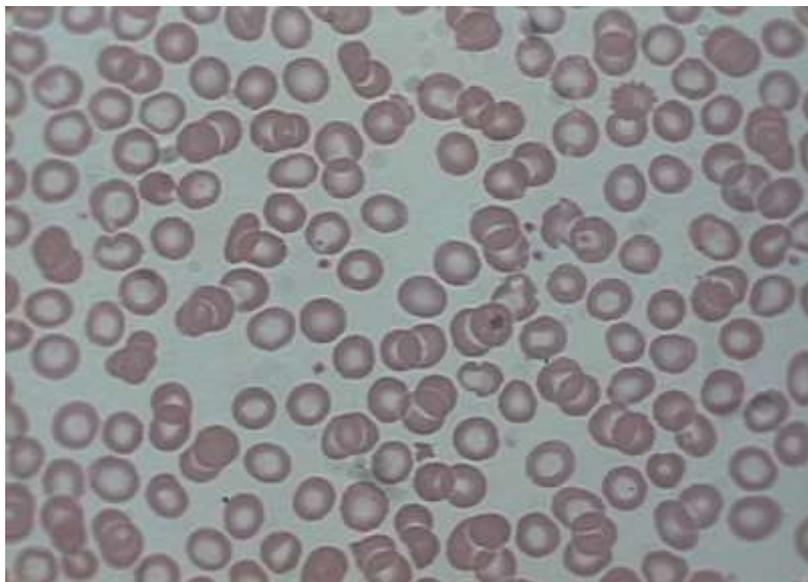
Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo normal con *primers* normal y mutado respectivamente.

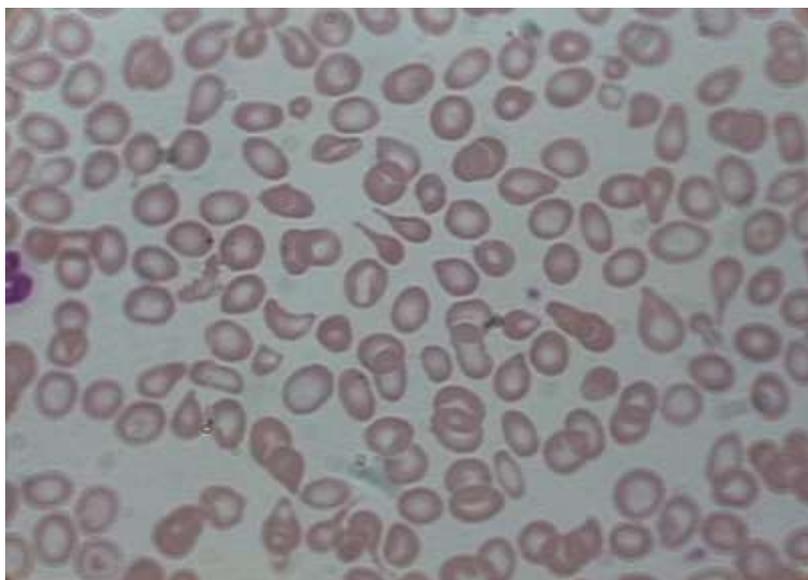
Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 5 y 6: individuo portador con *primers* normal y mutado respectivamente.

### 3.6.6 Morfología eritrocitaria



**Figura 3.16** Morfología de la sangre periférica de un individuo con  $\beta^+$  II-745/ $\alpha\alpha$  <sup>anti 3,7</sup>: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo.



**Figura 3.17** Morfología de la sangre periférica de un individuo con  $\beta^0$  39/ $\alpha\alpha$  <sup>anti 3,7</sup>: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía. Marcada poiquilocitosis con hematíes baciliformes y dacriocitos.

### 3.7 SUJETOS PORTADORES DE $\delta\beta$ TALASEMIA

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se detectaron dos portadores de  $\delta\beta$  talasemia entre los 124 individuos estudiados.

Se trató de una niña de 22 meses (a) y una mujer de 27 años (b), ambas descendientes de italianos.

#### 3.7.1 Estudio Hematimétrico

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en el estudio hematimétrico de estas dos pacientes (a y b).

GR ( $10^{12}/l$ )	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
(a) 4,87	10,5	36	73,9	21,5	29,1
(b) 4,84	10,0	31,5	65	20,7	31,7

**Tabla 3.19** Valores obtenidos en el estudio hematimétrico de los sujetos con  $\delta\beta$ -talasemia heterocigota.

#### 3.7.2 Recuento de reticulocitos

Estos individuos presentaron un valor de reticulocitos de 2% (a) y de 3,2% (b).

#### 4.7.3 Cuantificación de Hemoglobinas

El resultado del dosaje de Hb A<sub>2</sub> fue de 2,2 % (a), 2,4 % (b) y el de Hb F de 7,2 % (a) y 13% (b).

### 3.7.4 Metabolismo Férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico en estos pacientes se encuentran en la siguiente tabla.

Sideremia ( $\mu\text{g/dl}$ )	TIBC ( $\mu\text{g/dl}$ )	Saturación (%)	Ferritina (ng/ml)
(a) 114	353	32	45
(b) 119	307	39	80

**Tabla 3.20** Valores obtenidos en el estudio del patrón férrico de los pacientes con  $\delta\beta$ -talasemia heterocigota.

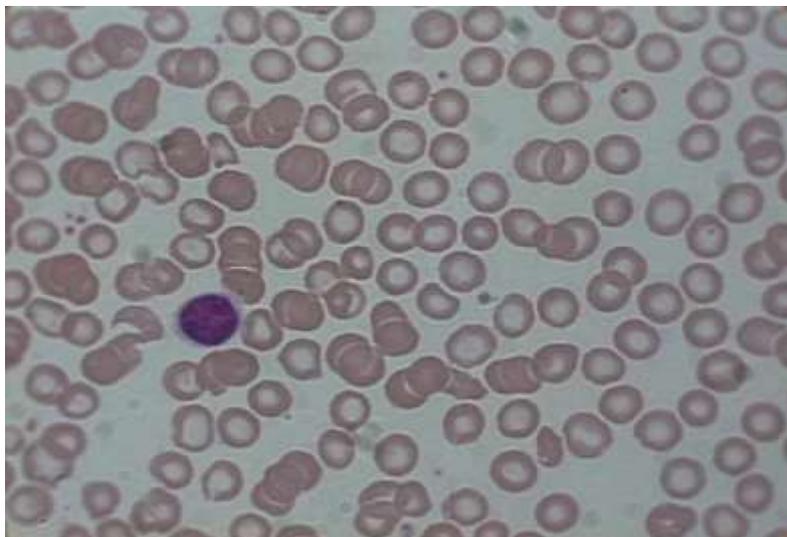
### 3.7.5 Análisis por Biología Molecular

#### 3.7.5.1 Estudio de $\alpha\alpha$ talasemia

La mutación responsable de la  $\beta$   $\alpha$ talasemia en el caso de la paciente (a) fue detectada por PCR-ARMS. Se trató de la mutación sin sentido CD39 ( $\beta^0$ ) (Figura 3.11).

En la paciente (b) no se detectó ninguna de las seis mutaciones investigadas por PCR-ARMS.

### 3.7.6 Morfología eritrocitaria



**Figura 3.18** Morfología de la sangre periférica de un individuo portador de  $\delta\beta$  talasemia: anisocitosis con regular cantidad de microcitosis, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis. Punteado basófilo

### 3.8 SUJETO CON DOBLE HETEROCIGOSIS $\beta^0$ TAL/Hb S

La asociación  $\beta$ -talasemia heterocigota con hemoglobina S fue hallada en sólo un paciente entre los 124 individuos estudiados para detectar la mutación responsable de  $\beta$ -talasemia.

Se trató de un hombre de 36 años, de origen italiano.

#### 3.8.1 Estudio Hematimétrico

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en el estudio hematimétrico

GR (10 <sup>12</sup> /l)	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
3,34	7,8	24	80	26	32

**Tabla 3.21** Valores obtenidos en el estudio hematimétrico del sujeto con  $\beta$ -talasemia heterocigota y Hb S.

### 3.8.2 Recuento de reticulocitos

Este individuo presentó un valor de reticulocitos de 17,8 %

### 3.8.3 Cuantificación de Hemoglobinas

El resultado del dosaje de Hb A<sub>2</sub> fue de 6 % y el de Hb F de 14 %. El valor de Hb S fue de 80%.

### 3.8.4 Metabolismo Férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico en este paciente se encuentran en la siguiente tabla.

Sideremia ( $\mu$ g/dl)	TIBC ( $\mu$ g/dl)	Saturación (%)	Ferritina (ng/ml)
119	188	63	3100

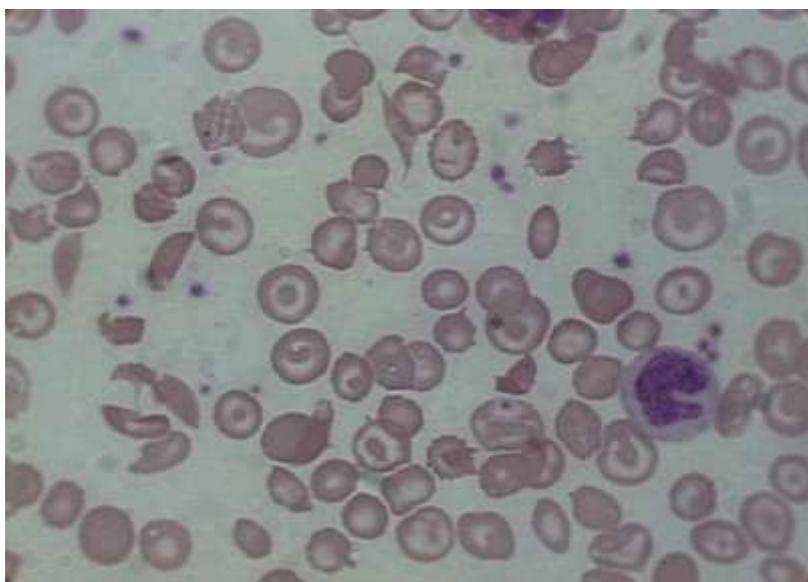
**Tabla 3.22** Valores obtenidos en el estudio del patrón férrico del paciente con  $\beta$ -talasemia heterocigota y Hb S.

### 3.8.5 Análisis por Biología Molecular

#### 3.8.5.1 Estudio de $\beta^0$ talasemia

La mutación responsable de la  $\beta^0$  talasemia fue detectada por PCR-ARMS. Se trató de la mutación sin sentido CD39 ( $\beta^0$ ) (Figura 3.11)

### 3.8.6 Morfología eritrocitaria



**Figura 3.19** Morfología eritrocitaria en la sangre periférica de un individuo con doble heterocigosis  $\beta^0$  39/Hb S: marcada anisocitosis con macro y microcitosis, poiquilocitosis con algunas formas drepanocíticas, marcada hipocromía, abundantes target cells, cuerpos de Howell Jolly y policromatofilia.

### 3.9 DOBLE HETEROCIGOSIS $\beta^+\alpha\alpha/\beta^0$ TALASEMIA

La asociación de las mutaciones IVS-1-nt110 (G →A)/CD39 (C→T) ( $\beta^+\beta^0$ ) ha sido encontrada durante el desarrollo de este trabajo de tesis en sólo un individuo. Se trató de un varón de origen italiano de 15 meses de edad que se presentó en nuestro Servicio con diagnóstico de anemia hemolítica a los seis meses de vida y que requirió tres transfusiones de glóbulos rojos, la última dos meses antes de la consulta.

#### 3.9.1 Estudio Hematimétrico

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en el estudio hematimétrico del propósito (p) y de sus progenitores (M: madre y P: padre)

GR ( $10^{12}/l$ )	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
(p) 3.29	6,7	21	63	20,4	32,4
(M) 5.78	10,2	34	58	17,6	30,4
(P) 5.90	12,1	38	65	20,5	31,5

**Tabla 3.23** Valores obtenidos en el estudio hematimétrico del sujeto con un estado doble heterocigoto ( $\beta^+\beta^0$ ) para  $\beta$   $\alpha$ talasemia y en el de sus padres.

#### 3.9.2 Recuento de reticulocitos

Este niño presentó un valor de reticulocitos del 12%

#### 3.9.3 Cuantificación de Hemoglobinas

El resultado del dosaje de Hb A<sub>2</sub> fue de 2,9 % y el de Hb F de 46 %

### 3.9.4 Metabolismo Férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico de este paciente se encuentran en la siguiente tabla.

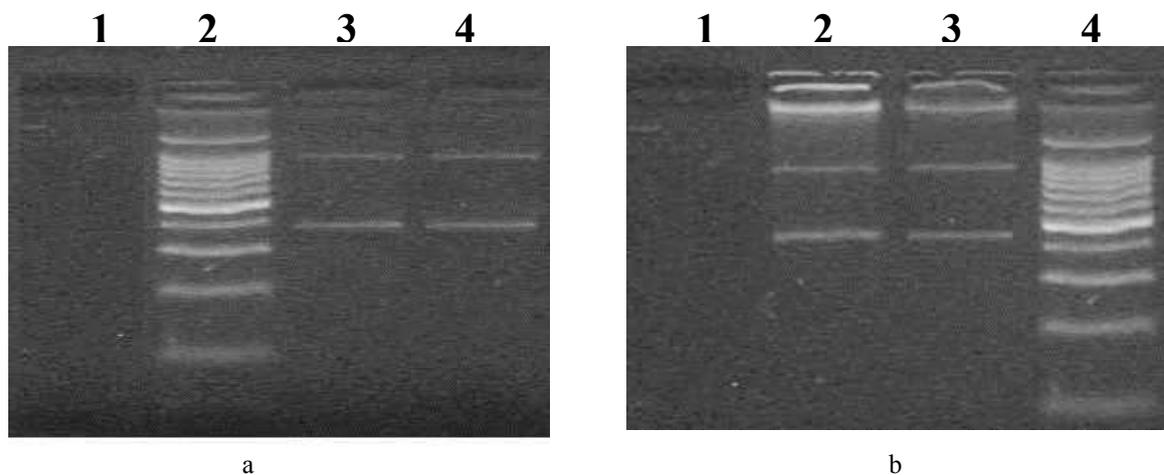
Sideremia ( $\mu\text{g/dl}$ )	TIBC ( $\mu\text{g/dl}$ )	Saturación (%)	Ferritina (ng/ml)
111	161	69	160

**Tabla 3.24** Valores obtenidos en el estudio del patrón férrico del paciente con un estado doble heterocigoto ( $\beta^+\beta^0$ ) para  $\beta$ -talasemia.

### 3.9.5 Análisis por Biología Molecular

#### 3.9.5.1 Estudio de $\beta$ talasemia

Dado que se conocían las mutaciones responsables de la beta talasemia en los padres de este niño, se estudiaron las mutaciones  $\beta^+$  IVS-1-nt110 (padre) y  $\beta^0$ 39 (madre) y fueron detectadas por PCR-ARMS (Figura 3.20 a y b).



**Figura 3.20** Estudio por PCR-ARMS del sujeto doble heterocigota IVS-1-nt110/CD39.

a- Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calle 2: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

Calles 3 y 4: individuo doble heterocigoto con *primers* normal y mutado para la secuencia IVS-1-nt110 respectivamente (390 pb)

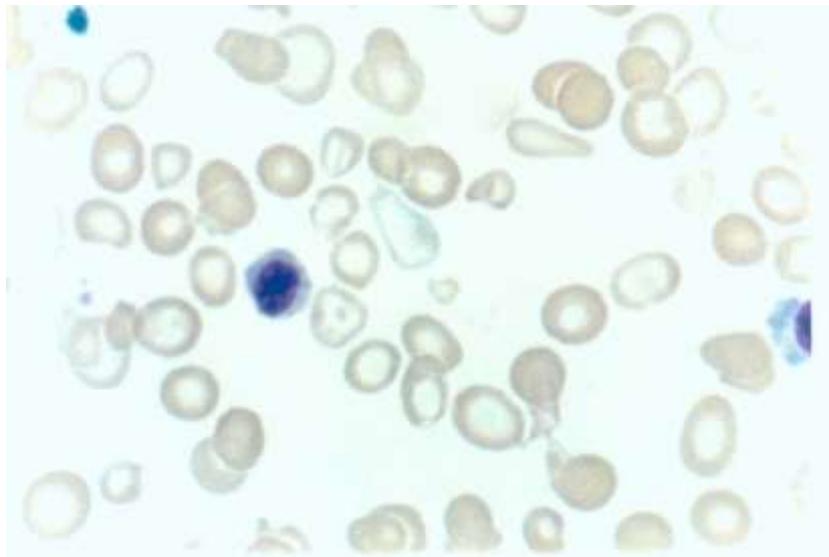
b- Calle 1: blanco de H<sub>2</sub>O (control de contaminación).

Calles 2 y 3: individuo doble heterocigoto con *primers* normal y mutado para la secuencia CD39 respectivamente (436 pb).

Calle 4: marcador de peso molecular (*100 bp ladder*). La banda más brillante corresponde a 500 pb.

La banda superior de 861 pb corresponde al control interno de amplificación.

### 3.9.6 Morfología eritrocitaria



**Figura 4.21** Morfología de la sangre periférica de un individuo doble heterocigota ( $\beta^+$ -110□□  $\beta^0$ 39): marcada anisocitosis con regular cantidad de microcitos y algunos macrocitos. Marcada hipocromía. Marcada poiquilocitosis. Policromatofilia. Eritroblastos policromatófilos.

