

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR III

E

INMUNOLOGÍA



**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN
SIMULTÁNEA DE LAS MUTACIONES MÁS
FRECUENTES DE LA β -TALASEMIA EN ESPAÑA.**

TESIS DOCTORAL

Tomás de Haro Muñoz

Granada, 2008



**D. JOSÉ ANTONIO GÓMEZ CAPILLA,
CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.**

CERTIFICA:

Que D. Tomás de Haro Muñoz, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES DE LA β -TALASEMIA EN ESPAÑA**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2008

Fdo. Prof. Dr. D. J. A. Gómez Capilla



**D^a. SONIA BLANCO MARTÍN, FACULTATIVO
ESPECIALISTA DE ÁREA DE BIOQUÍMICA
CLÍNICA. SERVICIO ANDALUZ DE SALUD.**

CERTIFICA:

Que D. Tomás de Haro Muñoz, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES DE LA β -TALASEMIA EN ESPAÑA**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2008

Fdo. Dra. D^a. S. Blanco Martín

Dedicado a mi Padre

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer expresamente la “*enorme paciencia y dedicación de mis directores de tesis*” Prof. Dr. D. José Antonio Gómez Capilla y Dra. Dña. Sonia Blanco Martín.

A los Hematólogos de mi Servicio por colaborar en la obtención de los datos clínicos de los pacientes estudiados, especialmente a la Dra. Dña. Esperanza Bonmati y al Dr. D. Ricardo Sola.

A Maria Dolores Llinares Moral por haber tenido paciencia mientras estaba dedicado a esta labor.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura, regulación genética y síntesis de hemoglobina.	4
1.1.1. Estructura de la hemoglobina.	4
1.1.2. Genes de la hemoglobina.	6
1.1.3. Síntesis de la hemoglobina.	9
1.2. Clasificación de las alteraciones genéticas de la hemoglobina	10
1.2.1. Variantes de hemoglobina.	12
1.2.2. Talasemias.	14
1.2.2.1. Alteraciones moleculares de las talasemias.	15
1.2.2.1.1. Mutaciones puntuales.	15
1.2.2.1.2. Deleciones.	17
1.2.2.1.3. Defectos en el intercambio de material	
genético durante la meiosis.	22
1.3. Incidencia y distribución geográfica.	23
1.4. Criterios diagnósticos.	25
1.4.1. Manifestaciones clínicas.	25
1.4.2. Diagnóstico de laboratorio.	35
1.5. Indicaciones terapéuticas.	41
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	47
3. MATERIAL Y MÉTODO.	51
3.1. Pacientes.	53
3.2. Extracción del DNA.	53
3.3. Análisis de las mutaciones en el gen HBB.	54
3.3.1. Obtención del amplicón.	54
3.3.2. Electroforesis en gel de agarosa.	57
3.3.3. Limpieza de los productos amplificados.	59
3.3.4. Detección SNaPSHOT.	59

3.3.5. Electroforesis capilar y detección fluorescente.	62
3.3.5.1. Preparación de los productos amplificados.	63
3.3.5.2. Preparación del equipo.	63
3.3.5.3. Programación de las muestras.	66
3.3.5.3.1. Hoja de muestras (“sample sheet”).	66
3.3.5.3.2. Lista de inyección.	67
3.3.5.4. Análisis de los resultados.	69
3.4. Determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.	70
4. RESULTADOS.	73
4.1. Análisis de las mutaciones en el gen HBB.	75
4.2. Pacientes.	90
5. DISCUSIÓN.	93
6. CONCLUSIONES.	109
7. BIBLIOGRAFÍA.	113

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las patologías asociadas a la molécula de hemoglobina se encuentran, posiblemente entre las alteraciones monogénicas (mendelianas) más relevantes para la especie humana. Se calcula que cada año nacen en todo el mundo más de 300.000 niños con formas graves de estas enfermedades, la mayoría de ellos en países de nivel de vida baja y media. Aproximadamente un 5% de la población mundial es portadora de alguna mutación asociada con hemoglobinopatía. El porcentaje de portadores puede alcanzar el 25% en algunas regiones (WHO Working Group, 1982).

Las hemoglobinopatías estructurales y las talasemias constituyen las alteraciones genéticas más frecuentes, lo que comporta uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial. Los movimientos migratorios que suceden en nuestro entorno favorecen la expansión de la prevalencia de estas patologías, tanto en sus formas heterocigotas, como en las homocigotas y dobles heterocigotas. En cada una de nuestras Áreas Sanitarias tienen un impacto diferente según las influencias migratorias a las que estén sometidas éstas.

1.1 ESTRUCTURA, REGULACIÓN GENÉTICA Y SÍNTESIS DE HEMOGLOBINA.

1.1.1. Estructura de la hemoglobina.

La hemoglobina es un tetrámero compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas diferentes unidas cada una de ellas a un grupo hemo. En los eritrocitos de un adulto normal el 97% de la hemoglobina total está formada por hemoglobina A₁ ($\alpha_2\beta_2$), la hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) prácticamente constituye el 3% restante. La hemoglobina fetal, Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) representa menos del 1% de la hemoglobina total en los eritrocitos normales del adulto. La Hb F es precedida por las hemoglobinas embrionarias Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$) y 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) y Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Hay otros componentes que son el resultado de modificaciones postsintéticas, la más común de todas es la Hb A_{1c}, formada por la reacción de la glucosa con la hemoglobina A, y Hb F₁ forma acetilada de la hemoglobina fetal.

La estructura tridimensional de la hemoglobina A fue determinada por Max Perutz y sus colaboradores con una precisión mayor de 2,7 Å mediante la cristalografía de rayos X (Baldwin, 1980; Fermi *et al.*, 1984). Las dimensiones totales son de unos 64 x 55 x 50Å. Aproximadamente el 70% de los residuos participan en la estructura secundaria α -helicoidal que genera siete segmentos helicoidales en la cadena α y ocho en la cadena β . Estas ocho regiones

helicoidales se designan comúnmente con las letras de la A a la H, empezando con la hélice A en el extremo NH₂-terminal. Las regiones interhelicoidales se designan AB, BC, CD, ..., GH, respectivamente. La región no helicoidal que se encuentra en el extremo NH₂-terminal y la hélice A se designa región NA, y la región situada entre el extremo COOH-terminal y la hélice H se designa región HC. Esta nomenclatura permite identificar a cada residuo con una posición específica en la cadena.

La unión del oxígeno a la hemoglobina está mediada por un grupo prostético, hemo, que es la protoporfirina IX con un átomo de hierro en su centro. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (carga +2) en la hemoglobina. El átomo ferroso del hemo puede formar cinco o seis enlaces de coordinación en función de si el O₂ está o no unido a la proteína. Cuatro enlaces se establecen con los átomos de nitrógeno pirrólicos de la porfirina. Dado que todos los anillos pirrólicos de la porfirina se encuentran en un mismo plano, los cuatro enlaces que van desde la porfirina al átomo de hierro situado en su centro tendrán una tendencia a coincidir con el plano del anillo porfirínico. El quinto y el potencialmente sexto enlaces de fijación del átomo ferroso del hemo se encuentran situados a lo largo de un eje perpendicular al plano del anillo de la porfirina. El quinto enlace de coordinación del átomo ferroso de los hemo se hace con un nitrógeno del imidazol de una histidina. Esta histidina se designa como histidina proximal en

INTRODUCCIÓN

la estructura de la hemoglobina. Cuando está unido a la hemoglobina, el O₂ forma un sexto enlace de coordinación con el átomo ferroso. En esta posición ligada, el oxígeno está colocado entre el átomo ferroso al cual está unido y un segundo imidazol de una histidina, designada como histidina distal. En la desoxihemoglobina, la sexta posición de coordinación del átomo ferroso se halla desocupada. El hemo se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las subunidades de globina en donde se establecen unas 80 interacciones entre 18 residuos y el hemo. La mayoría de estas interacciones no covalentes son entre cadenas laterales apolares de aminoácidos y las regiones no polares de la porfirina.

1.1.2. Genes de la hemoglobina.

Existen seis tipos diferentes de cadenas de globina (α , β , γ , δ , ϵ y ζ) que se encuentran en diferentes etapas del desarrollo humano, por ello requiere un mínimo de seis genes estructurales diferentes (Nienhuis *et al.*, 1987) (Fig. 1).

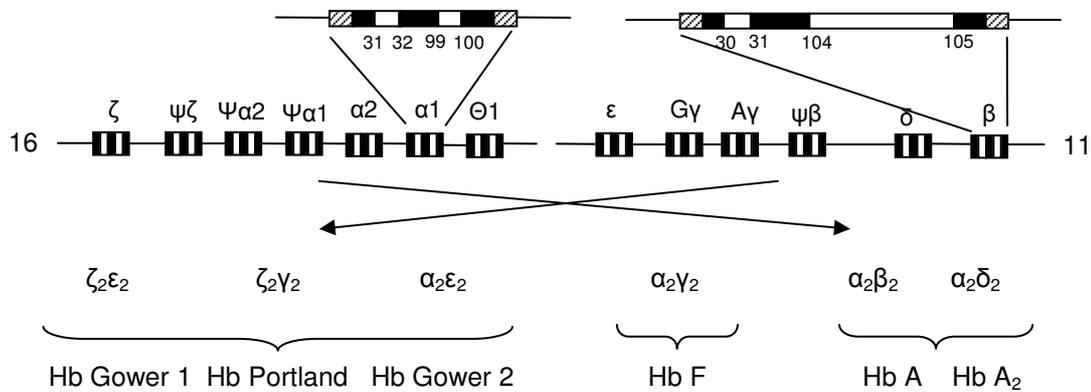


Figura 1. El agrupamiento (*cluster*) de genes de la hemoglobina humana.

El agrupamiento (*cluster*) de genes de α -globina humana (HBAC) comprende cuatro copias de genes funcionales: *HBZ*, *HBA2*, *HBA1* y *HBQ1* que codifican las cadenas de globina ζ , α_2 , α_1 y θ respectivamente. El HBAC está localizado en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3) y está regulado por la región de control del locus de la α -globina (intensificador HS-40) (Higgs *et al.*, 1990; Liebhaber *et al.*, 1990). El agrupamiento (*cluster*) de genes de β -globina humana (HBBC) consiste en cinco copias de genes funcionales: *HBE1*, *HBG2*, *HBG1*, *HBD* y *HBB* que codifican las cadenas de globina ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ y β respectivamente. El HBBC está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.4) y está regulado por la región de control del locus de la β -globina (LCR) (Grosveld *et al.*, 1987). Estos genes codifican las cadenas de globina tipo α (ζ , α_2 , α_1 y θ) que tienen 141 aminoácidos y las cadenas de globina tipo

INTRODUCCIÓN

β (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ y β) que tienen 146 aminoácidos. Los dos *clusters* están físicamente separados debido a la duplicación inicial del gen de globina ancestral, hace 450 millones de años aproximadamente (Goodman *et al.*, 1987). Dos copias de genes de cada *cluster* (HBA2/HBA1 y HBG2/HBG1) codifican proteínas idénticas como resultado de procesos de duplicación y conversión (Papadakis y Patrinos, 1999).

La expresión del gen de la globina en el HBBC sufre dos cambios durante la ontogenia: el cambio de globina embrionaria a fetal, coincidiendo con la transición de la hematopoyesis primitiva a la definitiva, y el cambio de globina fetal a adulta durante el periodo perinatal. Ambos cambios están controlados exclusivamente a nivel transcripcional (Stamatoyannopoulos y Grosveld, 2001) (Fig.2).