### 3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.10.1 Estudio comparativo de los genotipos talasémicos $\beta^0$ y $\beta^+$ en hombres, mujeres menores y mayores de 50 años y niños.

Se aplicó la técnica de Análisis de la Variancia a dos criterios de clasificación (Talasemia y Grupo) para seis variables de interés, correspondientes a un diseño no balanceado dado que los tamaños de muestras eran diferentes para las combinaciones de Talasemia y Grupo.

##### Tamaños de las muestras

Talasemia	Grupo				Totales
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños	
$\beta^0$	15	44	8	8	75
$\beta^+$	10	16	3	5	34
Totales	25	60	11	13	109

**Tabla 3.25** Tamaño de las muestras utilizadas en este estudio

Se presenta para cada variable estudiada el valor de la media aritmética y su correspondiente error estándar según tipo de Talasemia y Grupo.

Se verificó a través de pruebas gráficas y tests de hipótesis el cumplimiento de los supuestos necesarios para la aplicación del ANOVA: igualdad de variancias y normalidad de los residuos para todas las variables bajo estudio.

A continuación se presentan las conclusiones extraídas de los correspondientes cuadros ANOVA para cada una de las variables en estudio, considerando un nivel de significación del 5% y las comparaciones múltiples por el método de Scheffé para el 5%

realizadas cuando corresponde. Cabe destacar que debido a que el diseño del ANOVA es desbalanceado, las medias utilizadas para dichas comparaciones no son medias aritméticas sino medias calculadas por mínimos cuadrados.

En los modelos planteados fue considerado el término "interacción" entre Talasemia y Grupo, resultando éste no significativo al 5% en todos los casos.

### 3.10.1.1 GLÓBULOS ROJOS (GR)

Medias y errores estándar

	Grupo			
Talasemia	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	6,06 ± 0,11	5,30 ± 0,06	6,01 ± 0,14	5,82 ± 0,14
$\beta^+$	6,42 ± 0,13	5,35 ± 0,10	6,15 ± 0,24	5,38 ± 0,18

**Tabla 3.26** Valores medios y errores estándar en el recuento de glóbulos rojos ( $\times 10^{12}/l$ ) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos de Talasemia.

Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ( $p= 0,00$ ).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que los promedios de GR para hombres y mujeres mayores de 50 años son iguales y significativamente mayores que los promedios de los GR de las mujeres menores de 50 años y niños, los cuales no difieren.

### 3.10.1.2 HEMOGLOBINA (Hb)

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	11,19 ± 0,20	10,01 ± 0,12	10,84 ± 0,28	10,14 ± 0,28
$\beta^+$	12,19 ± 0,25	10,46 ± 0,20	11,40 ± 0,45	9,64 ± 0,35

**Tabla 3.27** Valores medios y errores estándar en el dosaje de hemoglobina (g/dl) de los portadores talasémicos

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de Talasemia.

Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ( $p= 0,00$ ).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que los promedios de Hb para hombres y mujeres mayores de 50 años son iguales y significativamente mayores que los promedios de las Hb de las mujeres menores de 50 años y niños, los cuales no difieren.

### 3.10.1.3 HEMATOCRITO (Hto)

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	36,59 ± 0,74	32,36 ± 0,43	35,40 ± 1,01	33,53 ± 1,01
$\beta^+$	39,71 ± 0,91	34,18 ± 0,72	37,00 ± 1,66	31,44 ± 1,28

**Tabla 3.28** Valores medios y errores estándar en la medición del hemaocrito (%) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de Talasemia.

Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ( $p= 0,00$ ).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que los promedios de Hto para hombres y mujeres mayores de 50 años son iguales y significativamente mayores que los promedios de las Hto de las mujeres menores de 50 años y niños, los cuales no difieren.

### 3.10.1.4 VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VCM)

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	60,47 ± 1,29	61,12 ± 0,76	59,00 ± 1,77	57,38 ± 1,77
$\beta^+$	61,94 ± 1,59	64,19 ± 1,25	60,67 ± 2,90	58,20 ± 2,24

**Tabla 3.29** Valores medios y errores estándar en la medición del VCM (fL) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de Talasemia.

Existen diferencias significativas entre los grupos estudiados ( $p= 0,0207$ ).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que el promedio de VCM para niños es significativamente menor que para las mujeres menores de 50 años, siendo estos dos grupos los únicos que difieren entre sí.

### 3.10.1.5 HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM)

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	18,48 ± 0,33	18,89 ± 0,19	18,08 ± 0,45	17,46 ± 0,45
$\beta^+$	19,00 ± 0,40	19,66 ± 0,32	18,53 ± 0,73	17,92 ± 0,57

**Tabla 3.30** Valores medios y errores estándar en la medición del HCM (pg) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de Talasemia.

Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ( $p= 0,0011$ ).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que el promedio de HCM para niños es significativamente menor que para las mujeres menores de 50 años, siendo estos dos grupos los únicos que difieren entre sí.

**3.10.1.6 CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (CHCM)**

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	30,66 ± 0,30	30,95 ± 0,17	30,59 ± 0,41	30,36 ± 0,41
$\beta^+$	30,66 ± 0,36	30,68 ± 0,29	30,53 ± 0,66	30,82 ± 0,51

**Tabla 3.31** Valores medios y errores estándar en la medición de CHCM (g/dl) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de Talasemia ni tampoco entre los grupos estudiados.

### 3.10.1.7 HEMOGLOBINA A<sub>2</sub>

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	5,38 ± 0,15	5,21 ± 0,09	4,95 ± 0,21	5,54 ± 0,21
$\beta^+$	5,40 ± 0,19	5,24 ± 0,15	4,97 ± 0,34	5,84 ± 0,27

**Tabla 3.32** Valores medios y errores estándar en la medición de Hb A<sub>2</sub> (%) de los portadores talasémicos

No existen diferencias significativas entre los genotipos de Talasemia.

Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ( $p= 0,0277$ ).

De la aplicación de los tests de comparaciones múltiples se concluye que el promedio de Hb A<sub>2</sub> para los niños es significativamente mayor que para las mujeres mayores de 50 años, siendo estos dos grupos los únicos que difieren entre sí.

### 3.10.1.8 HEMOGLOBINA F

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	2,42 ± 0,25	2,51 ± 0,15	2,09 ± 0,36	2,51 ± 0,36
$\beta^+$	1,75 ± 0,32	2,04 ± 0,26	2,40 ± 0,59	2,90 ± 0,46

**Tabla 3.33** Valores medios y errores estándar en la medición de Hb F (%) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos de talasemia ni entre grupos en estudio.

### 3.10.1.9 RETICULOCITOS

Medias y errores estándar

Talasemia	Grupo			
	Hombres	Mujeres < 50 a	Mujeres > 50 a	Niños
$\beta^0$	2,28 ± 0,30	2,46 ± 0,17	2,57 ± 0,41	1,54 ± 0,41
$\beta^+$	1,95 ± 0,36	2,03 ± 0,29	1,67 ± 0,73	1,16 ± 0,51

**Tabla 3.34** Valores medios y errores estándar en el recuento de reticulocitos (%) de los portadores talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio y tampoco entre los genotipos de talasemia.

### 3.10.2 Estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados

Se utilizó la técnica Análisis de la Variancia a un criterio de clasificación para cinco variables de interés correspondiente a un diseño balanceado.

Mutación	Tamaño muestral
$\beta^+$ I-110	27
$\beta^+$ I-6	3
$\beta^+$ II-745	4
$\beta^0$ I-1	6
$\beta^0$ II-1	2
$\beta^0$ 39	67

**Tabla 3.35** Tamaño muestral de las distintas mutaciones de beta talasémicos

### 3.10.2.1 VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VCM)

Mutación	Media $\pm$ Error Est.
$\beta^+$ I-110	62,97 $\pm$ 1,12
$\beta^+$ I-6	64,00 $\pm$ 1,73
$\beta^+$ II-745	56,80 $\pm$ 1,97
$\beta^0$ I-1	60,17 $\pm$ 2,12
$\beta^0$ II-1	61,50 $\pm$ 2,12
$\beta^0$ 39	60,35 $\pm$ 0,60

**Tabla 3.36** Valores medios y errores estándar de VCM (fL) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos

### 3.10.2.2 HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HbCM)

Mutación	Media $\pm$ Error Est.
$\beta^+$ I-110	19,26 $\pm$ 0,32
$\beta^+$ I-6	19,90 $\pm$ 0,68
$\beta^+$ II-745	17,52 $\pm$ 0,58
$\beta^0$ I-1	18,55 $\pm$ 0,46
$\beta^0$ II-1	18,55 $\pm$ 0,25
$\beta^0$ 39	18,57 $\pm$ 0,15

**Tabla 3.37** Valores medios y errores estándar de HCM (pg) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos

### 3.10.2.3 CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

(CHCM)

Mutación	Media $\pm$ Error Est.
$\beta^+$ I-110	30,61 $\pm$ 0,23
$\beta^+$ I-6	31,07 $\pm$ 0,29
$\beta^+$ II-745	30,85 $\pm$ 0,24
$\beta^0$ I-1	30,93 $\pm$ 0,68
$\beta^0$ II-1	30,20 $\pm$ 1,10
$\beta^0$ 39	30,80 $\pm$ 0,14

**Tabla 3.38** Valores medios y errores estándar de CHCM (g/dl) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos

### 3.10.2.4 HEMOGLOBINA A<sub>2</sub>

Mutación	Media $\pm$ Error Est.
$\beta^+$ I-110	5,28 $\pm$ 0,11
$\beta^+$ I-6	5,37 $\pm$ 0,23
$\beta^+$ II-745	5,77 $\pm$ 0,29
$\beta^0$ I-1	5,33 $\pm$ 0,20
$\beta^0$ II-1	5,05 $\pm$ 0,85
$\beta^0$ 39	5,25 $\pm$ 0,07

**Tabla 3.39** Valores medios y errores estándar de Hb A<sub>2</sub> (%) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos

### 3.10.2.5 HEMOGLOBINA F

Mutación	Media $\pm$ Error Est.
$\beta^+$ I-110	1,97 $\pm$ 0,13
$\beta^+$ I-6	3,30 $\pm$ 0,85
$\beta^+$ II-745	2,17 $\pm$ 0,46
$\beta^0$ I-1	1,90 $\pm$ 0,26
$\beta^0$ II-1	2,15 $\pm$ 0,15
$\beta^0$ 39	2,50 $\pm$ 0,14

**Tabla 3.40** Valores medios y errores estándar de Hb F (%) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de cada una de las variables estudiadas para las seis mutaciones consideradas.

Existen diferencias levemente significativas ( $p < 0,10$ ) entre los valores promedios de HCM para las distintas mutaciones consideradas.

Al aplicar comparaciones múltiples de Newman-Keuls para el 10% se concluye que el promedio de HCM para el genotipo  $\beta^+$  I-6 es marginalmente superior que para el genotipo  $\beta^+$  II-745, no existiendo diferencias significativas entre los restantes cuatro genotipos estudiados.

## **4. DISCUSIÓN**

## **4.1 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

En esta sección se analizan los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis acerca de la heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia de manera que nos permita dar el adecuado asesoramiento genético y en caso de ser necesario, brindar la posibilidad de realizar el diagnóstico prenatal.

También se analizan los resultados con respecto a la genética molecular de  $\beta$  talasémicos heterocigotas y su interrelación con parámetros hematológicos.

Finalmente se analizan las causas de las diferencias fenotípicas observadas en portadores talasémicos que presentan la misma mutación.

### **4.1.1 ESTUDIO DE SUJETOS NORMALES (grupo control)**

El objetivo de realizar un grupo control fue establecer, para la población estudiada, los valores de referencia en sangre periférica a fin de tener parámetros con los cuales comparar los valores obtenidos en aquellos individuos que presentaron rasgo talasémico.

Dentro del grupo control se incluyeron 150 individuos normales (59 varones, 70 mujeres en edad gestacional no embarazadas y 21 niños de 1 a 13 años), considerados normales al tener los valores hematimétricos dentro de los rangos normales, morfología de serie roja normal y no presentar ninguna alteración en el estudio de hemoglobinas por electroforesis.

#### **4.1.1.1 Cuantificación de Hemoglobinas**

La HbA<sub>2</sub> para nuestro grupo control fue de  $2,81 \pm 0,39$  (varones),  $2,71 \pm 0,36$  (mujeres) y  $2,48 \pm 0,34$  (niños).

El valor de HbF hallado en el grupo control de varones fue de  $1,46 \pm 0,57$ , en el de mujeres  $1,51 \pm 0,60$  y en el de niños  $2,09 \pm 0,61$ , los cuales están en concordancia con los valores considerados normales por otros autores <sup>(58)</sup>.

#### **4.1.1.2 Patrón Férrico**

Los valores correspondientes al estudio del metabolismo férrico hallados en el grupo control de varones (Fe:  $117,96 \pm 25,8$ ; TIBC:  $315,04 \pm 31,89$ ; % sat:  $38,58 \pm 7,98$  y ferritina plasmática:  $120 \pm 80$ ); de mujeres (Fe:  $108,05 \pm 16,70$ ; TIBC:  $313,78 \pm 43,25$ ; % sat:  $34,87 \pm 7,05$  y ferritina plasmática:  $87,5 \pm 62,5$ ) y de niños (Fe:  $99,77 \pm 17,02$ ; TIBC:  $324,3 \pm 44,4$ ; % sat:  $31,23 \pm 6,28$  y ferritina plasmática:  $70 \pm 50$ ) fueron concordantes con los datos publicados en la literatura <sup>(164)</sup>.

#### **4.1.1.3 Análisis por Biología Molecular**

Los estudios realizados sobre alelos normales con la técnica PCR-ARMS empleando oligonucleótidos normal y mutado para cada una de las alteraciones conocidas del gen  $\beta$  globina, mostraron el mismo patrón normal.

En el ensayo normal con oligonucleótidos normales, debido a que ambos alelos no presentan alteración alguna, amplificaron el fragmento correspondiente a cada una de las posiciones objeto de estudio, junto con un control interno utilizado para evitar los falsos negativos. Por el contrario, en el ensayo mutado empleando oligonucleótidos que albergan la alteración, la amplificación no pudo llevarse a cabo, debido a que ambos alelos, normales, no

reconocen la secuencia del oligonucleótido mutado, obteniendo únicamente el fragmento correspondiente al control interno (Figuras 3.1, 3.2, 3.3, 3.7, 3.8 y 3.11 calles 2 y 3).

#### **4.2 HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA $\beta$ -TALASEMIA**

La experiencia en el Mediterráneo ha mostrado que los programas preventivos de talasemia basados en la detección de portadores heterocigotas y el consejo genético no son efectivos para reducir la incidencia de nacimientos de niños con  $\beta$ -talasemia mayor <sup>(165)</sup>. El diagnóstico prenatal de la  $\beta$ -talasemia ha dado una nueva dimensión a la prevención de la misma, pero para poder llevarlo a cabo, lo más importante es tener conocimiento de las mutaciones y su incidencia <sup>(51)</sup>.

Este estudio intenta ofrecer un cuadro general de la genética molecular de la talasemia en nuestra área.

El 92,6 % de los alelos se identificaron con las 6 mutaciones diferentes estudiadas, superponible a los datos encontrados en otros países de la cuenca Mediterránea como Italia, donde el 88% se distribuye entre CD39 (40,1%), IVS-I-ntl10 (23,0%), IVS-I nt 1 (10,2%), IVS-I-nt 6 (9,9%) y IVS-II-nt 745 (5,0%) <sup>(166)</sup>, superponible también a lo publicado por Brasil <sup>(167)</sup> en el estado de San Pablo donde la mayoría de los portadores de  $\beta$ -talasemia son descendientes de italianos y con cuatro mutaciones, [CD39 (45 %), IVS-I-ntl10 (14 %), IVS-I-nt6 (5 %) y IVS-I-nt 1 (4 %)] identificaron el 97,1 % de los cromosomas talasémicos.

En España, Villegas y col <sup>(168)</sup>, lograron identificar el 86,6 % de los alelos investigando cinco mutaciones [IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110, CD39 y CD8/9 (+G)].

En nuestro estudio, la mutación más frecuente se correspondió con el CD39, la cual fue identificada en el 57,4 % de los alelos. Esta también resultó ser la mutación más frecuente en Italia, España, Francia y Portugal. <sup>(169,170,171)</sup>.

La segunda mutación en importancia correspondió a la IVS I-110 que representó el 22,1 % del total identificado siendo ésta la segunda en importancia también en Italia y Francia (23,2 y 25,7 % respectivamente), no así en España y Portugal donde la IVS I-6 (15,5 %) y la IVS I-1 (32,9 %) ocuparon el segundo lugar respectivamente <sup>(169)</sup>. Cabe destacar que la frecuencia de la mutación IVS I-6 que representa el 10,3 % en Italia y el 15,5 % en España, en este estudio fue hallada sólo en el 2,5 % de los casos.

El resto de mutaciones encontradas, IVS I-1 (4,9 %), IVS II-1 (1,6%) e IVS II-745 (4,1 %), representó el 10,6 %.

Este estudio viene a confirmar que a pesar de la elevada heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia, un grupo de mutaciones, relativamente pequeño, es el responsable de la mayoría de los casos de  $\beta$ -talasemia en nuestra área, y su incidencia, en general, superponible con las descritas en otros países de la cuenca Mediterránea, teniendo fundamentalmente en cuenta los datos publicados por Italia <sup>(166,172,173)</sup> ya que el origen de nuestros pacientes fue 109 (89,3%) italianos, 12 (9,8 %) españoles y 1 (0.9 %) griego.

Si comparamos nuestros datos con los publicados por nuestro país, vemos que Varela y col <sup>(174)</sup> lograron identificar en una población de Bs. As. de origen Mediterráneo, el 90 % (similar a nuestro porcentaje) de los alelos talasémicos estudiando cuatro mutaciones (CD39, IVS-I-nt 110, IVS-I-nt 6 y IVS-I-nt 1).

Estos mismos autores cuando posteriormente estudiaron las mismas seis mutaciones que buscamos en nuestro trabajo lograron también identificar el 90 % de sus 109 portadores beta talasémicos <sup>(175)</sup>. Si bien las mutaciones más frecuentes resultaron ser CD39 (39,45 %) e IVS-I-ntl10 (23,85 %), el porcentaje de la primera fue distinto del nuestro probablemente debido a una mayor proporción de descendientes del norte de Italia presentes en nuestra

población. La misma consideración puede hacerse con respecto a los valores de las mutaciones más predominantes publicados por Soria y col <sup>(176)</sup> en una población de Córdoba.

Nuestra mayor concordancia es con el trabajo publicado por Roldán y col <sup>(177)</sup> que en una población de Bs. As, encontraron que los cuatro defectos más comunes (CD 39, 47%; IVS-I nt 110, 22,4%; IVS-I nt 1, 9,4% y IVS-I nt 6, 5,9%) se detectaron en el 84,7% de los alelos talasémicos.

Debido a que no fue posible poner de manifiesto la mutación en el 7,4 % de los casos y a la gran variedad de asociaciones  $\beta$ -talasemia y hemoglobinopatías pensamos en la complejidad del estudio molecular en nuestros pacientes con  $\beta$ -talasemia. Por ello los estudios de biología molecular son trascendentales para dar el adecuado consejo genético y establecer el diagnóstico prenatal.

Estos métodos son aplicables en vellosidad corial <sup>(178)</sup> o en líquido amniótico para el diagnóstico prenatal y en sangre de cordón umbilical en el neonato. En este último caso, hemos desarrollado una modificación de la técnica de Salting Out original <sup>(159)</sup> para la extracción de ADN en sangre de cordón umbilical teniendo en cuenta que esta técnica no siempre permite la obtención de un ADN factible de ser amplificado por PCR. La modificación propuesta representa una buena opción en aquellos casos de difícil purificación del ADN <sup>(179)</sup>.

#### 4.2.1 GRUPO DE PACIENTES SIN IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Entre los pacientes en los que no se pudo detectar la mutación responsable del fenotipo  $\beta$  talasémico se hallaron cuatro hombres, cuatro mujeres y un niño.

Todos eran de origen italiano, excepto un varón, griego.

Todos presentaron fenotipo hematimétrico dentro de lo esperado para pacientes portadores de  $\beta$  talasemia.

Los niveles de Hb A<sub>2</sub> estuvieron por encima del 4% y los de Hb F por debajo del 5%.

Los valores del metabolismo férrico y de ferritina sérica fueron normales.

Cuando se estudiaron por PCR-ARMS las seis mutaciones anteriormente mencionadas, todos presentaron banda de amplificación con el oligonucleótido normal, no así con el mutado.

Ningún paciente presentó asociación con alfa talasemia (delección 3,7 kb) ni con triplicación de genes alfa (alfa alfa alfa anti 3,7 kb).

En estos casos sería necesario investigar la presencia de mutaciones muy poco frecuentes en nuestro medio (menos del 2 %) o proceder a la secuenciación del gen beta.

También tener en cuenta que hay estudios poblacionales que han mostrado que aproximadamente el 1% de los genes beta talasémicos en el mundo permanecen sin caracterizar a pesar de un exhaustivo análisis de los genes  $\beta$  globina incluyendo las regiones flanqueantes. Se ha postulado que en estos casos la mutación puede ser hallada en el *upstream*  $\beta$  LCR o en la región *enhancer* 700-1000 pb 3' del gen  $\beta$  globina. Sin embargo, en varias familias, análisis de ligamiento, demostraron que el fenotipo  $\beta$ -talasémico se segrega independientemente del *cluster*  $\beta$  globina, implicando que la determinante genética puede actuar en *trans* <sup>(180-182)</sup>.

### **4.3 GENÉTICA MOLECULAR DE $\beta$ TALASÉMICOS HETEROCIGOTAS. INTERRELACIÓN CON PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

Nuestro estudio consta de 109 sujetos con  $\beta$ -talasemia heterocigota en los que hacemos distinción entre los que se expresan fenotípicamente como  $\beta^0$  ó  $\beta^+$ . En estos sujetos se excluyeron las condiciones adquiridas o genéticas como la deficiencia de hierro, la  $\alpha$ -talasemia deleción ( $-\alpha^{3,7}$ ) y la triplicación de genes alfa (anti  $\alpha\alpha^{3,7}$ ), los cuales pueden modificar tanto los índices hematimétricos cuanto el nivel de Hb A<sub>2</sub>.

#### **4.3.1 Estudio Hematimétrico**

Como ya se ha dicho, los parámetros hematológicos más utilizados para el diagnóstico de una  $\beta$ -talasemia heterocigota son, el número de hematíes ( $GR \times 10^{12}/l$ ), los niveles de hemoglobina (Hb g/dl) para ver el grado de anemia, la hemoglobina corpuscular media (HCM pg) y sobre todo el volumen corpuscular medio (VCM fL) que pone de manifiesto la microcitosis. Se han publicado estudios que han puesto de manifiesto que dependiendo del tipo de mutación responsable de la  $\beta$  talasemia, la magnitud de las manifestaciones hematológicas puede ser variable <sup>(109,183-186)</sup>.

En este trabajo, no se encontraron claras diferencias entre estos parámetros si se trata de una  $\beta$ -talasemia con ausencia de síntesis de cadena  $\beta$  globina ( $\beta^0$ ) o bien una síntesis reducida ( $\beta^+$ ) (Tablas 3.26, 3.27, 3.29, 3.30). Sí encontramos diferencias levemente significativas ( $p < 0,10$ ) entre los valores promedios de HCM para las distintas mutaciones consideradas, para el genotipo  $\beta^+$  I-6 es marginalmente superior que para el genotipo  $\beta^+$  II-745, no existiendo diferencias significativas entre los restantes cuatro genotipos estudiados (Tabla 3.27).

Los datos obtenidos en nuestro estudio concordaron en parte con lo que otros autores han encontrado en otros países y etnias en donde Rosatelli y col. <sup>(183)</sup> en Italia (estudiando 126 portadores y siete mutaciones) encontraron diferencias significativas en los valores de VCM y HCM, siendo éstos mayores sólo cuando se trató de las mutaciones  $\beta^+I-6$  y  $-87$  cuando se compararon con mutaciones que producían  $\beta^+$  y  $\beta^0$  talasemia.

Stefanis y col. <sup>(184)</sup> estudiando en 55 portadores las tres mutaciones más comunes en Grecia ( $\beta^+I-6$ ,  $\beta^+I-110$  y CD39) no encontraron correlación consistente entre éstas y el nivel de Hb, el hematocrito y los índices hematimétricos, sólo un ligero aumento del VCM cuando se trató de la mutación  $\beta^+I-6$ .

Tampoco Altay y col <sup>(182)</sup> encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de VCM en los rasgos talasémicos asociados con IVS I-110, IVS I-6 y IVS II-1.

Por el contrario, Rund y col. <sup>(186)</sup> en Israel al estudiar 113 individuos portadores e identificar 18 mutaciones, encontró que la media del VCM de los portadores de  $\beta^0$  talasemia fue significativamente mas baja que la de los portadores de  $\beta^+$  talasemia; las distintas mutaciones  $\beta^+$  fueron asociadas con diferencias significativas en los valores de VCM y por el contrario, todas las mutaciones  $\beta^0$  tuvieron rangos idénticos de VCM, indicando esto que el grado de reducción en el VCM está directamente relacionado con la severidad de la mutación. Esta conclusión permitiría usar este parámetro para planear estrategias para la rápida identificación de la mutación en poblaciones con gran diversidad de mutaciones.

En nuestra población, que presenta poca diversidad de mutaciones y en donde no hallamos una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de VCM para los seis genotipos estudiados (Tabla 3.36), planificamos el estudio molecular basándonos solamente en la frecuencia que estos genotipos presentaron.

### 4.3.2 Recuento de Reticulocitos

Los valores de reticulocitos no fueron un parámetro diferenciador entre  $\beta^+$  y  $\beta^0$ -talasemia (Tabla 3.34), en algunos casos, el número de reticulocitos en sangre periférica fue algo elevado, coincidiendo con un mayor grado de anemia.

### 4.3.3 Cuantificación de Hemoglobinas

La elevación de Hb A<sub>2</sub> es la característica más importante en la identificación de heterocigotas  $\beta$  talasémicos. Sin embargo algunos portadores pueden tener Hb A<sub>2</sub> normal o en el límite inferior del rango para un portador, un ejemplo de esta categoría es la de los portadores de la mutación  $\beta^+$  I-6<sup>(187, 188)</sup>. En todos los individuos heterocigotos donde nos fue posible identificar la mutación, el nivel de Hb A<sub>2</sub> fue aproximadamente el doble del rango normal (Tabla 3.2). En nuestro estudio, donde sólo identificamos tres individuos con la mutación  $\beta^+$  I-6, la Hb A<sub>2</sub> de los mismos fue de 5,5, 5,6 y 4,9 % o sea, valores superponibles con la media hallada en los portadores de una mutación  $\beta^+$  (Tabla 3.4).

Las diferencias encontradas en los niveles de HbA<sub>2</sub> para el fenotipo  $\beta^+$  versus  $\beta^0$  no resultaron significativas (Tabla 3.32) como las descritas por Rund et al.<sup>(186)</sup> en donde los niveles de HbA<sub>2</sub> para  $\beta^0$  (5,13%  $\pm$  0,9) frente a  $\beta^+$  (4,3%  $\pm$  1,2) sí presentaron diferencias significativas (p=0,008).

Altay y col<sup>(185)</sup>, al igual que nosotros (Tabla 3.39), encontraron que el aumento de Hb A<sub>2</sub> no se correlaciona con la severidad de la mutación responsable de  $\beta$  talasemia, dado que sólo hallaron valores significativamente mas altos de Hb A<sub>2</sub> en pacientes portadores de la mutación  $\beta^0$  II-1 cuando se compararon con individuos portadores de la mutación  $\beta^+$  I-6.

Para Rosatelli et al.<sup>(183)</sup> los niveles de HbA<sub>2</sub> sólo resultaron más bajos en los heterocigotas para las mutaciones  $\beta^+$  I-6 y  $\beta^+$  I-110 cuando se compararon con los fenotipos

$\beta^0$ 39,  $\beta^+$  I-1 y  $\beta^+$  II-745, no pudiendo relacionarse este hallazgo con la severidad de la mutación, ya que el menor aumento fue visto tanto en una mutación suave (IVS I-6) cuanto en una severa (IVS I-110).

Por su parte, Stefanis L y col <sup>(184)</sup> sólo encontraron diferencias estadísticamente significativas al hallar valores más bajos de Hb A<sub>2</sub> en pacientes portadores de la mutación  $\beta^+$  I-6 cuando se compararon con pacientes portadores de IVS I-110 y CD39.

Los niveles de HbF en los beta talasémicos heterocigotos generalmente están alrededor del 2%, pero hay un porcentaje en que estos niveles están por encima del 2,5% <sup>(189)</sup>.

Kutlar y col <sup>(187)</sup> en una población mediterránea y estudiando las mismas seis mutaciones que nosotros, asociaron niveles altos de Hb F con las mutaciones IVS I-2 e IVS II-1.

En nuestro trabajo, los valores de Hb F encontrados en las mutaciones  $\beta^+$  y  $\beta^0$  no fueron lo suficientemente significativos para establecer diferencias entre los genotipos (Tabla 3.33), sin embargo se observa en nuestros datos (Tabla 3.40), un moderado aumento (por encima del 2,5 %) en los niveles de HbF en los portadores de las mutaciones CD 39 y IVS I-6, algo similar a lo publicado por Vrettou y col <sup>(189)</sup> quienes encontraron que el 73% de los portadores talesémicos con Hb F > 2,5 % presentaban las mutaciones CD 39, IVS II-1, codon 6 (-A) y codon 8 (-AA), implicando una asociación entre las mutaciones y el moderado aumento en los niveles de Hb F.

Stefanis y col <sup>(184)</sup> también encontraron diferencias significativas hallando niveles mas altos de Hb F en pacientes CD39 heterocigotas (2,31%  $\pm$  1,52) cuando se compararon con heterocigotas IVS I-6 (0,79%  $\pm$  0,45) y portadores de IVS I-110 (1,17%  $\pm$  0,75), siendo ésta la primera vez que se reportó un ligero aumento en el nivel de Hb F en heterocigotas CD39.

Es importante destacar que en los trabajos publicados, las determinaciones de los niveles de Hb A<sub>2</sub> y de Hb F se llevaron a cabo mediante la técnica de *high performance liquid chromatographic* (HPLC).

#### **4.3.4 Metabolismo Férrico**

El estudio del metabolismo férrico fue llevado a cabo, para descartar que la anemia microcítica e hipocrómica que presentaban este grupo de pacientes, fuera debida al progresivo descenso de la síntesis de hemoglobina, como consecuencia del agotamiento de las reservas de hierro. Se observó que los niveles de Ferritina fueron normales. Lo mismo se observó con la Sideremia y la TIBC (Tablas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9).

### **4.4 CAUSAS DE LAS DIFERENCIAS FENOTÍPICAS OBSERVADAS EN PORTADORES TALASÉMICOS QUE PRESENTAN LA MISMA MUTACIÓN**

#### **4.4.1 Asociación de $\beta$ -talasemia heterocigota con delección $-\alpha^{3,7}$**

El desequilibrio en la síntesis de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  globina que forman parte de la hemoglobina, es quizá el factor mas importante en la fisiopatología de la  $\beta$ -talasemia <sup>(190)</sup>, ya que la acumulación del exceso de cadena  $\alpha$  en forma de precipitado intracelular causa la destrucción precoz de eritroblastos antes de alcanzar la maduración completa, por otro lado, los hematíes que logran madurar presentan acusadas alteraciones morfológicas que explican la reducción de su supervivencia en la circulación y por tanto la hemólisis <sup>(191)</sup>.

La heredabilidad de una  $\alpha$ -talasemia con una  $\beta$ -talasemia heterocigota, conlleva la reducción del exceso de cadenas  $\alpha$ , equilibrándose la síntesis de cadenas, suavizando las manifestaciones clínicas <sup>(100)</sup>, por el contrario el aumento de genes  $\alpha$  puede aumentar la severidad de la  $\beta$ -talasemia heterocigota <sup>(94,192,193)</sup>.

La  $-\alpha^{3,7}$  talasemia es probablemente el desorden monogénico más frecuente en el mundo, siendo característico de poblaciones africanas, mediterráneas y chinas <sup>(194)</sup>. En nuestro medio, Noguera y col. <sup>(195)</sup> al estudiar 310 neonatos estimaron la frecuencia de esta delección en estado homocigota en 0,30 % y en estado heterocigota en 1,94 %, mas baja que en Italia (4-5%) <sup>(196)</sup> y que en España (4 %) <sup>(197)</sup>.

Este último país, en una publicación reciente donde se estudiaron 1264 pacientes con alfa talasemia encontraron 911 con heterocigosis alfa(+)-talasemia, siendo 872 individuos portadores de la delección -3,7 kb, 14 de la -4,2 kb, dos de la delección -3,5 kb y 23 de no delecciones <sup>(197)</sup>.

En Buenos Aires, Varela y col. al estudiar 14 probables portadores de alfa talasemia encontraron este carácter en 8 de ellos y todos presentaron la delección -3,7 kb <sup>(198)</sup>.

La asociación  $\beta$ -talasemia heterocigota con delección  $-\alpha^{3,7}$  fue hallada en sólo un paciente entre los 124 individuos estudiados para esta delección.

Se trató de una mujer de 28 años, de origen italiano.

#### **4.4.1.1 Estudio Hematimétrico**

En este caso se observó un menor grado de anemia con aumento de la Hb, Hto, VCM y HCM (Tabla 3.15) por encima de los valores hallados en las mujeres  $\leq 50$  años heterocigotas con  $\beta^0$  talasemia (Tabla 3.11), no habiéndose encontrado diferencias con lo publicado por otros autores <sup>(100)</sup>. Así es como sólo estos valores permitieron la sospecha de una  $\alpha$  talasemia, ya que la morfología eritrocitaria (Figura 3.14) de la portadora no presentó ninguna diferencia con lo habitualmente observado en los portadores de  $\beta^0$ -talasemia.

#### **4.4.1.2 Recuento de Reticulocitos**

El valor hallado de reticulocitos (2%) estuvo dentro de la media de los valores obtenidos para las mujeres  $\leq 50$  años heterocigotas con  $\beta^0$  talasemia (Tabla 3.14) y fue superponible a los descritos en la literatura para este tipo de asociaciones <sup>(100)</sup>.