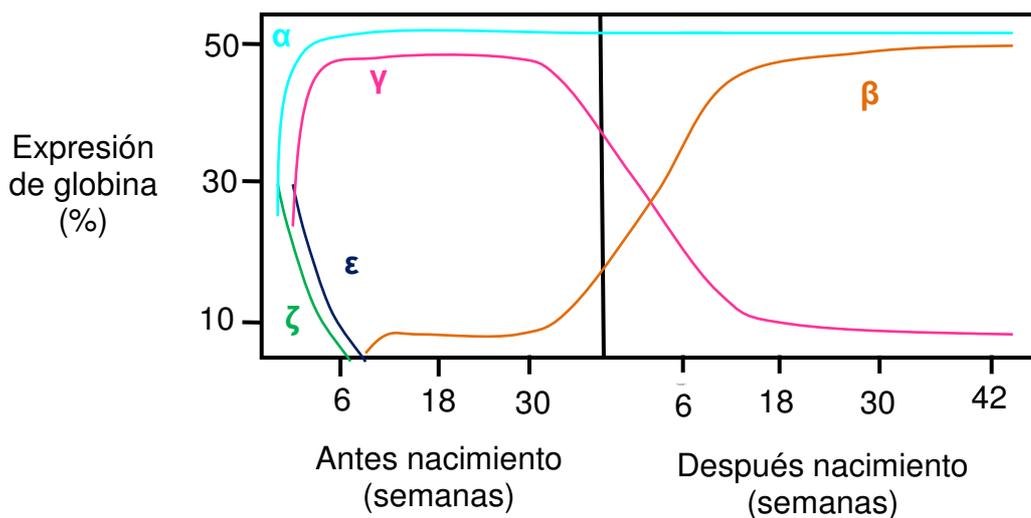


Fig. 2. Expresión de globina en las diferentes etapas del desarrollo humano.

Experimentos recientes sugieren que el LCR de la β -globina y los genes de la globina expresados en cada etapa del desarrollo participan en múltiples interacciones para formar un compartimento denominado *active chromatin hub* (ACH) (Palstra *et al.*, 2003; Patrinos *et al.*, 2004a). Interacciones similares pueden ocurrir en el HBAC.

1.1.3. Síntesis de hemoglobina.

La síntesis del grupo hemo puede producirse en la mayoría de las células, excepto en los eritrocitos maduros, aunque la mayoría proviene de las células precursoras eritroides. Su producción está equilibrada con la de cadenas de globina. El paso inicial y a su vez limitante en la producción del grupo hemo lo constituye la condensación de succinil coenzima A (CoA) y glicina para formar ácido δ -aminolevulínico (reacción que se produce en las mitocondrias), necesitando que la glicina sea activada por el fosfato de piridoxal (vitamina B₆).

La síntesis de globina acontece en el citosol de eritroblastos y reticulocitos (las cadenas de polipéptidos se sintetizan en los ribosomas).

En cada etapa del desarrollo humano, la expresión de los genes de la globina se produce en un órgano diferente. Además, en cada órgano se activan genes diferentes (Tabla 1).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Órganos donde se expresan los genes de globina.

Etapa de desarrollo y órgano donde se sintetizan las globinas	Genes que se expresan de la globina tipo α (cromosoma 16)	Genes que se expresan de la globina tipo β (cromosoma 11)	Hemoglobinas sintetizadas
Embrión (saco vitelino)	Mayoritaria: globina ζ	Mayoritaria: globina ϵ Minoritaria: globina γ	Mayoritaria: $\zeta_2\epsilon_2$ Minoritaria: $\zeta_2\gamma_2$
Feto (hígado y bazo)	Mayoritaria: globina α	Mayoritaria: globina γ Minoritaria: globina β	Mayoritaria: $\alpha_2\gamma_2$ Minoritaria: $\alpha_2\beta_2$
Adulto (medula ósea)		Mayoritaria: globina β Minoritaria: globina δ	Mayoritaria: $\alpha_2\beta_2$ Minoritaria: $\alpha_2\delta_2$

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS DE LA HEMOGLOBINA.

Las hemoglobinopatías comprenden un grupo heterogéneo de anemias congénitas, entre las que destacan: las variantes de hemoglobina (alteraciones de tipo cualitativo en la expresión de estos genes), las talasemias (disminución o ausencia de la expresión de las cadenas de globina) y la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (defecto en el cambio de hemoglobina fetal a adulta). Aunque esta última no tiene clínica de relevancia, sirven como modelos para conocer la regulación de los genes durante el desarrollo (Tabla 2). Existen solapamientos entre las variantes de hemoglobina y las talasemias dando lugar a una amplia variedad clínica.

Tabla 2. Alteraciones genéticas de la hemoglobina.

Variantes de hemoglobina
Cadena α
Cadena β
Cadena γ
Cadena δ
Fusión de cadenas
$\delta\beta$
$\beta\delta$
$\gamma\beta$
Talasemias
α talasemia
β talasemia
$\delta\beta$ talasemia
$\gamma\delta\beta$ talasemia
γ talasemia
δ talasemia
Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal
Delección
Sin delección
Ligada al <i>cluster</i> del gen de β -globina
No ligada al <i>cluster</i> del gen de β -globina

Cerca del 7% de la población mundial es portadora de una mutación en el gen de la globina y en la mayoría de los casos se hereda con un patrón autosómico recesivo (Weatherall & Clegg, 2001). Hasta la fecha, alrededor de 1200 mutaciones se han caracterizado a nivel molecular (Hardison *et al.*, 2002). Cada país tiene un espectro específico de variantes de hemoglobina y mutaciones talasémicas (Patrinos *et al.*, 2004b).

INTRODUCCIÓN

1.2.1. Variantes de hemoglobina.

La electroforesis de hemoglobina de pacientes con unas características hematológicas específicas ha permitido descubrir más de 400 variantes de hemoglobina. Se producen por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en los genes que codifican las cadenas de globina. La Hb S es la más frecuente seguida de la Hb C, D y E.

Las hemoglobinopatías estructurales se clasifican en cuatro grandes grupos:

1. Hemoglobinas con disminución de la solubilidad (Hb S y Hb C).
2. Hemoglobinas con disminución de la estabilidad molecular (hemoglobinas inestables).
3. Hemoglobinas con alteración de la afinidad por el oxígeno.
4. Metahemoglobinas (Hb M).

Las mutaciones que producen una disminución de la solubilidad de la hemoglobina suelen situarse próximas a la superficie de la molécula por lo que, en la mayoría de los casos, se acompañan también de un cambio de carga eléctrica y alteración de la movilidad electroforética. Ejemplos de este tipo de hemoglobinopatías son la Hb S con polimerización de la desoxihemoglobina y que es la causante de la anemia falciforme y la Hb C caracterizada por una cristalización peculiar de la hemoglobina en el interior

de los eritrocitos. La gran mayoría de estas mutaciones se han detectado mediante electroforesis de zona a pH alcalino. Las restantes mutaciones se sitúan en el interior de la molécula y casi siempre en las zonas de contacto entre las subunidades (hemoglobinas inestables) o en regiones próximas a la cavidad del hemo (hemoglobinas con alteración de la afinidad por el oxígeno y Hb M). A diferencia de las mutaciones superficiales, las mutaciones internas pueden no acompañarse de variación en la carga eléctrica de la molécula y, por tanto, deben ser detectadas por procedimientos diferentes a la electroforesis. En la tabla 3 se muestra un ejemplo característico de cada uno de estos grupos de hemoglobinopatías estructurales.

Tabla 3. Ejemplos de hemoglobinopatías estructurales.

Alteración fisicoquímica	Hemoglobina
Polimerización	Hb S ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$)
Cristalización	Hb C ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$)
Aumento de la afinidad por el oxígeno	Hb Zurich ($\beta 63 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$)
Disminución de la afinidad por el oxígeno	Hb Kansas ($\beta 102 \text{ Asn} \rightarrow \text{Thr}$)
Oxidación	Hb Koln ($\beta 98 \text{ Val} \rightarrow \text{Met}$)
Metahemoglobinización	Hb Hyde Park ($\beta 92 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$)

INTRODUCCIÓN

Las hemoglobinopatías estructurales se denominan de acuerdo con la cadena afectada, el número secuencial del aminoácido (AA) mutado (con su correspondiente segmento helicoidal) y la naturaleza de la mutación. Por ejemplo la HbS se denomina HbS β 6(A3)Glu→Val. La Hb S fue la primera variante de hemoglobina en ser descubierta (Pauling *et al.*, 1949) y la primera en conocerse el aminoácido sustituido (Ingram *et al.*, 1956). La mutación que produce la Hb S presenta un cambio de una base (A a T) en el primer exón, en la posición 2 del codón 6 del gen HBB (GAG→GTG), lo cual produce una sustitución de ácido glutámico por valina en la sexta posición de la cadena de β -globina. La Hb S aunque funcionalmente normal, cuando se desoxigena, polimeriza y da lugar a la aparición de estructuras fibrilares, que deforman intensamente el eritrocito, haciendo que éste adquiera forma de hoz o semiluna (eritrocito falciforme o drepanocito).

1.2.2. Talasemias.

Las talasemias comprenden un grupo heterogéneo de alteraciones de la hemoglobina caracterizado por disminución de la síntesis de una o más cadenas de globina (α , β , γ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$, δ , $\epsilon\gamma\delta\beta$) (Weatherall & Clegg, 2001).

1.2.2.1. Alteraciones moleculares de las talasemias.

1.2.2.1.1. Mutaciones puntuales.

En las talasemias, la sustitución de bases nitrogenadas altera el mecanismo de síntesis de la hemoglobina pero no su estructura. Éste es el mecanismo molecular más frecuente en la β -talasemia, aunque lo es también de un elevado número de α -talasemias. En general se trata de mutaciones intrónicas o de las regiones de contacto entre intrones y exones, cuya consecuencia es la alteración de alguna de las etapas que intervienen en los procesos de transcripción, maduración (procesamiento) o lectura (traducción) del RNA mensajero (mRNA). En la tabla 4 se resumen los principales tipos de mutación que pueden dar lugar a una disminución de síntesis de cadenas de globina.

Tabla 4. Tipos de mutación en las talasemias.

Defectos en la maduración
<ul style="list-style-type: none"> Mutaciones de las zonas de contacto exón-intrón Mutaciones intrónicas (IVS) <ul style="list-style-type: none"> Mutaciones de las secuencias consenso Mutaciones de secuencias crípticas Mutaciones de la región de poliadenilación (poli-A) Mutaciones de la región CAP
Defectos en la traducción del mRNA
<ul style="list-style-type: none"> Mutaciones de las regiones promotoras Mutaciones sin sentido (no existe síntesis de proteína activa) Desplazamiento del marco de lectura <ul style="list-style-type: none"> Mutaciones del codón de iniciación Mutaciones del codón de terminación

INTRODUCCIÓN

Los defectos de maduración obedecen a alteraciones en el mecanismo de escisión y empalme (*splicing*) del mRNA con lo que éste se traduce mal (disminución de síntesis) o no llega a traducirse (ausencia de síntesis). Se han descrito cerca de 200 mutaciones diferentes en pacientes con β -talasemia. La mayoría son debidas a sustituciones nucleotídicas, aunque también se han descrito deleciones (Weatherall, 1994). Estas mutaciones tienen como resultado la ausencia de síntesis de β -globina (β^0) o la disminución de síntesis de β -globina (β^+) (Bunn & Forget, 1986). Esta diferencia es importante, ya que la β^0 -talasemia presenta mayor expresividad clínica que la β^+ -talasemia.