#### **4.4.1.3 Cuantificación de Hemoglobinas**

Los niveles de Hb A<sub>2</sub> (5,2%) y de Hb F (1,4%) se hallaron dentro de las medias de los valores observados para las mujeres  $\leq 50$  años heterocigotas con  $\beta^0$  talasemia (Tablas 3.4 y 3.5).

#### **4.4.1.4 Metabolismo Férrico**

Todos los parámetros analizados (Tabla 3.16) fueron normales.

#### **4.4.1.5 Análisis por Biología Molecular**

Desde el punto de vista molecular, este tipo de asociaciones se comporta como heterocigoto ya que estas mutaciones son investigadas independientemente, de modo que cuando se estudió la mutación responsable de la  $\beta$  talasemia mediante la técnica PCR-ARMS con oligonucleótidos normal y mutado, se obtuvo en ambos ensayos (normal y mutado) dos fragmentos, uno de 861 bp correspondiente al control interno de amplificación y otro de 436 pb para el CD39 normal y mutado, debido a que tanto el oligonucleótido normal como el mutado reconocen sus secuencias complementarias en sus respectivos alelos normal y mutado (Figura 3.11).

La mutación detectada responsable de la  $\beta$  talasemia correspondió a la mas frecuente en nuestro medio <sup>(199)</sup> y también en Italia y España <sup>(169)</sup>.

La deleción  $-\alpha^{3,7}$  <sup>□</sup> fue estudiada por PCR mediante amplificación alelo específica.

Los fragmentos obtenidos después de la amplificación con oligonucleótidos normal y mutado fueron de 1760 pb correspondiendo a lo esperado para un portador de la deleción (Figura 3.13).

#### **4.4.2 ASOCIACIÓN DE $\beta$ -TALASEMIA HETEROCIGOTA CON TRIPLICACION DE GENES $\alpha$ ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$ )**

El desequilibrio en la síntesis de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  globina que forman parte de la hemoglobina, es quizá el factor mas importante en la fisiopatología de la  $\beta$ -talasemia <sup>(191)</sup>, ya que la acumulación del exceso de cadena  $\alpha$  en forma de precipitado intracelular causa la destrucción precoz de eritroblastos antes de alcanzar la maduración completa, por otro lado, los hematíes que logran madurar presentan acusadas alteraciones morfológicas que explican la reducción de su supervivencia en la circulación y por tanto la hemólisis <sup>(192)</sup>.

La heredabilidad de una  $\alpha$ -talasemia con una  $\beta$ -talasemia heterocigota, conlleva la reducción del exceso de cadenas  $\alpha$ , equilibrándose la síntesis de cadenas, suavizando las manifestaciones clínicas <sup>(100)</sup>, por el contrario el aumento de genes  $\alpha$  puede incrementar la severidad de la  $\beta$ -talasemia heterocigota <sup>(98,192,193)</sup>, aunque se han publicado algunas excepciones <sup>(200)</sup>.

El primer caso de talasemia intermedia descrito en España debido a la interacción de tres genes alfa con talasemia menor CD39 fue publicado en 1993 <sup>(201)</sup>, tratándose de una niña de 9 meses de edad con moderada esplenomegalia.

Varela y col <sup>(198)</sup> al estudiar dos pacientes con talasemia intermedia, confirmó la asociación de una mutación de beta talasemia y la triplicación de genes alfa en los dos casos estudiados.

En nuestro trabajo la asociación  $\beta$ -talasemia heterocigota con triplicación de genes  $\alpha$  fue hallada en dos individuos entre los 48 estudiados para determinar la presencia de la triplicación.

Se trató de un niño de 10 años (a) y de una mujer de 36 años (b), ambos de origen italiano, quienes no presentaron clínica de talasemia intermedia.

#### 4.4.2.1 Estudio Hematimétrico

La tabla siguiente muestra los valores hematimétricos publicados de pacientes  $\beta$  talasémicos heterocigotas con triplicación de genes alfa.

	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM	HCM	Hb A <sub>2</sub> (%)	Hb F (%)	Ret.
Niños N= 6	9,5 ± 1,1	33,4 ± 3,6	64,5 ± 2,8	19,1 ± 1,2	5 ± 0,91	4,9 ± 3,4	3,5 ± 1,3
Adultos N= 11	10,2 ± 1,1	33,5 ± 3,2	66,7 ± 5,0	19,5 ± 1,2	5,1 ± 0,51	4,9 ± 2,5	3,0 ± 1,4

**Tabla 4.1** Parámetros hematimétricos en  $\beta$  talasémicos heterocigotas con triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$  anti<sup>3,7</sup>) (Traeger-Synodinos) <sup>(202)</sup>.

En el caso (a) (Tabla 3.17) se observó una cifra de GR en el rango obtenido para el grupo de niños portadores de  $\beta^+$  talasemia mientras que los valores de Hb y Hto estuvieron por debajo (Tabla 3.13). El valor de Hb se superpone a la media publicada <sup>(202)</sup> (Tabla 4.1) cuando se estudiaron seis niños con  $\beta$  talasemia heterocigota y triplicación de genes alfa, en este caso todos los niños eran portadores de una  $\beta^0$  talasemia y delección  $-\alpha$  <sup>3,7</sup>. El VCM y HCM (Tabla 3.17) se encontraron por debajo de los valores hallados en los niños

heterocigotas con  $\beta^+$  talasemia (Tabla 3.13) y también por debajo de los valores publicados en este tipo de asociación <sup>(202)</sup> (Tabla 4.1). Así es como sólo estos valores permitieron la sospecha de una triplicación de genes  $\alpha$ , ya que la morfología eritrocitaria del portador no presentó ninguna diferencia con lo habitualmente observado en este tipo de pacientes (Figura 3.16).

En el caso (b) (Tabla 3.17) se observó una cifra de GR dentro del rango obtenido para el grupo de mujeres portadores de  $\beta^0$ -talasemia  $\leq$  de 50 años, mientras que los valores de Hb y Hto estuvieron por debajo del mismo (Tabla 3.11). El VCM y el HCM (Tabla 3.17) se encontraron por debajo de los valores hallados en mujeres portadores de  $\beta^0$ -talasemia  $\leq$  de 50 años (Tabla 3.11). Todos los parámetros hematimétricos resultaron menores a lo publicado <sup>(202)</sup> cuando se estudiaron 11 adultos (6  $\beta^+$  y 5  $\beta^0$ ; 7  $-\alpha^{3,7}$  y 4  $-\alpha^{4,2}$ ) con este tipo de asociación.

Tanto valor de Hb como de Hto sugirieron una triplicación de genes alfa y también colaboró en la sospecha la morfología de la sangre periférica que presentó una marcada poiquilocitosis con hematíes baciliformes y dacriocitos (Figura 3.17).

Lo anteriormente dicho, aunque se trata de sólo dos casos, concuerda con lo publicado por Akerman y col <sup>(203)</sup>, quienes concluyeron que en esta asociación el efecto del gen alfa triplicado, hace que uno de los parámetros utilizados para el screening de beta talasémicos (VCM), se desvíe por debajo de los valores esperados.

#### **4.4.2.2 Recuento de Reticulocitos**

En el caso (a) el valor de reticulocitos de 2,2 % estuvo en el rango publicado para este tipo de asociación <sup>(202)</sup> y también dentro del rango obtenido para el grupo de niños portadores de  $\beta^+$  talasemia (Tabla 3.14).

En el caso (b) el valor de reticulocitos de 3,4 % estuvo en el rango publicado para este tipo de asociación <sup>(202)</sup> y ligeramente por encima del rango hallado en mujeres portadores de  $\beta^0$ -talasemia  $\leq$  de 50 años (Tabla 3.14) correspondiendo a un mayor grado de hemólisis regenerativa.

#### **4.4.2.3 Cuantificación de Hemoglobinas**

En el caso (a) los valores de Hb A<sub>2</sub> (6%) y de Hb F (2,6%) estuvieron en el rango publicado para este tipo de asociación <sup>(202)</sup> y también dentro del rango obtenido para el grupo de niños portadores de  $\beta^+$  talasemia (Tablas 3.4 y 3.5).

En el caso (b) el valor de Hb A<sub>2</sub> (5,3%) estuvo en el rango publicado para este tipo de asociación <sup>(202)</sup> y también dentro del rango hallado en mujeres portadores de  $\beta^0$ -talasemia  $\leq$  de 50 años (Tabla 3.4). El valor de Hb F (4,9%) estuvo en el rango publicado para este tipo de asociación <sup>(202)</sup> y algo por encima del rango hallado en mujeres portadores de  $\beta^0$ -talasemia  $\leq$  de 50 años (Tabla 3.5). Esto se debería a que al haber cadenas  $\alpha$  en exceso, se exacerbaría la unión a cadenas  $\gamma$ .

#### **4.4.2.4 Metabolismo Férrico**

El patrón de hierro de ambos pacientes (Tabla 3.18) al compararse con un patrón de hierro normal (Tabla 3.1) se correspondió con un aumento del hierro circulante, con ferritina normal, que estaría relacionado con un mayor grado de hemólisis.

#### **4.4.2.5 Análisis por Biología Molecular**

Al estudiar la mutación responsable de la  $\beta$  talasemia en el paciente (a) mediante la técnica PCR-ARMS con oligonucleótidos normal y mutado, se obtuvo en ambos ensayos

(normal y mutado) dos fragmentos, uno de 527 bp correspondiente al control interno de amplificación y otro de 738 pb para el IVS II-745 normal y mutado, debido a que tanto el oligonucleótido normal como el mutado reconocen sus secuencias complementarias en sus respectivos alelos normal y mutado. Esta mutación fue hallada en el 3,4 % de los pacientes portadores beta talasémicos que pudieron ser identificados (Figura 3.8)

Cuando se estudió la mutación responsable de la  $\beta$  talasemia en la paciente (b) mediante la técnica PCR-ARMS con oligonucleótidos normal y mutado, se obtuvo en ambos ensayos (normal y mutado) dos fragmentos, uno de 861 bp correspondiente al control interno de amplificación y otro de 436 pb para el CD39 normal y mutado, debido a que tanto el oligonucleótido normal como el mutado reconocen sus secuencias complementarias en sus respectivos alelos normal y mutado (Figura 3.11).

La triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha^{\text{anti3,7}}$ ) fue estudiada por PCR mediante amplificación alelo específica.

Los fragmentos obtenidos después de la amplificación con oligonucleótidos normal y mutado fueron de 1.760 pb. como corresponde a un estado heterocigota (Figura 3.15).

Según Bianco I y col <sup>(204)</sup>, la severidad del fenotipo en este tipo de asociaciones no tiene relación con el defecto beta talasémico. En nuestro trabajo si bien hallamos sólo dos casos (uno  $\beta^0$  y uno  $\beta^+$ ) los fenotipos fueron similares.

#### 4.4.3 SUJETOS PORTADORES DE $\delta\beta$ TALASEMIA

La  $\delta\beta$  talasemia obedece, en la mayoría de los casos, a deleciones mas o menos extensas del complejo beta que en todos los casos afectan a ambos genes delta y beta. Como consecuencia de ello se produce una síntesis compensadora de cadenas gamma (HbF) de intensidad superior a lo que se observa en la  $\beta$  talasemia <sup>(205)</sup>.

Existen también diversas mutaciones que pueden afectar el gen  $\delta$  globina, esto puede causar una síntesis reducida ( $\delta^+$ talasemia) o una ausencia completa ( $\delta^0$ talasemia) de la producción de  $\delta$  globina. A pesar de que estas condiciones son clínicamente silentes, éstas cobran importancia cuando se co-heredan con  $\beta$  talasemia, dado que previenen el aumento de HbA<sub>2</sub> lo cual puede confundir el diagnóstico de portador de  $\beta$  talasemia el cual se hace esencialmente en base al aumento del nivel de dicha hemoglobina <sup>(206)</sup>.

La co-herencia de una mutación en el gen  $\delta$  (en *cis* o en *trans*) probablemente ocurre en la mayoría de los casos de  $\beta$  talasemia con Hb A<sub>2</sub> normal <sup>(206)</sup>.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se detectaron dos portadores de  $\delta\beta$  talasemia entre los 124 individuos estudiados.

Se trató de una niña de 22 meses (a) y una mujer de 27 años (b), ambas descendientes de italianos.

##### 4.4.3.1 Estudio Hematimétrico

En los dos casos (a y b), aunque ligeramente en el (b), (Tabla 3.19) se observó una menor cifra de glóbulos rojos cuando fueron comparados con los valores obtenidos en niños portadores de la misma mutación ( $\beta^0 39$ ) responsable de la  $\beta$  talasemia (Tabla 3.13) y con mujeres  $\leq$  de 50 años tanto para  $\beta^+$  como para  $\beta^0$  talasemia (Tabla 3.11). Los valores de Hb y Hto se hallaron dentro de los valores medios obtenidos.

Los índices hematimétricos (VCM y HCM) (Tabla 3.19) fueron mayores en el caso (a) a los valores obtenidos en el grupo de niños con  $\beta^0$  talasemia (Tabla 3.13). En el caso (b) (Tabla 3.19) se encontraron dentro del rango para mujeres  $\leq$  de 50 años tanto para  $\beta^+$  como para  $\beta^0$  talasemia (Tabla 3.11).

La morfología eritrocitaria de las portadoras no presentó ninguna diferencia con lo habitualmente observado en portadores de  $\beta$ -talasemia (Figura 3.18).

#### **4.4.3.2 Recuento de Reticulocitos**

Los valores hallados de reticulocitos [2 % (a) y 3,2 % (b)] estuvieron dentro de la media de los valores obtenidos para los niños heterocigotas con  $\beta^0$  talasemia y las mujeres portadoras  $\leq$  de 50 años (Tabla 3.14).

#### **4.4.3.3 Cuantificación de Hemoglobinas**

Los niveles de Hb A<sub>2</sub> [2,2 % (a) y 2,4 % (b)] estuvieron dentro del rango de los valores de niños y adultos normales (Tabla 3.2). El de Hb F [7,2 % (a) y 13 % (b)] fue notoriamente superior al rango habitualmente observado en los portadores de  $\beta$  talasemia. Estos valores fueron los que permitieron hacer el diagnóstico de portador de  $\delta\beta$ -talasemia (206).

#### **4.4.3.4 Metabolismo Férrico**

Todos los parámetros analizados fueron normales (Tabla 3.20).

#### 4.4.3.5 Análisis por Biología Molecular

Cuando se estudió en el caso (a) la mutación responsable de la  $\beta$  talasemia mediante la técnica PCR-ARMS con oligonucleótidos normal y mutado, se obtuvo en ambos ensayos (normal y mutado) dos fragmentos, uno de 861 bp correspondiente al control interno de amplificación y otro de 436 pb para el CD39 normal y mutado, debido a que tanto el oligonucleótido normal como el mutado reconocen sus secuencias complementarias en sus respectivos alelos normal y mutado (Figura 3.11).

Esta paciente presentó, por lo tanto una mutación y no una delección (lo más común) del gen  $\beta$  por lo que se espera que sea también una segunda mutación lo que afecte al gen  $\delta$  causando un aumento en la producción de Hb F. Probablemente se trate de la mutación  $\delta^{059}$  (-A) la cual generalmente se asocia en *cis* junto con las mutaciones  $\beta^{039}$  y  $\beta^+ I-110$  <sup>(207)</sup>, dos mutaciones comunes en la zona del Mediterráneo y también las más frecuentes en nuestro medio <sup>(199)</sup>. También podría tratarse de la  $\delta\beta$ -talasemia encontrada en Cerdeña, la cual porta la mutación  $\beta^{039}$ , responsable del fenotipo talasémico y el gen de  $A\gamma$  globina porta la mutación C  $\rightarrow$  T en la posición -196 la cual se asocia con una forma no delección de PHHF <sup>(208)</sup>.

En la paciente (b) dado que no se detectó ninguna de las seis mutaciones investigadas que permiten identificar el 92,6 % de las mutaciones en nuestro medio, podría esperarse la presencia de una delección mas o menos extensa del complejo beta que en todos los casos afecta a ambos genes, delta y beta. Teniendo en cuenta el origen de esta paciente y que Abreu y col <sup>(209)</sup> en Bs. As. al estudiar doce pacientes portadores de  $\delta\beta$  confirmó en todos ellos la presencia de la delección  $(\delta\beta)^0$  siciliana, se podría sospechar la presencia de dicha delección, la cual puede ponerse en evidencia mediante PCR alelo específica.

#### **4.4.4 PACIENTE CON DOBLE HETEROCIGOSIS $\beta^0$ th /Hb S**

En el transcurso de este programa de tesis hemos identificado una doble heterocigosis para  $\beta^0$  talasemia y Hb S en un paciente con anemia hemolítica severa. Se trató de un hombre adulto de 36 años (1997), de origen italiano, diagnosticado como drepanotalasemia desde los 4 años y esplenectomizado a esa edad y que ingresó al hospital para el tratamiento de su sobrecarga de hierro, dado que había sido politransfundido a lo largo de su vida.

Como ya ha sido publicado <sup>(210)</sup> el tipo de  $\beta$  talasemia influye en la expresión del fenotipo de la enfermedad en los pacientes con doble heterocigosis para HbS y  $\beta$  talasemia.

Los pacientes que tienen Hb S- $\beta^+$  presentan un fenotipo menos severo que aquellos pacientes con Hb S-  $\beta^0$  talasemia.

Desde 1944 cuando Silvestroni y Bianco <sup>(211)</sup> describen por primera vez que el rasgo drepanocítico puede ser hallado junto con el talasémico, se ha publicado la co-herencia de ambos genes en diferentes grupos étnicos.

En aquellos pacientes como el comentado aquí, que heredó  $\beta^0$  talasemia junto con Hb S, las manifestaciones clínicas son muy similares a las de la anemia drepanocítica <sup>(209)</sup>. Este paciente tuvo dos hijos varones, ambos portadores del rasgo drepanocítico, sin manifestaciones clínicas.

El primer caso de la asociación de estas dos mutaciones en Argentina fue publicado en 1996 <sup>(212)</sup>, tratándose de una mujer de origen hispano y diagnosticada en la ciudad de Córdoba.

En una revisión de las hemoglobinopatías S diagnosticadas (925 casos) durante 30 años en el Hospital Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires, Abreu y col <sup>(213)</sup>, encontraron la asociación de Hb S / $\beta$  talasemia en 23 casos y la asociación de anemia drepanocítica o Hb S/  $\beta$  talasemia en ocho.

#### **4.4.4.1 Estudio Hematimétrico**

Este paciente presentó una anemia severa (Tabla 3.21) con valores de Hb similares a los homocigotos SS <sup>(214)</sup>. La morfología de la serie roja presentó una marcada hipocromía, que no es observada en el homocigoto SS (Figura 3.19). Es importante destacar que este paciente ha recibido múltiples transfusiones a lo largo de su vida.

#### **4.4.4.2 Recuento de Reticulocitos**

El recuento de reticulocitos (17,8 %) fue elevado como era de esperar para una anemia hemolítica.

#### **4.4.4.3 Cuantificación de Hemoglobinas**

En este paciente se encontró un nivel de HbA<sub>2</sub> (6 %) incrementado a diferencia de lo que ocurre en el homocigoto SS en el que el nivel de HbA<sub>2</sub> es normal <sup>(214)</sup>.

Divoky y col. <sup>(215)</sup> publicaron una comparación entre los niveles de Hb S y Hb A en pacientes con Hb S-beta-talasemia con diferentes alelos talasémicos, encontrando grandes variaciones; el nivel mas alto de Hb A (45%) fue hallado en un paciente con Hb S-beta(+)-talasemia [-92(C→ T)] y el mas bajo (aproximadamente 13%) en pacientes con Hb S-beta(+)-talasemia [IVS-II-745(C→ G)]. La severidad clínica estuvo directamente relacionada con el nivel de Hb A presente. En este caso, por tratarse de una asociación de Hb S con un alelo beta(0)-talasemia, el nivel de Hb A fue cero, dando lugar a una anemia severa.

La morfología eritrocitaria de la sangre periférica (fundamentalmente) y la Hb F, presente en un valor del 14% hizo considerar la asociación de HbS con talasemia; en el estado

SS con haplotipo CAR se encuentra a menudo por debajo del 5%, en el haplotipo Ben entre el 5 y 15 % y en el haplotipo Sen alrededor del 20% <sup>(214)</sup>.

Al estudiar 50 pacientes con Hb S/beta-talasemia ( $\beta^0$  ó  $\beta^+$ ), Bashir y col <sup>(216)</sup>, encontraron que el valor de la hemoglobina total no fue significativamente diferente en ambos tipos, los niveles de Hb F y S fueron significativamente mas altos en  $\beta^0$  que en  $\beta^+$  talasemia, mientras que el nivel de Hb A<sub>2</sub> fue mas bajo en los  $\beta^0$  que en los  $\beta^+$ .

#### **4.4.4.4 Metabolismo Férrico**

Los valores hallados en el estudio del metabolismo férrico (Tabla 3.22) correspondieron a los de un paciente con sobrecarga de hierro <sup>(164)</sup> ya que este individuo ha recibido múltiples transfusiones a lo largo de su vida.

#### **4.4.4.5 Análisis por Biología Molecular**

Cuando se estudió la mutación responsable de la  $\beta$  talasemia mediante la técnica PCR-ARMS con oligonucleótidos normal y mutado, se obtuvo en ambos ensayos (normal y mutado) dos fragmentos, uno de 861 bp correspondiente al control interno de amplificación y otro de 436 pb para el CD39 normal y mutado, debido a que tanto el oligonucleótido normal como el mutado reconocen sus secuencias complementarias en sus respectivos alelos normal y mutado (Figura 3.11).

#### **4.4.5 PACIENTE CON DOBLE HETEROCIGOSIS $\beta^0/\beta^+$**

Durante la realización de este trabajo de tesis se presentó solamente un individuo con anemia de Cooley que resultó ser un paciente doble heterocigota (hijo de dos individuos incluídos en este estudio).

La identificación de las mutaciones causantes de esta anemia grave fue sencilla dado que se conocían las mutaciones responsables en los padres. Este niño heredó de su madre la mutación mas frecuente en nuestro medio ( $\beta^039$ ) y de su padre, la segunda mas frecuente ( $\beta^+$  I-110) <sup>(199)</sup> (Figura 3.20).

Varela y col. al estudiar 15 pacientes con talasemia mayor <sup>(198)</sup> encontraron predominante al genotipo con doble heterocigosis por sobre el homocigota.

La presentación de un solo caso de anemia de Cooley a lo largo de este estudio, pone de manifiesto de alguna manera, la baja frecuencia que tiene esta patología en nuestro medio.

## 4.5 CONCLUSIONES

Podemos resumir la importancia del presente trabajo de tesis en las siguientes conclusiones:

1. Este es el primer estudio acerca de la frecuencia de las distintas mutaciones responsables de beta talasemia en nuestro medio.
2. La mutación  $\beta^0$  39 resultó ser la más frecuente en la población estudiada.
3. A pesar de la elevada heterogeneidad molecular de la  $\beta$  talasemia, un grupo de seis mutaciones, relativamente pequeño, es el responsable del 92,6 % de los casos de  $\beta$  talasemia en nuestra área.
4. Los parámetros hematimétricos y la morfología eritrocitaria de sangre periférica de los portadores de beta talasemia no permiten sospechar una determinada mutación. Sí encontramos diferencias levemente significativas ( $p < 0,10$ ) entre los valores promedios de HCM para las distintas mutaciones consideradas, para el genotipo  $\beta^+$  I-6 es marginalmente superior que para el genotipo  $\beta^+$  II-745, no existiendo diferencias significativas entre los restantes cuatro genotipos estudiados.
5. Por lo dicho anteriormente, para la búsqueda de una mutación debemos basarnos en los porcentajes de frecuencia hallados.
6. Este es el primer estudio en nuestro país de rastreo de alfa talasemia ( $-\alpha^{3,7}$ ) ocurriendo en forma simultánea con  $\beta$  talasemia heterocigota.
7. Las diferencias fenotípicas en portadores talasémicos que presentan la misma mutación se observaron en:

- a) Asociación con  $\alpha$  talasemia (delección  $-\alpha^{3,7}$ ): el fenotipo hematimétrico en los pacientes que presentan rasgo beta talasémico asociado con alfa delección heterocigota tiende a normalizarse.
  - b) Asociación con triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$  anti  $^{3,7}$ ): el fenotipo hematimétrico de los pacientes que presentan rasgo beta talasémico asociado con alfa triplicación se desvía por debajo de los valores esperados para un portador de  $\beta$  talasemia.
  - c)  $\delta\beta$  talasemia: en el caso del portador de  $\delta\beta$  talasemia en que se encontró la mutación  $\beta^0 39$  el fenotipo hematológico fue similar a los portadores  $\beta$  talasémicos. El estudio convencional de hemoglobinas fue distinto al característico del portador  $\beta$  talasémico.
  - d) Doble heterocigosis  $\beta^0 39 / \text{Hb S}$ : en este caso se observaron diferencias tanto en el fenotipo hematológico cuanto en el estudio convencional de hemoglobinas.
  - e) Asociación con otra mutación para  $\beta$  talasemia: en nuestro único caso, la doble heterocigosis para  $\beta$  talasemia dio lugar a un paciente con anemia de Cooley.
8. Los estudios por medio de técnicas de biología molecular y el conocimiento de las frecuencias de las distintas mutaciones en nuestros pacientes con  $\beta$  talasemia son de suma necesidad para dar el adecuado asesoramiento genético y en caso de ser necesario establecer el diagnóstico prenatal, implementar en forma rápida el protocolo de trabajo, aún en casos de ausencia paterna.

## **5. RESUMEN**

Las talasemias son un grupo heterogéneo de anemias hereditarias, tanto desde el punto de vista molecular como clínico y hematológico, caracterizadas por la disminución o total ausencia de síntesis de una o varias cadenas de globina. La cadena sintetizada en menor cuantía es, por lo demás rigurosamente normal en su composición y estructura. Se trata, por tanto, de desórdenes cuantitativos, en oposición a las alteraciones cualitativas denominadas hemoglobinopatías.

La mayoría de los defectos génicos responsables de las  $\beta$ -talasemias son la mutación de un único nucleótido que afecta a uno de los diferentes procesos moleculares involucrados en la expresión del gen  $\beta$  globina: transcripción, procesamiento del pre-ácido ribonucleico mensajero (pre-RNA) y traducción.

La intensa actividad desarrollada en la década de los 80 y el gran avance de las técnicas de Biología Molecular para establecer las bases moleculares de las talasemias, han demostrado que las lesiones genéticas no pueden ser detectadas con los métodos analíticos convencionales.

Las  $\beta$ -talasemias son una de las alteraciones hereditarias más frecuentes y se encuentran distribuidas por todo el mundo. La alta frecuencia de los genes  $\beta$  talasémicos se debe probablemente a la protección frente a la malaria que proporciona el estado heterocigota.

En Argentina los estudios epidemiológicos, aunque escasos y fragmentarios, han evidenciado la presencia de las  $\beta$ -talasemias con cierta heterogeneidad fenotípica.

Debido a todo esto, se diseñó el presente estudio para optar al grado de Doctora en Bioquímica, y se marcaron los siguientes objetivos:

- 1- Determinar la heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia que nos permita dar el adecuado asesoramiento genético y establecer el consiguiente diagnóstico prenatal.

2- Interrelacionar el fenotipo de la mutación responsable de la  $\beta$ -talasemia ( $\beta^{+}$  ó  $\beta^0$ ) con parámetros hematológicos.

3- Tratar de establecer la causa de las diferencias fenotípicas observadas en portadores talasémicos que presentan la misma mutación.

Con el objetivo de obtener nuestros valores normales se realizó el estudio de un grupo control constituido por 150 individuos normales (59 varones, 70 mujeres y 21 niños), considerados normales al tener los valores hematimétricos dentro de los rangos normales, morfología de serie roja normal y no presentar ninguna alteración en el estudio de hemoglobinas por electroforesis.

Desde 1996 hasta fines de 2000, se han estudiado 124 individuos talasémicos mayores de un año, no relacionadas entre sí, originarios de Rosario y su zona de influencia.

En unos casos se trató de sujetos asintomáticos o con leves manifestaciones clínicas que acudieron a nuestro Servicio (Servicio de Hematología- Sala 9- Hospital Provincial del Centenario) por haber presentado microcitososis en un análisis de sangre rutinario coincidiendo con un ingreso quirúrgico, proceso infeccioso banal o chequeo de salud, y otros eran pacientes diagnosticados como portadores de  $\beta$  talasemia con anterioridad.

Durante la realización de este trabajo de tesis fue derivado a nuestro Servicio un paciente de 15 meses (hijo de un matrimonio de portadores incluidos en este estudio) por presentar un cuadro de anemia severa con requerimiento transfusional.

A las muestras mencionadas anteriormente se les practicaron las siguientes determinaciones:

1. Estudio hematimétrico:

Cuantificación de hematíes, hemoglobina y hematocrito.

Determinación de los parámetros VCM, HCM, CHCM

Observación de la morfología eritrocitaria

Recuento de reticulocitos

2. Metabolismo férrico:

Dosaje de hierro y capacidad de saturación de la siderofilina

Determinación de ferritina sérica

3. Estudio de hemoglobinas

Electroforesis de hemoglobinas en acetato de celulosa a pH 9,0

Electroforesis de hemoglobinas en Agar-citrato a pH 6,1

Cuantificación de hemoglobina Fetal

Test de cuerpos de inclusión

Test de inestabilidad térmica

Test de anaerobiosis

4. Estudios moleculares

Identificación de la mutación responsable de  $\beta$ - $\square$ talasemia

Presencia de la delección  $-\alpha^{3,7}$

Presencia de la triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$ anti 3,7) en aquellos individuos en los que el dosaje de Hb estuvo por debajo de 11 g/dl (varones y mujeres > 50 años) y por debajo de 10,5 g/dl (mujeres  $\leq$  50 años y niños), estudiándose entonces 48 individuos (7 varones, 2 mujeres > 50 años, 30 mujeres  $\leq$  50 años y 9 niños).

Para la identificación molecular de la mutación responsable de  $\beta$ - $\square$ talasemia se empleó la técnica de PCR-ARMS y para detectar la presencia de la alfa delección y de la alfa triplicación se empleó PCR- alelo específica.

Un individuo presentó la delección  $-\alpha^{3,7}$ , dos presentaron triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$  anti<sup>3,7</sup>), dos fueron portadores de una  $\delta\beta$  talasemia y uno mostró una doble heterocigosis

$\beta$ tal/HbS. Estos seis individuos fueron por lo tanto excluidos del grupo en el que se estudió la interrelación de los parámetros hematológicos con el genotipo  $\beta$ -talasémico y en ellos se analizaron las diferencias fenotípicas al compararlos con portadores  $\beta$ -talasémicos que presentaron la misma mutación. Se identificaron entonces, 118 sujetos no emparentados, portadores de  $\beta$  talasemia heterocigota, con metabolismo de hierro normal y sin asociación a ninguna otra de las patologías de la hemoglobina estudiadas.

Los dos individuos portadores de  $\delta\beta$  talasemia fueron excluidos del grupo en el que se analizó la heterogeneidad molecular de la  $\beta$  talasemia ya que estas talasemias presentan, en su gran mayoría, deleciones y no mutaciones puntuales que fue lo investigado en este trabajo, quedando por lo tanto constituido este grupo por 122 individuos.

La experiencia en el Mediterráneo ha mostrado que los programas preventivos de talasemia basados en la detección de portadores heterocigotas y el consejo genético no son efectivos para reducir la incidencia de nacimientos de niños con  $\beta$ -talasemia mayor. El diagnóstico prenatal de la  $\beta$ -talasemia ha dado una nueva dimensión a la prevención de la misma, pero para poder llevarlo a cabo, lo más importante es tener conocimiento de las mutaciones y su incidencia.

Este estudio intenta ofrecer un cuadro general de la genética molecular de la talasemia en nuestra área.

El 92,6 % de los alelos se identificaron con las 6 mutaciones diferentes estudiadas, superponible a los datos encontrados en otros países de la cuenca Mediterránea como Italia, donde el 88% se distribuye entre CD39 (40,1%), IVS-I-ntl10 (23,0%), IVS-I nt 1 (10,2%), IVS-I-nt 6 (9,9%) y IVS-II-nt 745 (5,0%), superponible también a lo publicado por Brasil en el estado de San Pablo donde la mayoría de los portadores de  $\beta$ -talasemia son descendientes

de italianos y con cuatro mutaciones, [CD39 (45 %), IVS-I-ntl10 (14 %), IVS-I-nt6 (5 %) y IVS-I-nt 1 (4 %)] identificaron el 97,1 % de los cromosomas talasémicos.

En España, Villegas y col, lograron identificar el 86,6 % de los alelos investigando cinco mutaciones [IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110, CD39 y CD8/9 (+G)].

En nuestro estudio, la mutación más frecuente se correspondió con el CD39, la cual fue identificada en el 57,4 % de los alelos. Esta también resultó ser la mutación más frecuente en Italia, España, Francia y Portugal.

La segunda mutación en importancia correspondió a la IVS I-110 que representó el 22,1 % del total identificado siendo ésta la segunda en importancia también en Italia y Francia (23,2 y 25,7 % respectivamente), no así en España y Portugal donde la IVS I-6 (15,5 %) y la IVS I-1 (32,9 %) ocuparon el segundo lugar respectivamente. Cabe destacar que la frecuencia de la mutación IVS I-6 que representa el 10,3 % en Italia y el 15,5 % en España, en este estudio fue hallada sólo en el 2,5 % de los casos.

El resto de mutaciones encontradas, IVS I-1 (4,9 %), IVS II-1 (1,6%) e IVS II-745 (4,1 %), representó el 10,6 %.

Este estudio viene a confirmar que a pesar de la elevada heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia, un grupo de mutaciones, relativamente pequeño, es el responsable de la mayoría de los casos de  $\beta$ -talasemia en nuestra área, y su incidencia, en general, superponible con las descritas en otros países de la cuenca Mediterránea, teniendo fundamentalmente en cuenta los datos publicados por Italia ya que el origen de nuestros pacientes fue 89,3% italianos, 9,8 % españoles y 0.9 % griego.