Las mutaciones del gen α afectan preferentemente al gen α_2 y suelen presentar disminuciones de α -globina más intensas que las debidas a deleciones ya que no se acompañan de cambios en la expresión del gen funcional α_1 .

Los defectos de lectura obedecen a mutaciones que modifican la información genética contenida en los codones o tripletes de bases y alteran la traducción del mRNA. Debido a ello se produce un desplazamiento en el marco de lectura del mRNA (*frameshift mutation*) y según el tipo y localización de la señal o información genética alterada puede existir una disminución, una ausencia de síntesis o la síntesis de cadenas de globina más largas de lo normal. Ejemplos de este tipo de mutaciones son la supresión del codón de

iniciación o de terminación. En el primer caso desaparecen las señales de inicio de síntesis con lo que ésta no se produce, y en el segundo la síntesis de globina continúa hasta que se encuentra un nuevo codón de terminación lo que supone un alargamiento de la cadena de globina (Hb Constant Spring, Hb Wayne, Hb Cranston y la Hb Tak). Las hemoglobinas con alargamiento de cadenas de globina son hemoglobinopatías estructurales que además presentan una síntesis disminuida. Por ello, en la mayoría de los casos cursan con un síndrome talasémico (hemoglobinopatías talasémicas). Otro ejemplo de hemoglobinopatías talasémicas por desplazamiento del marco de lectura son las que obedecen a la síntesis de cadenas globínicas muy inestables. En estos casos la concentración de mRNA suele ser normal pero las cadenas de globina desaparecen inmediatamente tras la síntesis por lo que sólo son detectables en el estado homocigoto. En algunos de estos casos predomina el síndrome talasémico como manifestación clínica mientras que en otros lo hace el síndrome hemolítico.

1.2.2.1.2. Deleciones.

La deleción o inserción de uno o pocos nucleótidos constituye un mecanismo molecular mucho menos frecuente que las mutaciones puntiformes. Ejemplos de deleciones son la Hb Freiburg (deleción de 1 aminoácido), Hb Lyon (deleción de 2 aminoácidos) y Hb Gun Hill (deleción de 5 aminoácidos) y de

INTRODUCCIÓN

inserciones la HbC Harlem ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$; $73 \text{ Asp} \rightarrow \text{Ans}$), Hb Arlington Park ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$; $95 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu}$), Hb J Singapore ($\beta 78 \text{ Ans} \rightarrow \text{Asp}$; $79 \text{ Ala} \rightarrow \text{Gly}$), HbC Ziguinchor ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$; $58 \text{ Pro} \rightarrow \text{Arg}$) y HbS Travis ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$; $142 \text{ Val} \rightarrow \text{Ala}$).

Las deleciones de genes de globina constituyen el mecanismo más frecuente de la α -talasemia siendo mucho más raro en la β -talasemia. Dado que en el adulto normal existen cuatro genes α (dos por cromosoma) pueden existir cuatro formas diferentes de deleción (tabla 5):

Tabla 5. Clasificación de α -talasemias.

Deleción de un solo gen	α^+ talasemia
Deleción de dos genes	α^0 talasemia
Deleción de tres genes	Hemoglobinopatía H
Deleción de cuatro genes	Hemoglobinopatía Bart

α^+ -talasemia o α -talasemia tipo 2 (α -/ $\alpha\alpha$).

Los defectos moleculares más frecuentemente observados en la α^+ -talasemia son las deleciones de 3,7 Kb ($\alpha^{-3.7}$) y 4,2 Kb ($\alpha^{-4.2}$), que causan la pérdida del gen α_1 o α_2 , respectivamente. La deleción de 3,7 Kb es especialmente frecuente en el área mediterránea y en la población americana de raza negra, mientras que la deleción de 4,2 Kb es más propia del sudeste asiático. También se han descrito otras deleciones cortas de 3,5 y 5,3 Kb o formas delecionales de α^+ -talasemia asociadas a hemoglobinopatías estructurales.

α^0 -talasemia ó α -talasemia tipo 1 [(α -/ α -) ó (-/ $\alpha\alpha$)].

La α^0 -talasemia obedece a deleciones de mayor tamaño (desde 5,2 Kb hasta >200 Kb), que eliminan los dos genes α -globina de forma parcial o completa (mayoría de los casos), y por lo tanto, no existen síntesis *in vivo* de cadena α -globina en el cromosoma afectado. La α^0 -talasemia puede afectar los dos genes de un mismo cromosoma (-/ $\alpha\alpha$) o un gen de cada uno de los cromosomas (α -/ α). En ambos casos los individuos portadores de esta forma de talasemia sobreviven y, en general, pueden realizar una vida relativamente normal. Un ejemplo de este tipo de talasemia es la deleción ---^{SEA} , frecuente en el sudeste asiático, y de unas 20 kb de extensión eliminando los genes $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 , α_1 y θ_1 (fig. 3). Algunas deleciones, incluyendo aquellas asociadas a retraso mental, eliminan los tres genes ζ , α y θ de la globina. El análisis detallado de varias formas de α -talasemia indica que normalmente, son el resultado de recombinaciones ilegítimas o no homólogas. Tales procesos implican regiones parciales de secuencias homólogas en puntos de ruptura que no abarcan toda la secuencia necesaria para que la recombinación sea homóloga.

Hemoglobinopatía H (-/ α -).

Es consecuencia de la transmisión de un progenitor con α^+ -talasemia [α -/ $\alpha\alpha$] y el otro progenitor con α^0 -talasemia [-/ $\alpha\alpha$], por lo que tres de los cuatro genes

INTRODUCCIÓN

que deben producir la subunidad α , no lo hacen. El exceso de cadena β forma la hemoglobina H (β_4) que es una hemoglobina inestable. La hemoglobinopatía H se detecta fácilmente mediante electroforesis, ya que migra más rápido que la Hb A a pH alcalino.

Hemoglobina Bart (--/--).

En realidad, es la forma homocigota de la α^0 -talasemia [--/ $\alpha\alpha$], produciéndose ausencia de los cuatro genes que permiten la expresión de la subunidad α . Se forman tetrámeros γ (γ_4) y debido a la total ausencia de cadenas α desaparecen todas las fracciones hemoglobínicas normales del estado adulto (HbA, HbF y HbA2). La hemoglobina Bart (γ_4) que presentan estos pacientes es moderadamente insoluble comportándose como una hemoglobina de alta afinidad (similar a la del monóxido de carbono). Provoca aborto alrededor de la 30 semana de embarazo o muerte fetal al final del embarazo o poco después del nacimiento por anasarca fetoplacentaria (*hidrops fetalis*) (Weatherall & Clegg, 2001).

β -talasemia

Las deleciones exclusivas del gen β son mucho menos frecuentes que las del gen α y se circunscriben a determinadas áreas geográficas. Hasta la actualidad se han descrito unas 40 deleciones del gen β -globina situadas en la

región promotora o en el propio gen y una inserción del retrotransposón L1 en el intrón 2 (IVS2) (Thein *et al.*, 1984; Gilman *et al.*, 1984; Padanilam *et al.*, 1984; Popovich *et al.*, 1986; Diaz-Chico *et al.*, 1987; Anand *et al.*, 1988; Aulehla-Scholz *et al.*, 1989). La delección del gen HBB mejor conocida es la de 619-pb en el extremo 3', restringida a individuos de origen indio o paquistaní (Thein *et al.*, 1984). Las delecciones que afectan el extremo 5' del gen β y su región promotora se caracterizan por grandes aumentos de Hb A₂ (7-9%) y de Hb F (10%) (Gilman *et al.*, 1984; Padanilam *et al.*, 1984; Popovich *et al.*, 1986; Diaz-Chico *et al.*, 1987; Anand *et al.*, 1988; Aulehla-Scholz *et al.*, 1989). Se ha descrito también una delección completa del gen β en la β^0 -talasemia Dutch (Gilman *et al.*, 1984) y, por supuesto en diferentes formas de $\delta\beta$ -talasemia donde también se deleciona el gen δ . Finalmente, las inserciones tienen escaso interés clínico porque la única descrita hasta la actualidad (retrotransposón L1 en IVS2) no se acompaña de alteración funcional.

$\delta\beta$ -talasemia.

Cuando la delección del gen β se acompaña de una delección simultánea del gen δ se produce una $\delta\beta$ -talasemia. Esta forma de talasemia obedece a delecciones extensas que implican el *cluster* de β -globina y eliminan los dos genes δ y β , dejando intacto uno o los dos genes γ , por lo que se produce una síntesis compensadora de Hb F. Cuando la delección afecta únicamente a los

INTRODUCCIÓN

genes δ y β , la Hb F contiene los dos tipos de cadenas γ ($G\gamma A\gamma$) y cuando, además, elimina el gen $A\gamma$, sólo contiene cadenas $G\gamma$ ($A\gamma\delta\beta^0$ -talasemia) (Trent *et al.*, 1984). En España, la alteración molecular predominante es una delección de considerable tamaño denominada $\delta\beta$ -talasemia Spanish (Ottolenghi *et al.*, 1982). Esta anomalía carece de expresividad clínica, aunque puede ir acompañada de un cierto grado de microcitosis e hipocromía, y su característica más común es la persistencia de síntesis de Hb F durante la vida adulta (Weatherall & Clegg, 2001).

1.2.2.1.3. Defectos en el intercambio de material genético durante la meiosis.

Cuando durante la meiosis se produce una alteración en el intercambio de material genético entre dos cromosomas homólogos pueden aparecer cadenas de globina mixtas, es decir, codificadas por dos *locis* genéticos diferentes. Un ejemplo característico de este tipo de hemoglobinopatías es la Hb Lepore en la que existe un entrecruzamiento no homólogo (*crossing-over*) con intercambio de material genético y formación de un gen híbrido $\delta\beta$. Este gen codifica una cadena globínica híbrida cuya secuencia está constituida por un fragmento N-terminal de cadena δ (50 a 80 aminoácidos) y un fragmento C-terminal de cadena β (60 a 90 aminoácidos), ambos normales (Baglioni, 1962). Debido a ello, además del cromosoma Lepore en el que el gen β ha

sido sustituido por el híbrido $\delta\beta$, se forma un cromosoma anti-Lepore en el que el gen híbrido coexiste con los genes δ y β normales. La Hb Lepore constituye también un clásico ejemplo de hemoglobinopatía talasémica.

1.3. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

La mayor incidencia de las hemoglobinopatías y talasemias en determinadas regiones geográficas viene marcada por la presión genética positiva ejercida por el paludismo endémico.

Las hemoglobinopatías estructurales más ampliamente extendidas por toda la geografía mundial son la Hb S, Hb C, Hb E y Hb D Punjab. La Hb S presenta una incidencia de entre un 40% y 50% en algunas regiones de África, el 25% en Turquía, Arabia Saudí, Israel y sur de la India, y el 32% en algunas zonas muy restringidas del sur de Europa (Sicilia, Chipre, Grecia). La Hb S y la Hb C pueden afectar también la raza blanca y su incidencia es variable en diferentes regiones del área mediterránea como, por ejemplo, Grecia, Chipre, sur de Italia, Sicilia, España y Portugal. En España las áreas con especial incidencia de ambas hemoglobinopatías son Andalucía y Extremadura. Aunque se estima que en el mundo existen unos 30 millones de portadores de Hb E, esta hemoglobinopatía es prevalente en el sudeste asiático donde puede llegar a afectar a más del 50% de la población. Finalmente, la Hb D Punjab es prevalente en India e Irán.