Si comparamos nuestros datos con los publicados por nuestro país, vemos que Varela y col logró identificar en una población de Bs. As. de origen Mediterráneo, el 90 % (similar a nuestro porcentaje) de los alelos talasémicos estudiando cuatro mutaciones (CD39, IVS-I-nt

110, IVS-I-nt 6 y IVS-I-nt 1). Estos mismos autores cuando posteriormente estudiaron las mismas seis mutaciones que buscamos en nuestro trabajo lograron también identificar el 90 % de sus 109 portadores beta talasémicos. Si bien las mutaciones más frecuentes resultaron ser CD39 (39,45 %) e IVS-I-nt-110 (23,85 %), el porcentaje de la primera fue distinto del nuestro probablemente debido a una mayor proporción de descendientes del norte de Italia presentes en nuestra población. La misma consideración puede hacerse con respecto a los valores de las mutaciones más predominantes publicados por Soria y col en una población de Córdoba.

Nuestra mayor concordancia es con el trabajo publicado por Roldán y col. que en una población de Bs. As, encontraron que los cuatro defectos más comunes (CD 39, 47%; IVS-I nt 110, 22,4%; IVS-I nt 1, 9,4% y IVS-I nt 6, 5,9%) se detectaron en el 84,7% de los alelos talasémicos.

Debido a que no fue posible poner de manifiesto la mutación en el 7,4 % de los casos y a la gran variedad de asociaciones  $\beta$ -talasemia y hemoglobinopatías concluimos de la complejidad del estudio molecular en nuestros pacientes con  $\beta$ -talasemia. Por ello los estudios de Biología Molecular son trascendentales para dar el adecuado consejo genético y establecer el diagnóstico prenatal.

Entre los pacientes en los que no se pudo detectar la mutación responsable del fenotipo  $\beta$  talasémico se hallaron cuatro hombres, cuatro mujeres y un niño.

Todos eran de origen italiano, excepto uno, griego.

Todos presentaron fenotipo hematológico dentro de lo esperado para pacientes portadores de  $\beta$  talasemia.

Los niveles de Hb A2 estuvieron por encima del 4% y los de Hb F por debajo del 5%.

Los valores del metabolismo férrico y de ferritina sérica fueron normales.

Cuando se estudiaron por PCR-ARMS las seis mutaciones anteriormente mencionadas, todos presentaron banda de amplificación con el oligonucleótido normal, no así con el mutado.

Ningún paciente presentó asociación con alfa talasemia (deleción 3,7 kb) ni con triplicación de genes alfa (alfa alfa alfa anti 3,7 kb).

En estos casos sería necesario investigar la presencia de mutaciones muy poco frecuentes en nuestro medio (menos del 2 %) o proceder a la secuenciación del gen beta.

También tener en cuenta que hay estudios poblacionales que han mostrado que aproximadamente el 1% de los genes beta talasémicos en el mundo permanecen sin caracterizar a pesar de un exhaustivo análisis de los genes  $\beta$  globina incluyendo las regiones flanqueantes. Se ha postulado que en estos casos la mutación puede ser hallada en el *upstream*  $\beta$  LCR o en la región *enhancer* 700-1000 pb 3' del gen  $\beta$  globina. Sin embargo, en varias familias, análisis de ligamiento, demostraron que el fenotipo  $\beta$ -talasémico se segrega independientemente del *cluster*  $\beta$  globina, implicando que la determinante genética puede actuar en *trans*.

Para el estudio comparativo de los genotipos talasémicos  $\beta^0$  y  $\beta^+$  en hombres, mujeres  $\leq 50$  años y  $>$  de 50 años y niños, se aplicó la técnica de Análisis de la Variancia a dos criterios de clasificación (Talasemia y grupo) para seis variables de interés, correspondiente a un diseño no balanceado dado que los tamaños de las muestras eran diferentes para las combinaciones de Talasemia y Grupo, mientras que para el estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados se utilizó la técnica Análisis de la Variancia a un criterio de clasificación para cinco variables de interés correspondiente a un diseño balanceado.

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que los promedios de GR Hb, y Hto para hombres y mujeres mayores de 50 años son iguales y significativamente mayores que los promedios de los GR de las mujeres menores de 50 años y niños, los cuales no difieren, el promedio de VCM y HCM para niños es significativamente menor que para las mujeres menores de 50 años, siendo estos dos grupos los únicos que difieren entre sí.

También se concluye que el promedio de Hb A2 para los niños es significativamente mayor que para las mujeres mayores de 50 años, siendo estos dos grupos los únicos que difieren entre sí.

En lo que respecta a la Hb F no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos de talasemia ni entre grupos en estudio.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de cada una de las variables estudiadas para las seis mutaciones consideradas.

Existen diferencias levemente significativas ( $p < 0,10$ ) entre los valores promedios de HCM para las distintas mutaciones consideradas.

Al aplicar comparaciones múltiples de Newman-Keuls para el 10% se concluye que el promedio de HCM para el genotipo  $\beta^+$  I-6 es marginalmente superior que para el genotipo  $\beta^+$  II-745, no existiendo diferencias significativas entre los restantes cuatro genotipos estudiados.

Las diferencias fenotípicas en portadores talasémicos que presentan la misma mutación se observaron en:

1. Asociación con  $\alpha$  talasemia (delección  $-\alpha 3,7$ ): el fenotipo hematimétrico en los pacientes que presentan rasgo beta talasémico asociado con alfa delección heterocigota tiende a normalizarse.
2. Asociación con triplicación de genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha$  anti 3,7): el fenotipo hematimétrico de los pacientes que presentan rasgo beta talasémico asociado con

alfa triplicación se desvía por debajo de los valores esperados para un portador de  $\beta$  talasemia.

3.  $\delta\beta$  talasemia: en el caso del portador de  $\delta\beta$  talasemia en que se encontró la mutación  $\beta^0 39$  el fenotipo hematológico fue similar a los portadores  $\beta$  talasémicos. El estudio convencional de hemoglobinas fue distinto al característico del portador  $\beta$  talasémico.
4. Doble heterocigosis  $\beta^0 39$  / Hb S: en este caso se observaron diferencias tanto en el fenotipo hematológico cuanto en el estudio convencional de hemoglobinas.
5. Asociación con otra mutación para  $\beta$  talasemia: en nuestro único caso, la doble heterocigosis para  $\beta$  talasemia dio lugar a un paciente con anemia de Cooley.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Haden, R.L. (1932) Arch of Int Med.. 49, 1032.
2. Lehninger, A.L. (1985) Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª Edición. Ed Omega, S.A. 151-176.
3. Neurath, H. (1964) The proteins. 3ª Edición.. Academic Press, Inc. Nueva York. 222-245.
4. Bailey, J.L. (1967) Techniques of protein chemistry. 2ª Edición. American Elsevier Publishing Company, Nueva York. 189-207.
5. Blackburn, S. (1968) Amino acid determination.. 2ª Edición. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 109-126.
6. Spackman, D.H. Stein, V.M. Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal Chem. 30, 1.190-1.206.
7. Wilson, H.R. (1966) Diffraction of X-rays by protein, nucleic acids and viruses. 2ª Edición. St Martin's, Nueva York. 303-345.
8. Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative affects in haemoglobin. Nature. 228, 726-734.
9. Bunn, H.F. Forget, B.G. (1986) Hemoglobin: Molecular genetic and clinical aspects. 2ª Edición. WB Saunders Company, Philadelphia. 234-276.
10. Michelson, A.M. (1963) The chemistry of nucleosides and nucleotides. 2ª Edición. Academic Press, Nueva York. 442-453.
11. Beadle, G.W. Tatum, E.L. (1941) Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. Proc Natl Acad Sci USA. 27, 499-506.
12. Pauling, L. Italo, H.A. Singer, S.J. Wells, I.C. (1949) Sickle cell anemia: A molecular disease. Science. 110, 543-548.
13. Zamenhof, S. Brawennan, G. Chargaff, E. (1952) Biochim Biophys Acta. 9, 402.
14. Wilkins, N.M.F. Randall, J.T. (1953) Biochim Biophys Acta. 10, 192.

15. Watson, J.D. Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171, 737-738.
16. Ingram, V.M. (1957) Gene Mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature*. 180, 326-328.
17. Hurwitz, J. Bresler, A. Diring, R. (1960) The enzymatic incorporation of ribonucleotides into polyribonucleotides and the effect of DNA. *Biochem Biophys Res Comm.* 3, 15.
18. Smith, H.O. Wilcox, K.W. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae* I. Purification and general properties. *J Mol Biol.* 51, 379-391.
19. Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*. 226, 1.209-1.211.
20. High, K.A. Benz, E.J. (1985) The ABCs of molecular genetics: A haematologist's introduction. In: *Recent advances in haematology*. Ed. Hoffbrand AV. Churchill Livingstone. Edinburgh. 265-288.
21. Temin, H. Mizutani, K. (1970) RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma virus. *Nature*. 226, 1.211-1.215.
22. Cohen, S. Chang, A. Boyer, H. Helling, R. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 70, 3.240-3.244.
23. Deisseroth, A. Nienhuis, A. Tumer, P. Velez, R. Anderson, W.F. Ruddle, F. Lawrence, J. Creagan, R. Kuckeriapati, R. (1977) Localization of the human  $\beta$ -globin structural gene chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization. *Cell*. 12, 205-208.
24. Deisseroth, A. Nienhuis, A. Lawrence, J. Gues, R. Tumer, P. Ruddle, F.H. (1978) Chromosomal localization of human  $\beta$  gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75, 1.456-1.460.

25. Orkin, S.H. Kazazian, H.H. (1984) The mutation and polymorphism of the human globin gene and its surrounding DNA. *Annu Rev Genet.* 18, 131-139.
26. Jeffreys, A.J. Flavell, R.A. (1977) The rabbit  $\beta$ -globin gene contains a large insert in the coding sequence. *Cell.* 12, 1.097-1.108.
27. Tilahman, S.M. Tiermeier, D.C. Seidman, J.G. Peterlin, B.M. Sullivan, M. Maijel, J.V. Leder, P. (1978) Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse  $\beta$ -globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75, 725-729.
28. Konkel, D. Tilghinan, S.M. Leder, P. (1978) The sequence of the chromosomal mouse  $\beta$ -globin major gene: Homologies in capping, splicing and poly(A) sites. *Cell.* 15, 1.125-1.132.
29. Sanger, F. Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 94, 441-448.
30. Maxam, A.M. Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74, 560-564.
31. Sanger, F. Nicklen, S. Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74, 5.463-5.467.
32. Orkin, S.H. Kazazian, H.H.Jr. Antonarakis, S.E. Goff, S.C. Boehm, C.D. Sexton, J.P. Waber, P.G. Giardina, P.J.V. (1982) Linkage of  $\beta$ -thalassaemic mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Nature.* 296, 627-631.
33. Saiki, R.K. Scharf, S.J. Faloona, F. Mullis, K.B. Horn, G.T. Erlich, H.A. Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230, 1.350-1.353.

34. Mullins, K.B. Faloona, F.A. Scharf, S.J. Hom, G.T. Erlich, H.A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 51, 263-273.
35. Tabor, S. Richardson, C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA. 84, 767-4.711.
36. Wong, C. Dowling, CE. Saiki, R.K. Higuchi, R.G. Erlich, H.A. Kazazian, H.H.Jr. (1987) Characterization of  $\beta$ -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature. 330, 384-386.
37. Engelke, D.R. Hoener, P.A. Collins, F.S. (1988) Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 85, 544-548.
38. Guyer, R.L. Koshland, D.E. (1989) The molecule of the Year. Science. 246, 1.543-1.546.
39. Cooley, T.B. Lee, P. (1925) Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. Trans Am Pediatr Soc. 37, 29-35.
40. Silvestroni, E. Bianco, I. (1975) Screening for microcytemia in Italy: Analysis of data collected in the past 30 years. Am J Hum Genet. 27, 198-212.
41. Marengo Rowe, A.J. (1965) Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. J Clin Pathol. 18, 790-792.
42. Weatherall, D.J. Clegg, J.B. Naughton, M.A. (1965) Globin synthesis in thalassaemia: An in vitro study. Nature. 208, 106-108.
43. Clegg, J.B. Naughton, M.A. Weatherall, D.J. (1966) Abnormal human hemoglobins. Separation and characterization of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains by chromatography and determination of two variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). J Mol Biol. 19, 91-108.

44. Chang, J.C. Kan, Y.W. (1979)  $\beta^0$ -thalassaemia, a nonsense mutation in man. Proc Natl Acad Sci USA. 76, 2.886-2.889.
45. Adams, J.G. Steinberg, M.H. Boxer, L.A. Baehner, R.L. Forget, B.G. Tsistrakis, G.A. (1979) The structure of hemoglobin Indianapolis ( $\beta$ 112(G14)Arginine). An unstable variant detectable only by isotopic labelling. J Biol Chem. 254, 3.479-3.482.
46. Olivieri, N.F. (1999) The  $\beta$ -thalassemias. The New England Journal of Medicine. 341, 99-109.
47. Trecartin, R.F. Liebhaber, S.A. Chang, J.C. Lee, K.Y. Kan, Y.W. Furbetta., M. Angius, A. (1981) Cao A.  $\beta$ -thalassaemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. J Clin Invest. 68, 1.012-1.017.
48. Spritz, R.A. Jagadeeswaran, P. Chudary, P.V. Biro, P.A. Elder, J.T. de Riel, J.K. Mardey, J.L. Forget, B.G. Weissman, S.M. (1981) Base substitution in an intervening sequence of a  $\beta^+$ -thalassaemic human globin gene. Proc Natl Acad Sci USA 78, 2.455-2.459.
49. Westway, D. Williamson, R. (1981) An intron nucleotide sequence variant in a cloned  $\beta^+$ -thalassaemia globin gene. Nucleic Acids Res. 9, 1.777-1.788.
50. Kazazian, H.H.Jr. Orkin, S.H. Boehm, C.D. Sexton, J.P. Antonarakis, S.E. (1983)  $\beta$ -thalassaemia due to deletion of the nucleotide which is substituted in the  $\beta^s$ -globin gene. Am J Hum Genet. 35, 1.028-1.033.
51. Kazazian, H.H.Jr. (1990) The thalassaemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. Semin Hematol. 27, 209-228.
52. Huehns, E.R. Dance, N. Beaven, G.H. Keil, I. Hecht, F. Motulsky, A.G. (1964) Human embryonic haemoglobins. Nature. 201, 1.095-1.097.

53. Capp, G.L. Rigas, D.A. Jons, R.T. (1970) Evidence for a new haemoglobin chain. *Nature*. 288, 278-280.
54. Randhawa, Z.I. Jones, R.T. Lie-Injo, L.E. (1984) Human Hemoglobin Portland II isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. *J Biol Chem*. 259, 7.325-7.330.
55. Hech, F. Motulsky, A.G. Lemire, R.J. Shepard, T.E. (1966) Predominance of hemoglobin Gower I in early human embryonic development. *Science*. 152, 91-92.
56. Pataryas, H.A. Stamayannopoulos, G. (1972) Hemoglobins in human fetuses: Evidence for adult hemoglobin production after the 11<sup>th</sup> gestational week. *Blood*. 39, 688-696.
57. Higgs, D.R. (1993) The thalassaemia syndromes. *Q J M*. 86, 559-564.
58. Bunn, H.F. (1987) Subunit assembly of hemoglobin: An important determinant of hematologic phenotype. *Blood*. 69, 1-6.
59. Kunkel, H.G. Ceppellini, R. Mueller-Eberhard, V. Wolf, J. (1957) Observations on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassemia. *J Clin Invest*. 36, 1.615.
60. Hsu, S-L. Marks, J. Shaw, J-P. Tam, M. Higgs, D.R. Shen, C.C. Shen, C-K.J. (1988) Structure and expression of the human  $\beta$ -globin gene. *Nature*. 331, 94-99.
61. Higgs, D.R. Vickers, M.A. Wilkie, A.O.M. Pretorius, M. Jarman, A..P. Weatherall, D.J. (1989) A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Blood*. 73, 1.081-1.104.
62. Shen, S.H. Slightom, J.L. Smithies, O. (1981) A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell*. 26, 191-203.
63. Powers, P.A. Altay, C. Huisman, T.H.J. Sraithies, O. (1984) Two novel arrangements of the human fetal globin genes  $\gamma^G$ - $\gamma^G$  and  $\gamma^A$ - $\gamma^A$ . *Nucleic Acids Res*. 12, 7.023-7.034.

64. Baglioni, C. (1962) The fusion of two peptides chains in the hemoglobin Lepore and its interpretations as a genetic deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 48, 1.880-1.885.
65. Dierks, P. van Ooyen, A. Cochran, M.D. Dobkin, C. Reiser, J. Weissmarin, C. (1983) Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit  $\beta$ -globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell*. 32, 695-706.
66. Myers, R.M. Till, K. Maniatis, T. (1986) Fine structure genetic analysis of a  $\beta$ -globin promoter. *Science*. 232, 613-618.
67. Efstratiadis, A. Posakony, J.W. Maniatis, T. Lawn, R.M. O'Connell, C. Spritz, R.A. DeRiel, J.K. Forget, B.G. Weissman, S.M. Slightom, J.L. Blechl, A.E. Sraithies, O. Baralle, F.E. Shoulders, C.C. Proudfoot, N.J. (1980) The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin genes family. *Cell*. 21, 653-668.
68. Leder, P. Hansen, J.N. Konkel, D. Leder, A. Nishioka, Y. Talington, C. (1980) Mouse globin system: A functional and evolutionary analysis. *Science*. 209, 1.336-1.339.
69. Shapiro, M.B. Senapathy, P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*. 15, 7.155-7.174.
70. Breathnach, R. Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann Rev Biochem*. X, 349-383.
71. Heaton, W.A. (1980) The relationship between coding sequences and function in haemoglobin. *Nature*. 284, 183-188.
72. Forrester, W.C. Thompson, C. Elder, J.T. Groudine M. (1986) A developmentally stable chromatin structure in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83, 1.359-1.363.