INTRODUCCIÓN

Las talasemias muestran una frecuencia variable según zonas geográficas aunque presentan una especial predilección por las poblaciones del área Mediterránea (Grecia, Chipre, Sur de Italia, Cerdeña, Sicilia y España) con frecuencias que varían entre un 1% y 30% y predominio de β -talasemia (Cao *et al.*, 1996; Loukopoulos, 1996), y por las de Oriente Medio, Sudeste asiático y China con frecuencias que varían entre un 5% y 40%, con claro predominio de α -talasemia. De estas cifras se deduce que en algunos países la talasemia continúa siendo un grave problema de salud pública que obliga a implantar programas de prevención y diagnóstico prenatal (Villegas, 2006). En España los estudios realizados en diferentes áreas geográficas varían según se trate de α -talasemia o β -talasemia. Para la α -talasemia se han obtenido incidencias variables entre áreas geográficas que oscilan desde un 0,5% a un 2,5%, y para la β -talasemia los valores parecen ser algo inferiores, habiéndose obtenido una cifra promedio del 0,4%, lo que significa un paciente por cada 250 habitantes, aproximadamente (Villegas *et al.*, 1992; Baiget, 1986) .

1.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS.

1.4.1. Manifestaciones clínicas

Hemoglobinopatías estructurales.

En las hemoglobinopatías estructurales la repercusión clínica de las mutaciones depende de su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas o función de la molécula de hemoglobina. Existen cinco formas clínicas de hemoglobinopatía estructurales:

1. Asintomáticas.
2. Síndrome hemolítico (alteración de la solubilidad o estabilidad molecular).
3. Eritrocitosis (aumento de la afinidad por el oxígeno alterada).
4. Cianosis (disminución de la afinidad por el oxígeno y hemoglobinopatías M).
5. Síndrome talasémico (hemoglobinopatías talasémicas).

Asintomáticas. De todas las variantes de hemoglobina conocidas, un 80%, aproximadamente, son asintomáticas y del 20% restante, la mayoría presentan una mutación superficial cuya única consecuencia es un cambio en la carga eléctrica sin expresividad clínica. Un ejemplo de este tipo de hemoglobinopatías son la Hb G Filadelfia y la Hb J Paris.

INTRODUCCIÓN

Síndrome hemolítico. Se da en hemoglobinopatías estructurales que se acompañan de una alteración de propiedades fisicoquímicas y disminución de la viabilidad eritrocitaria. Entre ellas las de mayor interés clínico son la Hb S y Hb C. La falciformación, cuando es muy acusada, se acompaña de anemia hemolítica aguda por rotura de los eritrocitos en la microcirculación y de crisis vasooclusivas por microinfartos debido a la acumulación de eritrocitos falciformes y rígidos en los territorios capilares periféricos. La anemia falciforme es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, sólo aparecen manifestaciones clínicas en el estado homocigoto (Hb S/S), es decir, cuando prácticamente toda la hemoglobina es Hb S. Asimismo, en este caso, las manifestaciones clínicas sólo aparecen cuando la Hb S se somete a desoxigenación, ya que la oxihemoglobina S es funcionalmente normal.

La anemia drepanocítica es causa de una considerable mortalidad y morbilidad en África, y en todas aquellas poblaciones donde hubo migración de individuos africanos, región mediterránea, medio oriente y subcontinente indio (Flint *et al.*, 1998).

La Hb C aunque también cristaliza en el interior del eritrocito carece de las graves consecuencias de la Hb S y es prácticamente asintomática, incluso en estado homocigoto (Hb C/C).

Eritrocitosis. Es la expresividad clínica de las hemoglobinopatías con aumento de la afinidad por el oxígeno. En general se trata de mutaciones situadas en el interior de la molécula que dificultan su movimiento de la molécula al fijar el oxígeno. Con ello se dificulta la cesión del oxígeno a los tejidos (hipoxia) y como consecuencia aumenta la producción de eritrocitos (eritrocitosis). La eritrocitosis por hemoglobinopatía debe diferenciarse de la que acompaña a la policitemia vera (PV) mediante criterios clínicos y biológicos (Means, 1999).

Cianosis. Es una manifestación clínica característica de las hemoglobinopatías M (Hb M). En este caso la mutación produce una oxidación permanente del hierro hemínico y transformación de la hemoglobina en metahemoglobina. Dado que la metahemoglobina es incapaz de transportar oxígeno, las Hb M cursan clínicamente con cianosis neonatal que, a diferencia de la que acompaña el déficit de diaforasa (metahemoglobina reductasa) y que desaparece con la administración de azul de metileno, no responde a ningún tratamiento (Vives, 2001).

Síndrome talasémico. Se da en aquellas hemoglobinopatías estructurales que se acompañan de una disminución simultánea del mecanismo de síntesis globínica. Estas hemoglobinopatías estructurales, conocidas como talasémicas, pueden obedecer a diferentes mecanismos y en

INTRODUCCIÓN

su expresividad clínica el síndrome talasémico puede predominar sobre el hemolítico o viceversa.

Talasemias

En las talasemias la manifestación clínica común es la microcitosis hipocroma con o sin anemia (síndrome talasémico). En las formas sin anemia suele ser característico el aumento de la concentración de eritrocitos ("pseudopoliglobulia microcítica"). La mayor o menor expresividad clínica del síndrome talasémico depende del tipo de mutación y de su carácter homocigoto o heterocigoto. Así, una talasemia puede pasar completamente desapercibida desde el punto de vista clínico (talasemia silente) o ser incompatible con la vida (hidropesía fetal).

α -talasemia. En la α -talasemia pueden darse cinco formas clínicas:

α -talasemia silente. La talasemia silente (α^+ -talasemia) es clínicamente asintomática y sólo puede detectarse mediante estudios familiares. El volumen corpuscular medio (VCM) suele ser normal al igual que el patrón electroforético de hemoglobinas aunque durante el período neonatal puede observarse de un 1% a 2% de Hb Bart. La confirmación diagnóstica requiere un análisis de la relación α / β (< 1) o del DNA.

α -talasemia menor (α^2 -talasemia). Se caracteriza por una ligera anemia (105-120 g/l) moderadamente microcítica (75-83 fl) que afecta, preferentemente, a individuos del área mediterránea, aunque también a los de Asia y África. El patrón electroforético es normal, aunque a veces se observa una disminución de la Hb A₂ (1,5%-2,5%). En recién nacidos es relativamente frecuente observar entre un 5% y 10% de Hb Bart que no es reemplazada por cantidades detectables electroforéticamente de Hb H. Esta enfermedad ocurre de forma esporádica entre la población española (Villegas *et al.*, 1992).

α -talasemia asociada a retraso mental (ATR). Obedece a extensas deleciones (1-2 megabases) en el extremo del cromosoma 16 que eliminan todos los genes de la región α -globina (síndrome ATR-16). Sus características clínicas son variables según la extensión de la deleción y consisten, junto a la hemoglobinopatía H, en un retraso mental grave, rasgos faciales dismórficos y alteraciones genitales (Weatherall & Clegg, 2001). El exceso de cadena β forma la hemoglobina H que es una hemoglobina inestable. Clínicamente se comporta con signos y síntomas de hemólisis crónica y esplenomegalia. Desarrollan crisis hemolíticas tras infecciones, contacto con ciertas drogas o con agentes oxidantes como ocurre en otras hemoglobinopatías inestables o en el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenada.

INTRODUCCIÓN

Hidropesía fetal. Afecta de manera prácticamente exclusiva a individuos del sudeste asiático (comúnmente ^{SEA} /^{SEA}) y mucho menos del mediterráneo (^{MED} /^{MED}). Clínicamente se caracteriza por una anemia hemolítica muy intensa acompañada de edemas generalizados y signos de insuficiencia cardíaca grave debido a la prolongada hipoxia intrauterina. La observación morfológica de la extensión sanguínea muestra intensa anisopoiquilocitosis con macrocitosis, hipocromía y eritroblastos circulantes. La electroforesis de hemoglobinas muestra un 80% de Hb Bart y un 20% de Hb H y Hb Portland.

β-talasemia.

Las manifestaciones clínicas de las β-talasemias varían desde situaciones asintomáticas (talasemia menor) hasta anemias intensas que provocan la muerte del paciente en la infancia (talasemia mayor), pasando por otras formas de intensidad variable (talasemia intermedia). Las β-talasemias presentan grados muy variables de eritropoyesis ineficaz y hemólisis. La gran cantidad de subunidades α libres que se producen se caracterizan por tener menor solubilidad, por lo que se forman agregados insolubles dentro de los precursores eritrocitarios en médula ósea. Estos cuerpos de inclusión también provocan alteraciones a nivel de membrana lo que disminuye su vida media. La consecuencia es que en la β-talasemia se contrasta tanto una destrucción de células proeritroides intramedulares, como una disminución de la vida

media de los eritrocitos. Para compensar éstos mecanismos, la médula ósea roja está continuamente estimulada para la producción de proeritroblastos, y se constata la presencia de hematopoyesis extramedular en hígado y bazo.

β -talasemia mínima. Carece de expresividad clínica o biológica y su hallazgo es siempre resultado de un estudio familiar. No existen, por tanto, alteraciones del VCM ni de la concentración de Hb A₂ y el patrón electroforético de hemoglobinas es normal.

β -talasemia menor o rasgo talasémico. Es la forma clínica más frecuente de β -talasemia en el área mediterránea y se la conoce también como "rasgo talasémico". Su expresividad más característica es la pseudopoliglobulia microcítica sin anemia o con anemia muy discreta (Hb: 110-120 g/l). Rara vez se aprecia esplenomegalia u otro signo clínico de hemólisis por lo que su hallazgo suele ser casi siempre casual con motivo de algún examen hematológico de rutina. En el estudio de frotis sanguíneo también se puede constatar la presencia de células en diana de forma esporádica y un moderado punteado basófilo. Los eritrocitos tienen una fragilidad osmótica disminuida y la concentración de hierro en suero es normal salvo que además el paciente presente anemia por déficit de hierro. El recuento de reticulocitos no está alterado. Se pueden aplicar protocolos para estudios de microcitosis, sobre todo si además se debe realizar un diagnóstico diferencial con las anemias

INTRODUCCIÓN

ferropénicas como el Factor discriminativo de England – Fraser y el Índice de Mentzer.

Factor discriminativo de England-Fraser:

$VCM - n^{\circ} \text{ de eritrocitos} - (\text{Hemoglobina} \times 5) - 3,4$ (un resultado negativo orienta hacia un rasgo talasémico)

Índice de Mentzer:

$VCM / n^{\circ} \text{ eritrocitos}$ (Valores inferiores a 12 orientan hacia un rasgo talasémico)

La presencia concomitante de microcitosis con hipocromía hace necesario el diagnóstico diferencial entre ambos tipos de anemias, ya que si una talasemia menor es tratada como una ferropenia lo único que se consigue es una inútil y sobre todo nociva sobrecarga férrica del paciente.

Talasemia intermedia. Como su nombre indica este tipo de talasemias corresponden a grados diferentes de severidad clínica comprendidas entre las que se producen en la talasemia menor y en la mayor. No hay una definición concreta, algunas se basan en la presencia de anemia, ictericia y esplenomegalia sin necesidad de transfusiones sanguíneas. Weatherall (2001) considera que una talasemia con una concentración de hemoglobina inferior a

90 g/L, acompañada de esplenomegalia, se trataría de la forma intermedia. Los individuos con esta alteración se desarrollan adecuadamente y llegan a la vida adulta, precisando tan sólo ocasionalmente de transfusiones. Cursa con un síndrome hemolítico crónico con anemia moderada o intensa, palidez, ictericia intermitente, esplenomegalia y ocasionalmente alteraciones óseas no asociadas a retraso del crecimiento corporal o gonadal. Prácticamente nunca requiere transfusiones y el genotipo de estos pacientes sólo puede conocerse mediante un detallado estudio familiar. La coexistencia de una triple α ($\alpha\alpha\alpha$) en un individuo portador de β -talasemia heterocigota puede agravar el cuadro clínico de talasemia menor a intermedia (Villegas *et al.*, 1992).

Talasemia mayor. También denominada anemia de Cooley, es la forma más grave de anemia hemolítica, si bien su expresividad clínica es variable. El cuadro clínico debuta entre los cuatro y seis meses de vida, cuando se produce el cambio en la producción de cadenas γ a cadenas β . Los pacientes pueden presentar anemia intensa con hematocrito alrededor del 20 %, esplenomegalia y hepatomegalia. En la exploración física destacan asimismo alteraciones óseas, sobre todo en cráneo, que pueden provocar alteraciones, especialmente en cara, dando lugar a rasgos característicos. Si no reciben tratamiento transfusional, los niños presentan alteraciones del crecimiento y del desarrollo, incluidos los correspondientes a los caracteres sexuales secundarios. Tienen una coloración peculiar de la piel por combinación de

INTRODUCCIÓN

ictericia, palidez y aumentos de depósitos de melanina. También presentan anomalías esqueléticas secundarias a la expansión de la médula ósea roja (radiológicamente muestran una imagen del llamado “cráneo en cepillo”). La cardiomegalia que puede acompañarse de insuficiencia cardíaca congestiva es otro de los signos que invariablemente aparecen en éstos pacientes. Este cuadro clínico se suele agravar con complicaciones como la hemocromatosis secundaria a la mayor absorción de hierro y por efecto secundario de las transfusiones sanguíneas a las que deben ser sometidos. Las complicaciones suelen ser la causa de la muerte, casi siempre al comienzo de la edad adulta.

El diagnóstico se realiza a partir del perfil hematológico que muestra una anemia intensa, microcítica e hipocroma; el examen morfológico de la sangre periférica muestra importante anisopoiquilocitosis, con hipocromía y punteado basófilo, siendo frecuente la presencia de eritroblastos. Los reticulocitos aumentados reflejan la eritropoyesis ineficaz del cuadro; en el examen de médula ósea se observa hiperplasia eritroblástica de predominio ortocromático; la electroforesis de hemoglobinas evidencia un aumento importante de la hemoglobina fetal.

La combinación de genotipos homocigotos (β^0/β^0) o doble-heterocigotos (β^0/β^+) propios de talasemia mayor, y genotipos α -talasémicos disminuye la

expresividad del cuadro clínico pudiendo dar lugar a una talasemia intermedia (Weatherall & Clegg, 2001).

$\delta\beta$ -talasemia. En la $\delta\beta$ -talasemia la expresividad clínica depende del carácter heterocigoto u homocigoto de la mutación siendo el heterocigoto siempre asintomático. La $\delta\beta$ -talasemia heterocigota se caracteriza por ausencia de anemia, microcitosis y aumentos moderados de la Hb F (7%-15%) sin alteraciones de la Hb A₂. La prueba citoquímica de Kleihauer muestra una distribución heterogénea de la Hb F. La forma homocigota presenta características clínicas de talasemia intermedia sin requerimiento transfusional (Hb 80-110 g/l) con intensa microcitosis (VCM < 75 fl) y prácticamente un 100% de Hb F con desaparición de la Hb A normal. En España la $\delta\beta$ -talasemia es relativamente frecuente, en las regiones mediterráneas y muy especialmente en el área de levante. La coexistencia de $\delta\beta$ -talasemia y β -talasemia no es ninguna rareza y se manifiesta por una anemia moderada o intensa con un cuadro clínico de talasemia intermedia. Por ello, una anemia acompañada de un aumento significativo de Hb F con disminución de la Hb A es muy sugestiva de asociación $\delta\beta$ -talasemia/ β -talasemia (Vives *et al.*, 1992).

1.4.2. Diagnóstico de laboratorio.

Las técnicas empleadas en el estudio de las hemoglobinas son muy diversas y van desde la simple observación de la morfología eritrocitaria al análisis

INTRODUCCIÓN

genético mediante técnicas de biología molecular. En la práctica clínica, las más útiles son las que permiten detectar la presencia de hemoglobinopatía, dejando para laboratorios especializados, todos aquellos procedimientos encaminados a identificar la mutación, especialmente en el caso de hemoglobinopatías estructurales y talasemias.

Estas técnicas pueden resumirse en las siguientes:

1. Electroforesis de hemoglobinas con diferentes soportes y valores de pH.
2. Cuantificación de las fracciones Hb A₂ y Hb F.
3. Pruebas de solubilidad hemoglobínica y falciformación.
4. Estudio de la estabilidad molecular de la hemoglobina.
5. Estudio de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.
6. Escrutinio de mutaciones mediante PCR.

En las hemoglobinopatías estructurales el método diagnóstico de elección es la electroforesis de hemoglobinas a diferentes valores de pH. Entre ellas la más empleada en la práctica clínica es la electroforesis de zona a pH alcalino (8,4). La interpretación de las imágenes electroforéticas es muy simple pero puede venir dificultada si un individuo es a la vez portador de otra hemoglobinopatía estructural o de talasemia. En principio, la codominancia explica el que un individuo heterocigoto exprese junto a la hemoglobina normal la fracción mutada. No obstante y debido a que el ser humano posee dos

genes β y cuatro α , si la mutación afecta al gen β se observa un 50%, aproximadamente, de fracción normal y patológica mientras que si se haya afectado un solo gen α existirá un 80% de Hb A normal y únicamente un 20% de hemoglobina patológica. Esto sólo deja de cumplirse en las hemoglobinas inestables donde la concentración de la fracción patológica es inferior a la esperada debido a la propia inestabilidad molecular. En la anemia falciforme, los individuos homocigotos (Hb SS), presentan una fracción de hemoglobina mayoritaria que migra algo por detrás de la Hb F y ausencia total de Hb A mientras que en los heterocigotos (Hb AS) se aprecian dos fracciones hemoglobínicas de intensidad similar y un moderado aumento de Hb F. En las hemoglobinopatías estructurales la Hb A₂ es siempre normal pero puede hallarse aumentada si coexiste un gen talasémico. Cuando coexisten dos hemoglobinopatías (por ejemplo, la asociación Hb SC) la electroforesis permite diferenciar claramente las dos fracciones de Hb S y Hb C, pero cuando se asocia un gen talasémico la interpretación de la electroforesis puede ser algo más difícil. Un ejemplo de ello es la asociación de Hb S y β -talasemia. En este caso, cuando se trata de una Hb S / β^+ -talasemia existe un claro predominio de la Hb S (70% a 90%) sobre la Hb A normal (10% a 30%), patrón bien diferente de la drepanocitosis heterocigota (Hb AS) caracterizada por un moderado predominio de la fracción Hb A normal (50%-60%) sobre la Hb S (30%-40%) (Altay et al., 1997; Zago MA et al., 1980). En caso de Hb S /

INTRODUCCIÓN

β^0 - talasemia y Hb S / α -talasemia el patrón electroforético es idéntico al de la drepanocitosis homocigota (Hb SS) pero se diferencian de ésta por el aumento de la Hb A₂ y la disminución del VCM. En la drepanocitosis, el análisis electroforético de hemoglobinas puede complementarse con la prueba de la solubilidad y la inducción *in vitro* de drepanocitosis mediante un agente reductor (metabisulfito o ditionito sódico al 2%).

Las hemoglobinopatías estructurales sin alteración de la carga superficial suelen presentar una migración electroforética idéntica a la de la Hb A por lo que la electroforesis no es un método útil para su diagnóstico. En ese caso debe recurrirse a procedimientos que ponen de manifiesto las propiedades fisicoquímicas alteradas como consecuencia de la mutación. Así por ejemplo las hemoglobinopatías inestables pueden diagnosticarse fácilmente mediante la llamada prueba de estabilidad molecular de la hemoglobina que consisten en incubar el hemolizado a 50 °C durante dos horas y observar la aparición de precipitado. Cuando la hemoglobinopatía cursa con eritrocitosis puede emplearse la llamada curva de disociación oxígeno-hemoglobina que mide el grado con que la hemoglobina mutada es capaz de liberar oxígeno a diferentes valores de presión parcial del mismo (Means, 1999).

Las talasemias generalmente son clasificadas como anemias hipocrómicas y microcíticas, por lo que el VCM es un buen indicador primario de diagnóstico. En la actualidad todos los analizadores de hematología disponen de la medición directa o indirecta de VCM con un alto grado de precisión y seguridad. Este VCM en población adulta normal tiene como valores de referencia entre 80 y 100 fL. Los individuos talasémicos tienen reducidos el VCM, de manera que un VCM < 72 fL tiene un alto grado de sensibilidad y especificidad para sospechar del diagnóstico de los síndromes talasémicos. La ADE es una medida del grado de variación del tamaño del eritrocito. En algunos casos de anemia microcítica, sobre todo en la deficiencia de hierro, se caracteriza por el aumento de ADE. Las talasemias por contraste, tienden a producir una población microcítica de eritrocitos sin que se incremente la ADE, aunque en el caso de la Hb H y la talasemia menor se han descrito elevaciones. El número de eritrocitos también puede ser útil en las talasemias, ya que éstas producen anemia microcítica asociada a un incremento en el número de eritrocitos. Otras causas de anemia microcítica, incluyendo el déficit de hierro y la anemia de las enfermedades crónicas, están más típicamente asociadas con descensos en el número de eritrocitos que es proporcional al grado de descenso en la concentración de hemoglobina. La concentración de hemoglobina disminuye en las talasemias. Las formas de talasemia menor provocan leves descensos en la concentración de

INTRODUCCIÓN

hemoglobina, mientras las formas intermedias y mayores muestran importantes descensos. En la β -talasemia, la electroforesis de hemoglobinas a pH alcalino constituye aún el procedimiento diagnóstico más rápido y asequible para identificar la β -talasemia menor o rasgo talasémico, que es la forma más frecuente en nuestro medio. El patrón característico consiste en un aumento de la fracción Hb A₂ (3,8%-7%) con Hb F normal. Cuando existe también un aumento de Hb F (> 2%), los criterios clínicos permiten orientar el diagnóstico hacia otras formas de β -talasemia, especialmente la intermedia (Tabla 6).

Tabla 6. Electroforesis de hemoglobinas en β -talasemias.

	Hb A %	Hb A₂ %	Hb F %
Normal	97	2-3	<1
β-talasemia menor	90-95	4-7	1-5
β-talasemia intermedia	30-50	0-5	50-70
β-talasemia mayor	0-25	0-5	70-100

En la α -talasemia, especialmente en sus formas de menor expresividad clínica (α^+ y α^0 talasemias) la existencia de una microcitosis poco acusada y electroforesis de hemoglobinas normal hace imprescindible recurrir a la biología molecular como único procedimiento diagnóstico en la práctica clínica. En la actualidad se dispone de técnicas basadas en la PCR específicas para las diferentes mutaciones conocidas y más frecuentes de α -talasemia en nuestro medio ($\alpha^{-3.7}$, $\alpha^{-4.2}$, α^{-SEA} y α^{-MED}). De esta forma se consigue una rápida

identificación de alguna de estas mutaciones en la muestra del paciente o, en caso contrario, iniciar la búsqueda de nuevas mutaciones. En caso de Hb H, la incubación de los eritrocitos con azul de cresilo brillante muestra siempre la aparición de precipitados intraeritrocitarios o cuerpos de Heinz. En cualquiera de los casos mencionados la síntesis *in vitro* de cadenas globina, técnica no al alcance de cualquier laboratorio dada su relativa complejidad, mostrará siempre una disminución del cociente α / β (< 1).