73. Grosveld, F. van Assendelft, G.B. Greaves, D.R. Kollias, G. (1987) Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell*. 51, 975.
74. Townes, T.M. Behringer, R.R. (1990) Human globin locus activation region (LCR): Role in temporal control. *Trends Genet.* 6, 219-223.
75. Andrews, N.C. Orkin, S.H. (1994); Transcriptional control of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 1, 119-124.
76. Stamatoyannopoulos, G. Nienhuis, A.W. (1994) Hemoglobin switching. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 2<sup>a</sup> Edición. Ed. WB Saunders Company, Philadelphia. 256-278.
77. Orkin, S.H. (1992) GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 80, 575-581.
78. Andrews, N.C. Erdjument-Bromage, H. Davidson, M.B. Tempst, P. Orkin, S.H. (1993) Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. 362, 722-728.
79. Lodish, H.F. (1976) Translational control of protein synthesis. *Annu Rev Biochem.* 45, 39-59.
80. Proudfoot, N. (1982) The end of the message. *Nature*. 298, 516-517.
81. Marbaix, G. Huez, G. Burny, A. Clenter, Y. Hurbert, E. Leciercq, M. Chantrenne, H. Soreq, H. Nudel, U. Littaner, U.Z. (1975) Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72, 3.065-3.069.
82. Padgett, R.A. Konarska, M.M. Grabowski, P.J. Hardy, S.F. Sharp, P.A. (1984) Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science*. 225, 898-903.

83. Ruskin, B. Krainer, A.R. Maniatis, T. Green, M.R. (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structures during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell*. 38, 317-331.
84. Hunt, D.M. Higgs, D.R. Old, J.M. Clegg, J.B. Weatherall, D.J. Marsh, G.W. (1980) Determination of  $\alpha$ -thalassaemia phenotypes by messenger RNA analysis. *Br J Haematol*. 45, 53-64.
85. Choi, O.R. Engel, J.D. (1986) A 3' enhancer is required for temporal and tissue-specific transcriptional activation of the chicken adult  $\beta$ -globin gene. *Nature*. 323, 731-734.
86. Wieringa, B. Meyer, F. Reiser, J. Weissmann, C. (1986) Unusual splice revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit  $\beta$ -globin gene. *Nature*. 301, 38-43.
87. Hardison, R.C. Chui, D.H. Rienmer, C.R. Miller, W. Carver, M. Molchanova, TP. Efremov, G.D. Huisman, T.H. (1998) Access to a syllabus of human hemoglobin variants (1996) via the World Wide Web. *Hemoglobin*. 22, 113-27.
88. Liebhaber, S.A. (1989)  $\alpha$ -thalassaemia. *Hemoglobin*. 13, 685-731.
89. Hsia, Y.E. Yuen, J. Hunt, J.A. Rattamanasay, P. Hal, J. Takaesu, N. Titus, E.A. Fujita Ford, C.A. (1988) The different types of  $\alpha$  thalassaemia: Practical and genetic aspect. *Hemoglobin*. 12, 465-484.
90. Kattamis, C. Metaxotou-Mavromati, A. Wood, W.G. Nash, J.R. Weatherall, D.J. (1979) The heterogeneity of normal HbA<sub>2</sub>  $\beta$ -thalassaemia in Greece. *Br J Haematol*. 42, 109-123.
91. Schwartz, E. (1969) The silent carrier of  $\beta$ -thalassaemia. *N Engl J Med*. 281, 1.327-1.333.
92. Wainscoat, J.S. Thein, S.L. Weatherall, J.D. (1987) The thalassaemia intermedia. *Blood Rev*. 1, 273-279.

93. Leoni, GB. Rosatelli, C. Vitucci, A. Addis, M. Loi, A. Tannoia, N. Cao, A. (1991) Molecular basis of  $\beta$ -thalassaemia intermedia in a southern Italian region (Puglia). *Acta Haematol.* 86, 174-178.
94. Galanello, R. Ruggeri, R. Paglietti, E. Addis, M. Melis, M.A. Cao A. (1991) A family with segregating triplicated  $\alpha$  globin loci and  $\beta$ -thalassaemia. *Blood.* 62, 1.035-1.040.
95. Thein, S.L. Al-Hakin, I. Hoffbrand, A.V. (1984) Thalassaemia intermedia. A new molecular basis. *Br J Haematol.* 56, 333-337.
96. Thein, S.L. (1992) Dominant  $\beta$ -thalassaemia. Molecular basis and pathophysiology. *Br J Haematol.* 80, 273-277.
97. Villegas, A. Pérez-Cloucell, C. Sánchez, J. Sal del Río, E. (1992) A new case of thalassaemia intermedia: Interaction of a triplicated  $\alpha$ -globin locus and thalassaemia trait. *Hemoglobin.* 16, 99-101.
98. Villegas, A. Muñoz, J.A. Risueño, C.F. Castro, J.M. Sánchez, J. Roperio, P. González, F.A. (1997) Asociación de  $\alpha$  y  $\beta$  talasemia con triplicación de genes  $\alpha$  en una misma familia. *Med Clin (Barc).* 108, 781-783.
99. Melis MA; Galanello R; Cao A.  $\alpha$ -globin gene analysis in a Sardinian family with interacting  $\alpha$  and  $\beta$  thalassaemia genes. *Br J Haematol* 1983, 53: 667-671.
100. Wainscoat, J.S. Kanavakis, E. Wood, W.G. Letsky, E.A. Huehns, E.R. Marsh, G.W. Higgs, D.R. Clegg, J.B. Weatherall, D.J. (1983) Thalassaemia intermedia in Cyprus: The interaction of  $\alpha$  and  $\beta$  thalassaemia. *Br J Haematol.* 53, 411-416.
101. Thomas, K.R. Capecchi, M.R. (1987) Site directed mutagenesis by genes targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51, 503-512.

102. Huang, S-Z. Xu, Y-H. Zeng, F-Y. Wu, D-F. Ren, Z-R. and Zeng, Y-T. (1991) A novel  $\beta$  thalassaemia mutation: Deletion of 4 bp (-AAAC) in the 5' transcriptional sequence. *Br J Haematol.* 78, 125-126.
103. Treisman, R. Proudfoot, N.J. Shander, M. Maniatis, T. (1982) A single base change at a splice site in a  $\beta^0$ -thalassaemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell.* 29, 903-911.
104. Treisman, R. Orkin, S.H. Maniatis, T. (1983) Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned  $\beta$ -thalassaemia genes. *Nature.* 302, 591-596.
105. Antonarakis, S.E. Orkin, S.H. Cheng, T-C. Scott, A.F. Sexton, J.P. Trusko, S. Charache, S. Kazazlan, H.H.Jr. (1984)  $\beta$ -thalassaemia in American blacks: Novel mutations in the TATA box and an acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81, 1.154-1.158.
106. Gilman, J.G. Huisman, T.H.J. (1985) DNA sequence variation associated with elevated fetal  $G\gamma$  globin production. *Blood.* 66, 783-787.
107. Miller, B.A. Olivieri, N. Salameh, M. Ahmed, M. Antognetti, G. Huisman, T.H. Nathan, D.G. Orkin, S.H. (1987) Molecular analysis of the high-hemoglobin-F phenotype in Saudi Arabian sickle cell anaemia. *N Engl J Med.* 316, 244-250.
108. Díaz-Chico, J.C. Yang, K.G. Stoming, T.A. Efremov, D.G. Kutlar, A. Kutlar, F. Aksoy, M. Altay, C. Gürsey, A. Kiliç, Y. Huisman, T.H.J. (1988) Mild and severe  $\beta$ -thalassaemia among homozygotes from Turkey: Identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood.* 71, 248-251.
109. Tamagnini, G.P. Lopes, M.C. Castanheira, M.E. Wainscoat, J.S. Wood, W.G. (1983)  $\beta^+$ -thalassaemia Portuguese type: Clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of  $\beta$  thalassaemia. *Br J Haematol.* 54, 189-200.

110. Lapoumeroulie, C. Pagnier, J. Bank, A. Labie, D. Krishnamoorthy, R. (1986)  $\beta$ -thalassaemia due to a novel mutation in IVS-1 sequence donor site consensus sequence creating a restriction site. *Biochem Biophys Res Commun.* 139, 709-713.
111. Kazazian, H.H.Jr. Orkin, S.H. Antonarakis, S.E. Sexton, J.P. Boehm, C.D. Goff, S.C. Waber, P.G. (1984) Molecular characterization of seven  $\beta$ -thalassaemia mutations in Asian Indians. *EMBO J.* 3, 593-596.
112. Goldsmith, M.E. Humphries, R.K. Ley, T. Cline, A. Kantor, J.A. Nienhuis, A.W. (1983) "Silent" nucleotide substitution in a  $\beta^+$ -thalassaemia globin gene activates splice in coding sequence RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80, 2.318-2.322.
113. Yang, K.G. Kutlar, F. George, E. Wilson, I.B. Kutlar, A. Stoming, T.A. González-Redondo, J.M. Huisman, T.H.J. (1989) Molecular characterization of  $\beta$ -globin gene mutations in Malay patients with Hb E-thalassaemia and thalassaemia major. *Br J Haematol.* 72, 73-80.
114. Orkin, S.H. Kazazian, H.H.Jr. Antonarakis, S.E. Ostrer, H. Goff, S.C. Sexton, J.P. (1982) Abnormal RNA processing due to the exon mutation of the  $\beta^E$ -globin gene. *Nature.* 300, 768-769.
115. Orkin, S.H. Antonarakis, S.E. Loukopoulos, D. (1984) Abnormal precessing of  $\beta^{\text{Knossos}}$  RNA. *Blood.* 64, 311-313.
116. Metherall, J.E. Collins, F.S. Pan, J. Weissman, S.M. Forget, B.G. (1986)  $\beta^0$ -thalassaemia caused by a base substitution that creates an alternative splice acceptor site in an intron. *EMBO J.* 5, 2.551-2.557.
117. Cheng, T. Orkin, S.H. Antonarakis, S.E. Potter, M.J. Sexton, I.P. Giardina, P.J.V. Li, A. Kazazian, H.H.Jr. (1984)  $\beta$ -thalassaemia in Chinese: Use of in vivo RNA analysis and

- oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects. Proc Natl Acad Sci USA. 81, 2.821-2.825.
118. Dobkin, C. Pergolizzi, R.G. Bahre, P. Bank, A. (1984) Abnormal splice in a mutant  $\beta$ -globin gene not at the site of a mutation. Proc Natl Acad Sci USA. 80, 1.184-1.188.
119. Jankovic, L. Efremov, G.D. Josifvska, O. Juricic, D. Stoming, T.A. Kutiar, A. Huisman, T.H.J. (1990) An initiation codon mutation as a cause of a  $\beta^0$  thalassaemia. Hemoglobin. 14, 169-176.
120. Hattori, Y. Yarnashiro, Y. Ohba, Y. Miyaji, T. Morishita, M. Yamamoto, Ku. Yamamoto, Ki. Narai, S. Kimura, A. (1991) A new  $\beta$ -thalassaemia mutation (initiation codon ATG→GTG) found in the Japanese population. Hemoglobin. 15, 317-325.
121. Amselem, S. Nunes, V. Vidaud, M. Estivill, X. Wang, C. d'Auriol, L. Vidaud, D. Galibert, F. Baiget, M. Goossens, M. (1988) Determination of the spectrum of  $\beta$  thalassaemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified  $\beta$ -globin DNA. Am J Hum Genet. 43, 94-100.
122. Beris, P. Darbellay, R. Extermann, P. (1995) Prevention of  $\beta$ -thalassaemia major and Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. Semin Hematol. 32, 244-261.
123. Ropero, P. Sánchez, J. González, F.A. Armada, B. Benito, A. Caldeira, A. Martín, G. Villegas, A. (1994) Heterogeneidad molecular de la  $\beta$  talasemia. Sangre (Barc). 39, 365-368.
124. Villegas, A. Ropero, P. González, F.A. Armada, B. Martí, E. Carreño, M.D. Sánchez, J. (1996) Molecular heterogeneity of  $\beta$ -thalassaemia in a Spanish population from the area centre of Spain. Eur J Haematol. 57, 389-391.
125. Spritz, R.A. Orkin, S.H. (1982) Duplication followed by deletion accounts for the structure of an Indian deletion  $\beta$ -thalassaemia gene. Nucleic Acids Res. 10, 8.025-8.029.

126. Fearon, ER. Kazazian, H.H.Jr. Waber, P.G. Lee, J.I. Antonarakis, S.E. Orkin, S.H. Vanin, E.F. Henthom, P.S. Grosveld, F.G. Scott, A.F. Buchanan, G.R. (1983) The entire  $\beta$  globin gene cluster is deleted in a form of  $\gamma\delta\beta$ -thalassaemia. *Blood*. 61, 1.273-1.278.
127. Curtin, P. Pirastu, M. Kan, Y.W. Gobert-Jones, J.A. Stephens, A.D. Lehmann, H. (1985) A distant gene deletion affects  $\beta$ -globin gene function in an atypical  $\gamma\delta\beta$  thalassaemia. *J Clin Invest*. 76, 1.554-1.558.
128. Ottolenghi, S. Giglioni, B. Taramelli, R. Coni, P. Mazza, U. Saglio, G. Camaschella, C. Izzo, P. Cao, A. Galanello, R. Gimferrer, E. Baiget, M. Gianni, A.M. (1982) Molecular comparison of  $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin DNAs: Evidence of a regulatory area. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79, 2.347-2.351.
129. Kutlar, A. Gardiner, M.B. Headlee, M.G. Reese, A.L. Cleek, M.P. Nagle, S. Sukumaran, P.K. Huisman, T.H.J. (1984) Heterogeneity in the molecular basis of three types of hereditary persistence of fetal hemoglobin and the relative synthesis of the  $\gamma^G$  and  $\gamma^A$  types of chain. *Biochem Genet*. 22, 21-35.
130. Gelinas, R. Bender, M. Lotshaw, C. Waber, P. Kazazian, H.H.Jr. Stamatoyannopoulos, J.A. (1986) A Chinese Fetal Hemoglobin: C to T substitution at position -196 of the gene promoter. *Blood*. 67, 1.777-1.779.
131. Collins, F.S. Boehm, C. Waber, P.G. Stoeckert, C.J.Jr. Weissman, S.M. Forget, B.G. Kazazian, H.H.Jr. (1984) Concordance of a point mutation 5' to the  $\gamma^G$  globin gene with  $\gamma^G\beta^+$ . Hereditary persistence of fetal hemoglobin in the black population. *Blood*. 64, 1.292-1.296.
132. Semenza, G.L. Delgrosso, K. Poncz, M. Malladi, P. Schwartz, E. Surrey, S. (1984) The silent carrier allele:  $\beta$ -thalassaemia without a mutation in the  $\beta$ -globin gene or its immediate flanking regions. *Cell*. 39, 123-128.

133. Pacheco, P. Peres, M.J. Faustino, P. Pischedda, C. Gonçalves, J. Carvajales-Ramos, M. Seixas, T. Martins, M.C. Mot, P. Lavinia, J. (1995)  $\beta$ -thalassaemia unlinked to the  $\beta$  globin gene interacts with sickle-cell trait in a Portuguese family. *Br J Haematol.* 91, 85-89.
134. Duma, H. Efremov, G. Sadikario, K.A. Teodosijev, B. Miadenovski, B. Vlaski, R. Andreeva, M. (1968) Study of nine families with haemoglobin-Lepore. *Br J Haematol.* 15, 161-172.
135. Embury, S.H. Miller, J.A. Dozy, A.M. Kan, Y.W. Chan, V. Todd, D. (1980) Two different molecular organizations account for the single  $\alpha$ -globine gene of the  $\alpha$ -thalassaemia-2 genotype. *J Clin Invest.* 66, 1319-1325.
136. Higgs, D.R. Old, J.M. Pressley, L. (1980) A novel  $\alpha$ -globine gene arrangement man. *Nature.* 284, 632- 635.
137. Higgs, D.R. Hill, A.V.S. Bowden, D.K. (1984) Independent recombination events between duplicated human  $\alpha$ -globine genes: implications for their concerted evolution. *Nucl Acids Res.* 12, 6965- 6968.
138. Kattamis, A.C. Camaschella, C. Sivera, P. Surrey, S. Fortina, P. (1996) Human  $\alpha$ -Thalassaemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. *Am J Hematol.* 53; 81- 91.
139. Chen, H. Lowrey, C.H. Stomatoyannopoulos, G. (1997) Analysis of enhancer function of the HS-40 core sequence of the human  $\alpha$ -globin cluste. *Nucl Acids Res.* 25; 2917- 2922.
140. Flint, J. Hill, A.V. Bowden, D.K. Oppenheimer, S.J. Sill, P.R. Serjeantson, S.W. Bana Koiri, J. Bhatia, K. Alpers, M.P. Boyce, A.J. (1986) High frequencies of  $\alpha$ -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature.* 321, 744-750.
141. Huang, S. Wong, C. Antonarakis, S.E. Ro-lien, T. Lo, W.H. Kazazian, H.H.Jr. (1986) The same "TATA" box  $\beta$ -thalassaemia mutation in Chinese and US Blacks: Another example of independent origins of mutation. *Hum Genet.* 74, 162-164.