1.5. INDICACIONES TERAPÉUTICAS.

Dependen del tipo de hemoglobinopatía. La mayoría de los individuos afectados de hemoglobinopatías estructurales con alteración de la carga superficial, a excepción de la Hb S, carecen de manifestaciones clínicas o éstas son muy poco intensas, incluso en el estado homocigoto por lo que no requieren tratamiento. En otros casos, como, por ejemplo, las Hb M, afortunadamente indolentes desde el punto de vista clínico (sólo cursan con cianosis) carecen de tratamiento. Las hemoglobinopatías inestables, al igual que en el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) son asintomáticas hasta que el individuo entra en contacto con un agente oxidante. En ambos casos el mejor tratamiento es el preventivo evitando el contacto con las sustancias (medicamentos o ciertos alimentos) con acción oxidante. En algunas hemoglobinopatías con aumento de la afinidad por el oxígeno y que cursan

INTRODUCCIÓN

con eritrocitosis el tratamiento son las sangrías. Por su carácter benigno, no obstante, la gran mayoría de estas hemoglobinopatías no requieren tratamiento y la realización de sangrías debe limitarse a aquellos casos con valores muy elevados del hematocrito o un síndrome de hiperviscosidad. Las hemoglobinopatías con mayor impacto clínico son la talasemia mayor y la drepanocitosis o anemia falciforme. En ambos casos se hace muchas veces necesaria la realización de transfusiones periódicas con el consiguiente peligro de sobrecarga férrica.

Transfusiones

En general son más necesarias en la talasemia mayor y ciertas formas de talasemia intermedia que en la drepanocitosis debido a que en ésta existe un mayor grado de adaptación a la anemia. Las transfusiones pueden realizarse bajo régimen clásico o transfusión "a demanda" o en régimen de hipertransfusión. En el primer caso sólo se transfunde cuando la hemoglobina desciende por debajo de un determinado nivel ($< 7-8$ g/dl) y el segundo consiste en la práctica de tantas transfusiones como sean necesarias para evitar que la hemoglobina descienda por debajo de 10 g/dl. Las ventajas de este último son un mejor desarrollo óseo y una mayor calidad de vida del paciente, pero tiene el inconveniente de que produce una mayor acumulación de hierro en el organismo. Ambos regímenes transfusionales deben

acompañarse de un control clínico y biológico de la sobrecarga de hierro (sideremia, ferritina e índice de saturación de la transferrina) y administrar quelantes del hierro cuando la situación clínica lo haga aconsejable; entre ellos, el menos tóxico es el mesilato de desferroxiamina (DFO) y el procedimiento más empleado para la administración es la perfusión subcutánea lenta (durante toda la noche y mediante un sistema de bomba peristáltica) a dosis de 50-60 mg/kg (Abdelrazik et al., 2007).

Esplenectomía

En aquellos casos, generalmente no sometidos a régimen hipertransfusional, pero con intensa anemia crónica y esplenomegalia, es aconsejable la esplenectomía. Su indicación está siempre condicionada por la existencia de fenómenos de compresión mecánica sobre órganos vecinos, hiperesplenismo o demostración mediante estudio isotópico de una intensa captación eritrocitaria a nivel del área esplénica (Durakbasa et al., 2006) . En la Hb S homocigota, la esplenectomía prácticamente nunca es necesaria porque los fenómenos vasooclusivos de repetición que se producen en el bazo terminan con la práctica exclusión funcional del mismo (autoesplenectomía). En la talasemia mayor, aunque el bazo desempeña un papel fisiopatológico poco importante en el desarrollo de la anemia, la esplenectomía suele acompañarse de una disminución del requerimiento transfusional.

INTRODUCCIÓN

Agentes antidrepanocíticos

En la anemia falciforme el tratamiento debe ser, ante todo, preventivo, procurando evitar todas aquellas situaciones que favorezcan la aparición de crisis vasooclusivas (infecciones, acidosis, hipoxemia y exposición al frío). Igualmente, y de manera muy especial en los niños, debe prevenirse la aparición de infecciones secundarias mediante inmunización (vacunación) o administración profiláctica de antibióticos. Donde más se está investigando desde hace tiempo es en la prevención de las crisis vasooclusivas de la Hb SS mediante administración oral o parenteral de agentes antidrepanocíticos con la triple finalidad de disminuir la polimerización, aumentar la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y mejorar las propiedades reológicas de los eritrocitos. Entre ellos destacan los inductores de la síntesis de Hb F como la hidroxiurea (HU), un agente alquilante (inhibidor de la fase S del ciclo celular) empleado en el tratamiento de ciertos síndromes mieloproliferativos crónicos. La HU actúa favoreciendo el crecimiento selectivo de progenitores eritroides con mayor capacidad para sintetizar Hb F y reduce la frecuencia de las crisis vasooclusivas mejorando el estado clínico de los pacientes (Anderson et al., 2007).

Eritropoyetina

En la talasemia mayor e intermedia se ha ensayado con buenos resultados la administración de eritropoyetina recombinante humana (rHu EPO) a altas dosis. Es de señalar que a pesar de que los niveles plasmáticos de rHu EPO son ya de por sí elevados en ambas situaciones, el efecto de concentraciones aun más elevadas de rHu EPO produce una mejora de la eritropoyesis y disminuye la intensidad de la anemia (Chaidos et al., 2004).

Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de médula ósea (TMO) es una opción terapéutica potencialmente aplicable tanto a pacientes con anemia falciforme como a pacientes con talasemia mayor. El TMO (allogénico o autólogo) viene siendo empleado con éxito desde el año 1982 en pacientes con talasemia mayor y los resultados obtenidos señalan una mortalidad inferior al 10% y una supervivencia media libre de enfermedad a los cinco años de aproximadamente un 90%. Igualmente, la experiencia del TMO en la drepanocitosis demuestra que en los casos que cumplen los criterios requeridos (adolescentes menores de 16 años con complicaciones graves) y disponen de donante HLA-compatible, la supervivencia libre de complicaciones es de, aproximadamente, un 80%. Recientemente, se está incorporando de forma progresiva el trasplante a partir

INTRODUCCIÓN

de precursores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica del donante, del propio paciente (trasplante autólogo) o de sangre de cordón umbilical. En la Hb S homocigota, tanto el TMO o de sangre de cordón umbilical deben considerarse como opciones terapéuticas potencialmente curativas, ya que, a diferencia de los agentes anti-drepanocíticos, permite, en caso de éxito, una completa normalización de la síntesis de hemoglobina. Pese a ello, tanto el riesgo de mortalidad como el elevado coste económico hacen que esta opción terapéutica se reserve únicamente a aquellos casos incompatibles con una calidad de vida mínimamente aceptable (Bathia & Walters 2007).

Terapia génica

Constituye aún uno de los objetivos más preciados para el tratamiento de las enfermedades hereditarias. Las primeras experiencias realizadas en animales demuestran que los genes de globina vehiculizadas por un retrovirus pueden ser transferidos (transfección) a células hematopoyéticas humanas (Beuzard, 1996).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El aumento de hemoglobinopatías acontecido en los últimos años en nuestro país por los movimientos migratorios ha determinado la necesidad de ampliar los conocimientos clínicos, epidemiológicos y de diagnóstico que nos permitan afrontar mejor este problema de salud emergente.

La microcitosis es el dato de laboratorio clásico para la detección de talasemias y es el que se ha empleado durante años para la detección de portadores, mostrando una buena sensibilidad. Su confirmación mediante el incremento de la Hb A₂ permite realizar el diagnóstico de β -talasemia. Sin embargo, estos estudios nunca pueden ser realizados en el recién nacido dado que presenta cifras bajas o indetectables de Hb A₂, e incluso en los pacientes homocigotos para la β -talasemia, el diagnóstico no puede establecerse con seguridad hasta 3-6 meses tras el nacimiento. La única manera de poderlos diagnosticar con seguridad es mediante el análisis directo del gen con técnicas de biología molecular.

Por ello, nos planteamos el siguiente objetivo general:

Desarrollo y puesta a punto de un método nuevo basado en la reacción de extensión de una única base para la determinación simultánea (múltiplex)

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

de una manera simple, rápida y con una alta discriminación de las mutaciones más comunes en España asociadas a la β -talasemia (IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, CD8/9, CD6, CD37, CD39, IVSII-1 y la Hb S) usando la electroforesis capilar junto con la detección fluorescente, para el diagnóstico molecular tanto de pacientes β -talasémicos como de personas de riesgo o en la población general con objeto de poder usarse como una medida preventiva de esta enfermedad.

Con este fin, el trabajo de investigación presente se ha desarrollado en base a los siguientes objetivos específicos:

a) Diseño de oligonucleótidos específicos y análisis de las mutaciones relacionadas con la β -talasemia, mediante la incorporación específica por PCR en el punto exacto de la mutación de ddNTPs.

b) Análisis de los productos amplificados mediante electroforesis capilar y detección fluorescente.

c) Estudio de las frecuencias de presentación de las mutaciones asociadas al gen HBB.

MATERIAL Y MÉTODO

3. MATERIAL Y MÉTODO.

3.1. PACIENTES.

En el presente estudio hemos analizado 125 muestras de sangre de pacientes derivados al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario “San Cecilio”, con sospecha de β -talasemia, basada en la presencia de al menos uno de los siguientes criterios:

VCM <81 fl

HbA₂ >3.8 %

El estudio genético fue realizado con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes.

3.2. EXTRACCIÓN DEL DNA.

El DNA genómico fue extraído a partir de los leucocitos de 200 μ L de sangre periférica utilizando un equipo comercial de purificación de DNA, “DNA purification template” (Roche), según las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del DNA se realizó midiendo la absorbancia (A) a 260 nm en un espectrofotómetro UV (Jenway-Genova). Una unidad de absorbancia equivale, aproximadamente, a 50 ng/ μ L de DNA de doble hebra. Para determinar la pureza del DNA se calculó la relación entre la absorbancia

MATERIAL Y MÉTODO

a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}) que debe estar entre 1,7 y 1,9. Si es menor indica contaminación por proteínas.

3.3. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EL GEN HBB.

3.3.1. Obtención del amplicón.

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación de una región del DNA de tamaño y secuencia específicos (Mullis *et al.*, 1986). Se utilizaron dos cebadores sintéticos de 20 y 22 nucleótidos, complementarios a las zonas laterales de la región que queríamos amplificar. La secuencia de los cebadores se diseñó de tal forma que evitara la formación de híbridos, de estructuras secundarias y con una distribución equilibrada de bases.

Secuencia de los cebadores:

Directo: 5´AAAGTCAGGGCAGAGCCATC 3´

Indirecto: 5´GAAAGAAAACATCAAGGGTCCC 3´

CGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTA
CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCA
→ TCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGT
GAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGAC
 AGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTT
 CTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAG**GCTGCTGG**
TGGTCTACCCTTGGCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGAT
GCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTA
GTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCT
← GCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACCCT
 TGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGAGAAG

Figura 3.Región del gen HBB donde se encuentra las mutaciones analizadas. Las zonas en negrita corresponden a los exones 1 y 2. Las flechas representan los oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Tubos de 200 µL para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- dNTPs 10 mM de cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
- 2 cebadores 40 µM (Applied Biosystems) cada uno.

MATERIAL Y MÉTODO

- 10X PCR Buffer II (Applied Biosystems).
- $MgCl_2$ 25mM (Applied Biosystems).
- Termociclador GeneAmp PCR system 2400-Applied Biosystems.

Técnica:

Con el fin de poner a punto la reacción de amplificación se estudió un rango de valores para los siguientes parámetros de la mezcla de reacción por separado:

- Concentración mínima de DNA: 25, 50 y 100 ng
- Concentración de los cebadores: 0.1 y 0.2 μM

La mezcla de PCR, contenía en un volumen final de 25 μL : DNA, cebadores, 200 μM dNTPs, 1,5 mM de Cl_2Mg , 1 U Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), 1X buffer PCR II (contiene 10 mM Tris-HCl pH 8.3 y 50 mM KCl).

Por otro lado, se realizó la puesta a punto de los parámetros técnicos óptimos para el desarrollo de la amplificación. En este sentido se estudió:

- Temperatura de hibridación: 50, 55, 58, 59 y 60°C
- Ciclos: 30, 35 y 40 ciclos.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR Systems 2400 (Applied Biosystems).

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, 30-40 ciclos a 95 °C durante 30 s, con una temperatura de 50-60 °C durante 30 s y a 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C durante 7 min.

Las muestras obtenidas pueden ser usadas inmediatamente o guardadas a -20°C hasta su uso.

3.3.2. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para determinar las condiciones óptimas de amplificación.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Agarosa (Sigma ®).
- TAE 1X.
- Buffer de carga 6X Azul/Naranja (G190A, Promega).
- Bromuro de etidio (10 mg/mL) (Sigma®).
- Marcador de peso molecular (Lambda DNA/Hind III, Promega).

MATERIAL Y MÉTODO

Equipo:

- Cubeta de electroforesis (SCIE-PLAS).
- Fuente de alimentación (BIO RAD Power Pac 1000).
- Transiluminador UV.
- Horno microondas.
- Careta protección UV.

Técnica:

1. Se preparó una solución de agarosa al 1,5% en TAE 1X. Se calentó en un horno microondas hasta la fundición de la agarosa.
2. Se ensambló la cubeta y el peine.
3. Se dejó enfriar la solución de agarosa hasta 55°C aproximadamente. Se vertió sobre la cubeta y se eliminaron las burbujas.
4. Se añadió TAE 1X sobre la cubeta hasta cubrir el gel.
5. Se cargó cada pocillo con la mezcla de cada producto de PCR (50 μ L) y 10 μ L de buffer de carga.
6. Se realizó la electroforesis a 85 v, durante 30 min.
7. Se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0,5 μ g/mL durante 20 min.

8. Las bandas fueron visualizadas iluminando el gel con luz UV.

3.3.3. Limpieza de los productos amplificados.

A continuación se realizó la limpieza enzimática del producto de amplificación, con 1 U de Exonucleasa I y 1 U de Fosfatasa Alcalina (USB, suministrada por Amersham Biosciences), durante 30 min a 37 °C seguido de 15 min a 80 °C.

3.3.4. Detección SNaPShot.

Para esta segunda amplificación las secuencias de los cebadores (Tabla 7) se diseñaron para evitar la formación de híbridos y estructuras secundarias. Los cebadores fueron diseñados con tamaño suficientemente diferente (28, 25, 24, 35, 30, 23, 23 y 33 nt para las mutaciones CD6, CD8/9, IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, CD37, CD 39 y IVSII-1 respectivamente) para ser analizados posteriormente de un modo exacto en el analizador genético en dos reacciones multiplex (de forma simultánea).

MATERIAL Y MÉTODO

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados para la detección SNaPshot de las mutaciones CD6, CD8/9, IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, CD37, CD 39 y IVSII-1

Mutación	Secuencia del cebador
CD6	5' TATATATCCATGGTGCATCTGACTCCTG 3'
CD8/9	5' TTAGCATCTGACTCCTGAGGAGAA 3'
IVSI-1	5' ATGTGAGGCCCTGGGCAG 3'
IVSI-6	5'ATAATTATACCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGAT3'
IVSI-110	5' ATAATATGGCACTGACTCTCTCTGCCTATT 3'
CD37	5' TAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTT 3'
CD39	5' CCCAAAGGACTCAAAGAACCTCT 3'
IVSII-1	5' TTATTATATATCGTGGATCCTGAGAACTTCAGG 3'

Cada cebador se unirá complementariamente al DNA en presencia de ddNTPs (dideoxi NTPs) marcados fluorescentemente, [F]ddNTPs, (Tabla 8). La polimerasa sólo extenderá el producto de PCR en un nucleótido.

Tabla 8. Fluoróforos unidos a cada uno de los ddNTPs.

ddNTP	Fluoróforo	Color analizado
A	dR6G	Verde
C	dTAMRA™	Negro
G	dR110	Azul
T	DROX™	Rojo

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Tubos de 200 µL para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- SNaPshot multiplex Ready Reaction Mix™ (ABI Prims® SNaPshot™ Kit, Applied Biosystems).

- 8 cebadores 0.2 μM cada uno
- Termociclador GeneAmp PCR system 2400-Applied Biosystems.

Técnica:

Con el fin de poner a punto cada una de las reacciones de amplificación para cada ensayo (una para cada mutación), se estudió la concentración de los cebadores en un rango de 0.2-0.4 μM . La reacción de SNaPshot contenía, en un volumen final de 10 μL : 5 μL de “SNaPshot multiplex Ready Reaction Mix” (ABI Prims® SNaPshot™ Kit, Applied Biosystems), 3 μL del producto de amplificación y una concentración final de 0,2 a 0.4 μM de cebadores.

Además se estudió la temperatura de hibridación en un rango de 55-60°C con el siguiente programa de amplificación: 10 min a 95 °C, seguido de 15 s a 95 °C y a continuación 55-60 °C durante 1 min durante 30 ciclos.

Las muestras obtenidas pueden ser usadas inmediatamente o guardadas a -20°C hasta su uso.

Con el fin de eliminar los [F]ddNTPs no incorporados, se trata el producto de PCR con 0,5 U de Fosfatasa Alcalina, 1 h a 37 °C y a continuación 72 °C durante 15 min.

3.3.5. Electroforesis capilar y detección fluorescente.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystems.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Formamida desionizada (Hi Di™ Applied Biosystems).
- Marcador de peso molecular (GeneScan®-120 [LIZ]™ Applied Biosystems).
- Buffer con EDTA (ABI PRISM® 310 10X).
- POP-4™ (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystems).
- Capilar de sílice (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Capillary de 47 cm de longitud, 50 µm de diámetro, marcado en verde).
- Jeringa 1 mL.
- Dos viales 4 mL para el buffer y el agua.
- Gradilla 48 pocillos.
- Tubos 0,5 mL (Genetic Analyzer Applied Biosystems).
- Tapones (Applied Biosystems).
- Microcentrifuga (Centrifuge 5410 eppendorf).
- Termociclador (GeneAmp® PCR System 9600).
- Analizador genético ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems).

3.3.5.1. Preparación de los productos amplificados.

Previamente a la electroforesis se mezclaron en un tubo ABI 310 de 0,5 mL: 1 μ L del producto amplificado, 13,5 μ L de formamida desionizada y 0,5 μ L del marcador de pesos moleculares GeneScan®-120 [LIZ]TM (15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110, 120). Las muestras se llevaron al termociclador a 95°C para su desnaturalización, durante 3 min e inmediatamente después se pusieron en hielo.

3.3.5.2. Preparación del equipo.



Analizador genético ABI 310.

Antes de inyectar las muestras en el analizador es necesario realizar los siguientes pasos:

1. Establecer comunicación entre el ordenador y el analizador.

MATERIAL Y MÉTODO

2. Abrir el software de recogida de datos “ABI PRISM™ 310 Collection”. Este programa recoge el dato crudo del análisis de los fragmentos en cada carrera. El dato crudo es la fluorescencia detectada por la cámara CCD de los fragmentos marcados, separados en el capilar por electroforesis y excitados por el láser al pasar por la ventana de detección.
3. Colocar el bloque de metacrilato limpio y seco.



Interior del analizador genético ABI 310.

4. Colocar el capilar. Antes de su colocación se limpia la ventana del capilar con un papel embebido en etanol absoluto. Tras limpiar la ventana se introduce el capilar en la válvula que lo conecta con el bloque de metacrilato hasta llegar a la primera intersección y se aprieta bien la válvula; es importante no rebasar esta primera

intersección para que el polímero pueda penetrar en el capilar. A continuación se sitúa la zona de lectura del capilar en la ventana del láser y se cierra la puerta del láser, se introduce el otro extremo en la parte que contiene el electrodo negativo o cátodo y se desliza hasta que queden a la misma altura. Por último se sujeta el capilar con una cinta adhesiva contra la placa térmica.

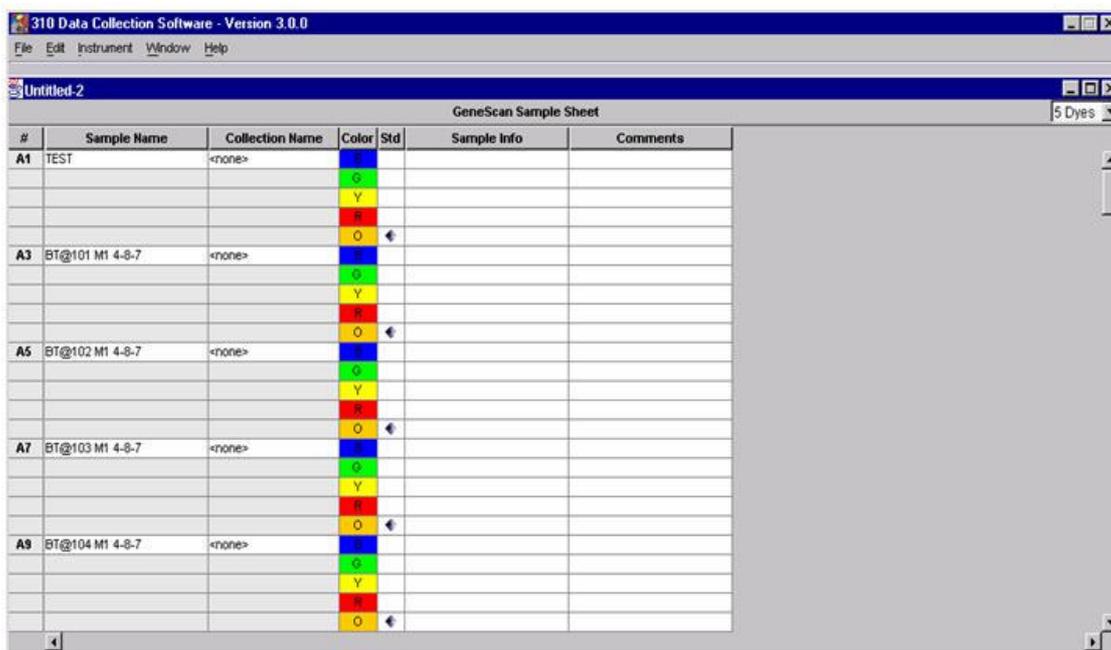
5. Establecer la posición de la jeringa y el “autosampler”. Calibración del “autosampler”.
6. Preparar 15 mL de buffer 1X y llenar los viales de buffer del cátodo y ánodo hasta la marca.
7. Relleno del capilar y del bloque de metacrilato con el polímero. El polímero utilizado para el análisis de fragmentos es el POP-4 y se mantiene a 4-8°C. Media hora antes de su uso, se saca del frigorífico para que se atempere. Con la jeringa bien limpia se toma el volumen de polímero necesario en función del número de muestras, se enrosca bien para evitar pérdida de polímero y se llenan los conductos del bloque de metacrilato evitando la formación de burbujas de aire.