142. Wong, C. Antonarakis, S.E. Goff, S.C. Orkin, S.H. Boehm, C.D. Kazazian, H.H.Jr. (1986) On the origin and spread of  $\beta$ -thalassaemia: Recurrent observation of four mutations in different ethnic groups. Proc Natl Acad Sci USA. 83, 6.529-6.532.
143. Cabrera, A. de Pablos, I.M. (1984)  $\beta$ -thalassaemia minor in gypsies from the South of Spain. Br J Hematol. 58, 377.
144. Colombo, B. Martínez, G. (1983). Hemoglobinopatías en América tropical. Hematología de las áreas tropicales. Clínica Hematológica. 9/3. Salvat. Barcelona. 133-136.
145. Varela, B. Abreu, M. Detección de alelos  $\beta$  talasémicos por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (1995) Actas del XII Congreso Argentino de Hematología. Noviembre de 1995. Pinamar. Argentina.
146. Perez, S. Bragós, I. Noguera, N. Acosta, I. Lanza, O. Davoli, R. Milani A. (1999). Actas del XIV Congreso Argentino de Hematología. Noviembre de 1999. Mar del Plata. Argentina.
147. Dacie, J.V. Lewis, S.M. (1970) Hematología Práctica. 2ª Edición. Ed. Toray, Barcelona. 145-146.
148. Bessis, M. (1954) Traité de citologie sanguine. 1ère Edition. Masson et Cie, Paris. 178-188.
149. Evatt, B. L. (1986) Anemia: hematología para un diagnóstico básico. Organización Panamericana de la Salud. Whashington. Nº 14, 112- 113.
150. ICSH (1978) Total Iron Binding Capacity. British Journal of Hematology. 38, 281-287.
151. van Suijlen, J.D. van Noord, P.C. Leijnse, B. (1990) Accuracy of serum ferritin determinations in tissue preparations and human serum. J Clin Chem Biochem. 28, 43-48.

152. Efremov, G.D. Huisman, T.H.J. (1976). Diagnóstico de laboratorio de las hemoglobinopatías En: Hemoglobinas anormales, Clínica Hematológica 2/2. D.J Weatherall. Salvat, Barcelona. 156-186.
153. Milner, P.F. Gooden, H.M. (1975) Rapid citrate-agar alectrophoresis in routine screening for hemoglobinopathies using a simple hemolysate. Am. J. Clin. Pathol. 64, 58-64.
154. International Committee for Standardization in Hematology (1978) Recommendations for selected methods for cuantitative estimation of Hb A<sub>2</sub> reference preparation. Br. J. Haematol. 38, 575-578.
155. Singer, K. Chernoff, A.I. Singer, L. (1951) Studies on abnormal hemoglobins. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood. 6, 413-428.
156. Papayannopoulou, T. Stomatoyannopoulos, G. (1974) Stains for inclusion bodies in the detection of hemoglobinopaties. (eds) Schmidt, R.N.I. Huisman, T.H.J. Lehmann, H. CRC Press, Cleveland, 32-38.
157. Carrell, R.W. & Kay, R. (1972). A simple method for the detection of unstable haemoglobins. British Journal of Haematology. 23, 615-619.
158. Daland, G:A: Castle, W:B: (1948). A simple and rapid method for demonstrating sickling of the red cells: The use of reducing agents. J Lab Clin Med. 33, 1082-1084.
159. Miller, S.A. Dykes, D.D. Polesky, H.F. (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nuclei Acids Res. 16, 1215.
160. Old, J.M. Varawalla, N.Y. Weatherall, D.J. (1990) Rapid detection and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the U.K. The Lancet. 336, 834-837.

161. Smetanina, N.S. Huisman, T.H.J. (1996) Detection of Common Deletion  $\alpha$ -Thalassemia-2 Determinants by PCR. *Am J Hematol.* 53, 202-203.
162. Steel, R. Torril, J. (1985). *Bioestadística: principios y procedimientos*. Mc Graw-Hill. Latinoamericana, S.A. 2<sup>da</sup> Edición, Bogotá, Colombia. 177-197.
163. Montgomery, D. (1991). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley and Sons, 2<sup>nd</sup> Edition, New York. 202-234.
164. Britenham, G.M. (2000). *Disorders of Iron Metabolism: Iron Deficiency and Overload*. En: *Hematology. Basic Principles and Practice*. 3<sup>rd</sup> Edition. Churchill Livingston. Philadelphia, Pennsylvania. 397-428.
165. Barrai, I. Vullo, C. (1980) Assessment of prospective genetic counselling in the Ferrara area. *Am J Med Genet.* 6, 195-204.
166. Rosatelli, M.C. Tuveri, T. Scalas, M.T. Leoni, G.B. Sardu, R. Faà, V. Meloni, A. Pischedda, M.A. Demurtas, M. Monni, G. Cao, A. (1992) Molecular screening and fetal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia in the Italian population. *Hum Genet.* 89, 585-589.
167. Martins, C. Ramalho, A. Sonati, M. Gonçalves, M. Costa, F. (1993) Molecular characterisation of  $\beta$ -thalassemia in Brazil. *J Med Genet.* 30, 797-798. Weatherall, D.J. (1986) *The thalasseмии, molecular pathogenesis*. *Hemoglobin: Molecular genetic and clinic aspects*. Ed Bunn, H.F. Forget, B.G. WB Saunders Company, Philadelphia. 395-419.
168. Villegas, A. Roperro, P. Gonzalez, F.A. Anguita, E. Espinos, D. (2001) The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 25, 273-83.
169. Kulozik, A.E. (1992)  $\beta$ -thalassaemia: molecular pathogenesis and clinical variability. *Eur J Pediatr.* 151, 78-84.

170. Ribeiro, M.L. Gonçalves, P. Cunha, E. Bento, C. Almeida, H. Pereira, J. Martín Nuñez, G. Tamagnini, G.P. (1997) Genetic heterogeneity of  $\beta$ -thalassemia in populations of the Iberian Peninsula. *Hemoglobin*. 21, 261-269.
171. Benito, A. Villegas, A. Pérez-Cano, R. Bernal, R. (1996)  $\beta$ -thalassemia in South-western Spain: High frequency of G→A (IVSI-1) mutation. *Br J Haematol*. 92, 336-338.
172. Rosatelli, M.C. Dozy, A. Faà, V. Meloni, A. Sardu, R. Saba, L. Kan, Y.W. Cao, A. (1992) Molecular Characterization of  $\beta$ -thalassemia in the Sardinian Population. *Am J Hum Genet*. 50, 422-426.
173. Di Marzo, R. Dowling, C. Wong, C. Maggio, A. Kazazian, H. Jr. (1998) The spectrum of  $\beta$ -thalassaemia in Sicily. *British Journal of Haematology*. 69, 193-397.
174. Varela, V. Abreu, S. Rossetti, L. Targovnik, H. (1996) Mutaciones  $\beta$ -talasémicas más frecuentes en la población argentina. *Sangre*. 41, 137-140.
175. Varela, V. Rossetti, L.C. Binaghi, A. Targovnik, H.M. Abreu, M.S. (1999) Molecular genetics of the thalasseмии in Argentina. *Sangre (Barc)*. 44, 210-5.
176. Soria, N. Tulián, C. Plassa, F. Roth, G. (1997)  $\beta$ -thalassemia and Hemoglobin types in Argentina: Determination of Most Frequent Mutations. *American Journal of Hematology*. 54, 160-163
177. Roldán, A. Gutiérrez, M. Cygler, A. Bonduel, M. Sciuccati, G. Feliú Torres, A. (1997) Molecular Characterization of  $\beta$ -thalassemia Genes in an Argentine Population. *American Journal of Hematology*. 54, 179-182.
178. Cao, A. Rosatelli, M.C. (1993) Screening and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. In: Higgs, D.R. Weatherall, D. J. (eds). *Balliere's. Clinical Haematology. The Haemoglobinopathies*, vol 6, London. Ballière Tindall. 263- 286.

179. Noguera, N. Tallano, C. Bragós, I. Milani, A. (2000) Modified Salting-Out Method for DNA Isolation From Newborn Cord Blood Nucleated Cells. *J Cl Lab Anal.* 14, 280-283.
180. Murru, S. Loudianos, G. Porcu, S. et al. (1992) A  $\beta$ -thalassaemia phenotype not linked to the  $\beta$ -globin cluster in an Italian family . *British Journal of Haematology.* 81, 283-287.
181. Pacheco, P. Pérez, M.J. Faustino, P. Gonçalves-Ramos, M. Seixas, T. Martins, M.C. Moi, P. Lavinha, J. (1995) Beta-thalassaemia unlinked to the beta-globin gene interacts with sickle-cell trait in a Portuguese family. *Br J Haematol.* 91, 85-9.
182. Ho, P.J. Thein, S.L. (2000) Gene regulation and deregulation: a beta globin perspective. *Blood Rev.* 14, 78-93.
183. Rosatelli, C. Leoni, G.B. Tuveri, T. Scalas, M.T. Mosca, A. Galanello, R. Gasperini, D. Cao, A. (1986) Heterozygous  $\beta$ -thalassemia; Relationship between the hematological phenotype and the type of  $\beta$ -thalassemia mutation. *Am J Hematol.* 39, 1-4.
184. Stefanis, L. Kanavakis, E. Traeger-Synodinos, J. Tzetis, M. Metaxotou-Mavromati, A. Katamis, C. (1994) Hematologic phenotype of the mutations IVS I nt 6 (T $\rightarrow$ C), IVS I-nt 110 (G  $\rightarrow$ A and CD39 (C $\rightarrow$ T) in carries of  $\beta$ -thalassaemia in Greece. *Pediatr Hematol Oncol.* 11, 509-17.
185. Altay, C. Gurgey, A. (1990)  $\beta$ -thalassemia intermedia in Turkey. *Ann NY Acad Sci.* 612, 81-89.
186. Rund, D. Filon, D. Strauss, N. Rachmilewitz, E.A. Oppenheim, A. (1992) Mean Corpuscular Volume of heterozygotes for  $\beta$ -thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood.* 79, 238-243.
187. Kutlar, A. Kutlar, F. Gu, L. Mayson, N. Huisman, T.H.J. (1990) Fetal hemoglobin in normal and  $\beta$ -Thalasemia heterozygotes. *Hum Genet.* 85, 106-110.

188. Galanello, R. Barella, S. Ideo, A. et al. (1994) Genotype of subjects with borderline HbA<sub>2</sub>: implication for beta thalassemia carrier screening. *Am J Hematol.* 46, 79-81.
189. Vrettou, C. Kanavakis, E. Traeger-Synodinos, J. Metaxatou-Mavrommati, A. Basiakos, I. Maragoudaki, E. Stomoulakatou, A. Papassotiriou, I. Kattamis, C. (2000) Molecular studies of beta thalassemia with raised Hb F levels. *Hemoglobin.* 24, 203-20.
190. Forget, B.G. (2000) Thalassemia Syndromes. En: *Haematology Basic Principles and Practice.* 3<sup>rd</sup> Edition. Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania. 485-510.
191. Weatherall, D.J. Clegg, J.B. (1981) *The thalassaemia syndromes* (3<sup>a</sup> ed) Oxford: Blakwell Scien Public Inc. 150-185.
192. Sampietro, M. Cazzola, P. Cappellini, M.D. Fiorelli, G. (1983) The triplicated  $\alpha$ -gene locus and heterozygous  $\beta$ -thalassaemia: A case of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* 55, 709-717.
193. Camaschella, C. Berero, M.T. Serra, A. Dall'Acqua, M. Gasparini, P. Trento, M. Vettore, L. Perona, G. Saglio, G. Mazza, U. (1987) A benign form of thalassaemia intermedia may be determined by the interaction of triplicated  $\alpha$  locus and hetrozygous  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol.* 66, 103-107.
194. Flint, J. Harding, R. Boyce, A. Clegg, J.B. (1998) The population genetic of the haemoglobinopathies. In: *Sicle Disease and Thalassaemia.* Rodgers, G.P. Ed: WB Saunders Company; London, England, Baillière's Clinical Haematology, Vol. 11, 53-89.
195. Noguera, N. Bragós, I. Milani, A. (2002) Prevalence of  $-\alpha^{3,7}$  Thalassemia in Argentina. *Hemoglobin.* 26:1 (in press).
196. Velati, C. Sampietro, M. Biassoni, M. Cappellini, M.D. Waisncoat, J.S. Higgs, D.R. Fiorelli, G. (1986)  $\alpha$  Thalassaemia in an Italian population. *Br J Haematol.* 63, 497-501.

197. Villegas, A. Ropero, P. Gonzalez, F.A. Anguita, E. Espinos, D. (2001) The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 25, 273-83.
198. Varela, V. Rossetti, L.C. Binaghi, A. Targovnik, H.M. Abreu, M.S. (1999) Molecular genetics of the thalasseмии in Argentina. *Sangre (Barc)*. 44, 210-5.
199. Bragós, I. Noguera, N. Morisoli, L. Milani, A. (2000) Most frequent mutations in  $\beta$ -thalassemia in a population in Rosario, Argentina. *Haematológica*. 85, 101-102.
200. Kanavakis, E. Metaxotou-Mavromati, A. Kattamis, C. Wainscoat, J.S. (1983) The triplicated  $\alpha$  gene locus and  $\beta$  thalassaemia. *British Journal of Haematology*. 54, 201-207.
201. Villegas, A. López Rubio, M. Sánchez, J. González, A. Pérez Clausell, C. Sal del Río, A. del Potro, E. Valverde, F. Espinos, D. (1993) The first case of thalassemia intermedia in Spain due to the interaction of 3 alpha genes with beta-thalassemia minor. *Rev Clin Esp*. 192, 268-70.
202. Traeger-Synodinos, J. Kanavakis, E. Vrettou, C. Maragoudaki, E. Michael, Th. Metaxotou-Mavromati, A. Kattamis, C. (1996) The triplicated alfa globin gene locus in beta thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *British Journal of Haematology*. 95, 467-471.
203. Akerman, B.R. Fujiwara, T.M. Lancaster, G.A. Morgan, K. Scriver, C.R. (1990) Identification of deletion and triple alpha-globin gene haplotypes in the Montreal beta-thalassemia screening program: implications for genetic medicine. *Am J Hematol*. 36, 76-84.
204. Bianco, I. Lerone, M. Foglietta, E. Deidda, G. Cappabianca, M.P. Morlupi, L. Ponzini, D. Grisanti, P. Di Biagio, P. Amato, A. Mezzabotta, M. Graziani, B. (1997) Phenotypes of individuals with a beta thal classical allele associated either with a beta thal silent allele or with alpha globin gene triplication. *Haematologica*. 82, 513-25

205. Vives Corrons, J.L. (1988) Hemoglobinopatías estructurales y talasemias. En: Hematología Clínica. Segunda edición. Ed. Doyma. 213-235.
206. Thein, S.L.  $\beta$ -Thalassaemia. En: Baillière's Clinical Haematology. The haemoglobinopathies 1993. Ed. Baillière Tindall. 91-126.
207. Tzetis, M. Traeger-Synodinos, J. Kanavakis, E. et al. (1992) The molecular basis of normal HbA<sub>2</sub> (type 2)  $\delta$ -thalassemia in greece. Human Genetics. 21, 74.
208. Ottolenghi, S. Giglioni, B. Taramelli, R. et al. (1987) Sardinian  $\delta\beta$ -thalassemia: A further example of a C to T substitution at position -196 of the  $\gamma$  globin gene promoter. Blood. 69, 1058.
209. Abreu, M. Rosetti, L. Basack, N. Targovnik, H. y Varela, V. (1999) Caracterización de ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup> talasemia por biología molecular. XIV Congreso Argentino de Hematología. Mar del Plata. Argentina. Octubre de 1999.
210. Schiliró, G. Samperi, P. Testa, R. Gupta, R.B. Gu, L-H. Huisman, T.H.J. (1992) Clinical, hematological and molecular features in Sicilians with Hb S- $\beta$ -thalassaemia. Am J Hematol. 41, 264.
211. Silvestroni, E. Bianco, I. Boll, I. (1994) Accad Med Roma. 70, 34.
212. Soria, N.W. Roth, G.A. (1996) First case of Hb S and  $\beta^0$ -Thalassemia detected in an argentinean girl. Hemoglobin. 20, 125-129.
213. Abreu, M.S. Peñalver, J.A. (1992) S hemoglobinopathies in Argentina. Medicina (B Aires). 52, 341-6.
214. Schroeder, W.A. Powars, D.R. Kay, L.M. et al. (1989)  $\beta$ -cluster haplotypes,  $\alpha$ -gene status, and hematological data from SS, SC, and S- $\beta$ -thalassemia patients in southern California. Hemoglobin. 13, 325-353.

215. Divoky, V. Baysal, E. Schilirò, G. Dibenedetto, S.P. Huisman, T.H. (1993) A mild type of Hb S-beta(+)-thalassemia [-92(C→ T)] in a Sicilian family. *Am J Hematol*, 42, 225-6.
216. Bashir, N. Barkawi, M. Sharif, L. (1992) Sickle cell/beta-thalassemia in North Jordan. *J Trop Pediatr*. 38, 196-8.