MATERIAL Y MÉTODO

3.3.5.3. Programación de las muestras.

3.3.5.3.1. Hoja de muestras (“sample sheet”).

Una vez abierto el programa ABI PRISM® 310 Collection se abre una nueva hoja de muestras donde se introducirá los datos de cada muestra y su posición en la gradilla. Se indicará que trabajaremos con cinco colores (figura 4). Se guarda la hoja en su carpeta correspondiente y se procede a la realización de la lista de inyección.



#	Sample Name	Collection Name	Color	Std	Sample Info	Comments
A1	TEST	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
			O			
A3	BT@101 M1 4-8-7	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
			O			
A5	BT@102 M1 4-8-7	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
			O			
A7	BT@103 M1 4-8-7	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
			O			
A9	BT@104 M1 4-8-7	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
			O			

Figura 4. Hoja de muestras “sample sheet”.

3.3.5.3.2. Lista de inyección

En esta lista se incorpora la hoja de muestras creada, en ella es posible modificar el orden de inyección de las muestras e incluso repetir algunas de las muestras, cambiando alguno de los parámetros, como el tiempo de inyección. La primera columna indica los datos de las muestras. La segunda columna especifica el módulo de análisis el cual contiene las funciones específicas ejecutadas para el proceso de análisis de las muestras (figura 5). Para nuestro caso el módulo seleccionado es el GS STR POP4 (1mL) E5.md4. Este módulo establece unas condiciones de electroforesis que pueden ser modificadas:

- Voltaje y tiempo de inyección (para inyección electrocinética): ambos parámetros pueden ser variados para regular la cantidad de DNA que entre en el capilar. Así, en el caso de obtener una señal débil en una muestra es posible aumentar el tiempo de inyección para permitir que se inyecte más cantidad de producto amplificado al capilar y que aumente la señal de fluorescencia. No obstante, un tiempo de inyección excesivo puede originar una pérdida de resolución. Se estimó un tiempo de 5 segundos.
- Voltaje de electroforesis: el voltaje estándar es 319 V/cm para fragmentos analizados utilizando el polímero POP-4. Para un

MATERIAL Y MÉTODO

capilar de 47 cm esto supone un voltaje total de 15 KV y la corriente a este voltaje es de 7-9 μ A. Bajo estas condiciones electroforéticas el tiempo necesario para que un fragmento de 400 pb llegue a la ventana de detección es de unos 25 min aproximadamente.

- Temperatura de electroforesis: para análisis de fragmentos esta temperatura debe ser de 60°C.
- Tiempo de electroforesis: normalmente el tiempo de electroforesis programado es un 10% superior a la media del tiempo necesario para que migre el fragmento de mayor tamaño que nos interese. Se estimó un tiempo de 24 min.



The screenshot shows the 'GeneScan Injection Sheet' software interface. At the top, it displays '310 Data Collection Software - Version 3.0.0'. Below the menu bar, there are fields for 'Sample Sheet' (Sample Sheet-Tue Feb 05 10-...), 'Length to Detector' (30 cm), and 'Operator' (J. Antonio Gomez Capilla). A table lists injection parameters for 7 injections. The table has columns for Inj.#, Tube & Sample Name, Module, Inj. Secs, Inj. kV, Run kV, Run °C, Run Time, and Matrix File.

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run °C	Run Time	Matrix File
1	A1 - TEST	Seq Fill Capillary.mds	0	0.0	0.0	0		0\GS_Matrix_C.mtx
2	A1 - TEST	Test CCD 5-Color.mds	0	0.0	0.0	0		5\GS_Matrix_C.mtx
3	A3 - BT@101 M1 4-8-7	GS STR POP4 (1 mL) E5.m...	5	15.0	15.0	60		24\GS_SNP_E_Scolores.mtx
4	A5 - BT@102 M1 4-8-7	GS STR POP4 (1 mL) E5.m...	5	15.0	15.0	60		24\GS_SNP_E_Scolores.mtx
5	A7 - BT@103 M1 4-8-7	GS STR POP4 (1 mL) E5.m...	5	15.0	15.0	60		24\GS_SNP_E_Scolores.mtx
6	A9 - BT@104 M1 4-8-7	GS STR POP4 (1 mL) E5.m...	5	15.0	15.0	60		24\GS_SNP_E_Scolores.mtx
7	A1 - TEST	Seq Fill Capillary.mds	0	0.0	0.0	0		0\GS_Matrix_C.mtx

Figura 5. Hoja de inyección.

Antes de comenzar la inyección de las muestras se llevan a cabo dos funciones en el analizador: primero relleno del capilar (“Seq fill capillary”) y a continuación el test de los cinco colores (“Test CCD 5-Color”) cuya función es comprobar que la ventana del capilar está limpia y colocada correctamente. Este test tiene una duración de 5 minutos y en el debemos comprobar que la línea basal de los cinco colores está entre 800 y 2500 en escala vertical (intensidad de fluorescencia). Una vez completada la lista de inyección y habiéndose alcanzado la temperatura de electroforesis, se inicia el análisis pulsando el comando “run”.

3.3.5.4. Análisis de los resultados.

Los fragmentos se analizaron con el filtro E y su matriz correspondiente (matriz matemática que corrige el solapamiento espectral de la emisión fluorescente) GS_Matriz_E.mtx. Se utilizó el programa ABI PRISM® GeneScan v3.7.1 (Applied Biosystems) para determinar con exactitud el tamaño. Esto es posible gracias a la comparación de la movilidad electroforética de cada producto de amplificación con la curva de calibración creada con los fragmentos del estándar analizados simultáneamente en cada muestra.

3.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE DNA.

El tamaño de los fragmentos de DNA que detecta cada una de las mutaciones se determinó de forma empírica, para ello se usó el kit SNaPshot® Primer Focus™ (Applied Biosystems).

Procedimiento:

Master Mix por reacción:

- SNaPshot® Primer Focus™ ddNTP...4 µl
- SNaPshot® Primer Focus™ 10X Reaction Buffer...1µl
- SNaPshot® Primer Focus™ Cofactor...1 µl
- SNaPshot® Primer Focus™ Enzyme...0,1 µl
- Agua desionizada...2,9 µl

Para cada reacción, se añade a los 9 µl de Master Mix, 1 µl de cebador 2 µM.

El programa de amplificación fue el siguiente: 37 °C durante 15 min seguido de 10 min a 70°C.

La limpieza de los productos y electroforesis se realizó de acuerdo al procedimiento anteriormente detallado.

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EL GEN HBB.

La técnica de la PCR permite obtener copias de un fragmento de DNA de un modo exponencial, mediante una serie de etapas sucesivas de desnaturalización de la doble hebra de DNA, emparejamiento de cebadores específicos y extensión por parte de una DNA polimerasa. Esta amplificación permite obtener material para el posterior análisis de mutaciones.

Con el fin de llevar a cabo el diagnóstico molecular de las mutaciones en el gen HBB, hemos puesto a punto una técnica basada en la detección fluorescente y la electroforesis capilar. En concreto, es un ensayo de extensión de una única base, que comprende dos reacciones de amplificación:

En la primera reacción se amplifica el fragmento de DNA que comprende las mutaciones objeto de estudio (CD6, CD8/9, IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, CD37, CD 39 y IVSII-1). El amplicón obtenido se encuentra en solución junto con el enzima Taq polimerasa, los componentes del buffer, los cebadores y los dNTPs que no hayan reaccionado. Para evitar la participación de los cebadores y los dNTPs en la reacción de extensión de un solo nucleótido, estos se eliminan respectivamente con las enzimas exonucleasa y con la fosfatasa alcalina.

RESULTADOS

En la segunda reacción, reacción de extensión de un solo nucleótido, los cebadores difieren en su longitud para evitar el solapamiento entre los productos que se obtengan. Cada cebador se une complementariamente al DNA. En presencia de ddNTPs marcados fluorescentemente ([F]ddNTPS), la polimerasa sólo extenderá el producto de PCR en un nucleótido.

Para las mutaciones IVSI-1, IVSI-110, CD37, CD 39 y IVSII-1 se incorporará un nucleótido de guanina (marcado en azul) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de adenina (marcado en verde) en el caso de un alelo mutado. Para las mutaciones CD6 y IVSI-6 se incorporará un nucleótido de adenina (marcado en verde) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de guanina (marcado en azul) en el caso de un alelo mutado y finalmente para la mutación CD8/9 se incorporará un nucleótido de timina (marcado en rojo) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de guanina (marcado en azul) en el caso de un alelo mutado.

Los [F]ddNTPs que no se incorporen pueden migrar junto con los fragmentos objeto de nuestro estudio. Para evitar esta interferencia se eliminan mediante un tratamiento con fosfatasa alcalina.

El análisis de las muestras se realiza mediante electroforesis capilar y detección fluorescente y los datos obtenidos se analizan con el software GeneScan v3.7.1. Para que el análisis sea satisfactorio y robusto, se utilizó un

marcador interno de peso molecular marcado con el fluoróforo LIZ [GeneScan 120 LIZ (15-120 nt)] especialmente diseñado para ser usado en la detección de fragmentos pequeños.

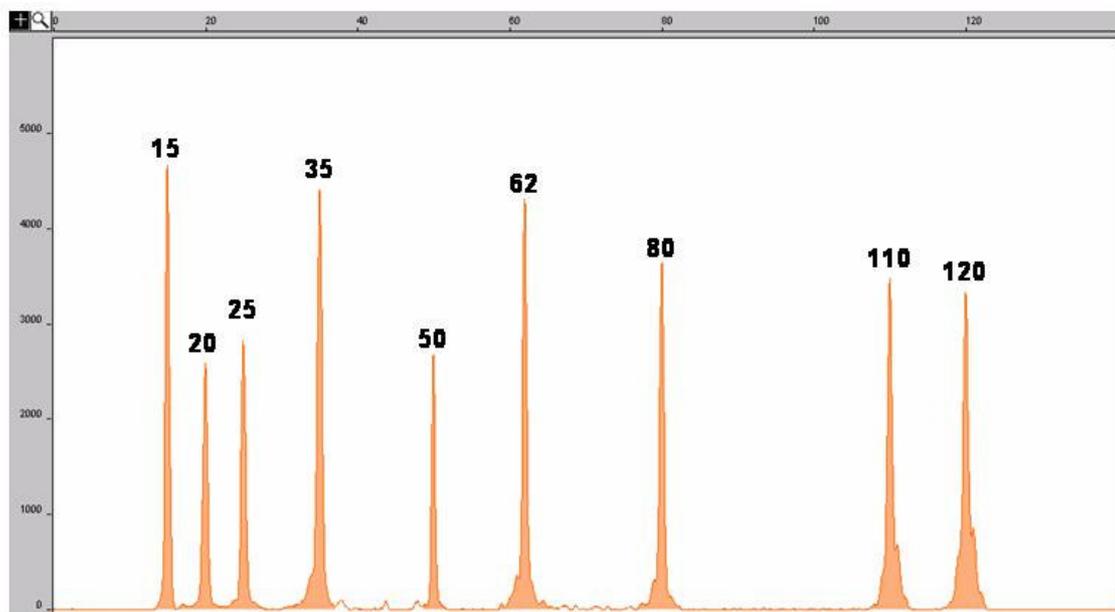


Figura 4. Electroforegrama del marcador interno GeneScan 120 LIZ de pesos moleculares con la asignación específica del tamaño de los picos usados para el análisis de las muestras.

A cada fragmento específico del marcador interno se le asigna su tamaño correspondiente y esta información se utiliza por el *software* para construir una curva patrón usando el método *Local Southern*, que determina el tamaño de fragmentos usando la relación recíproca entre la longitud del fragmento y su movilidad (Figura 5).

RESULTADOS

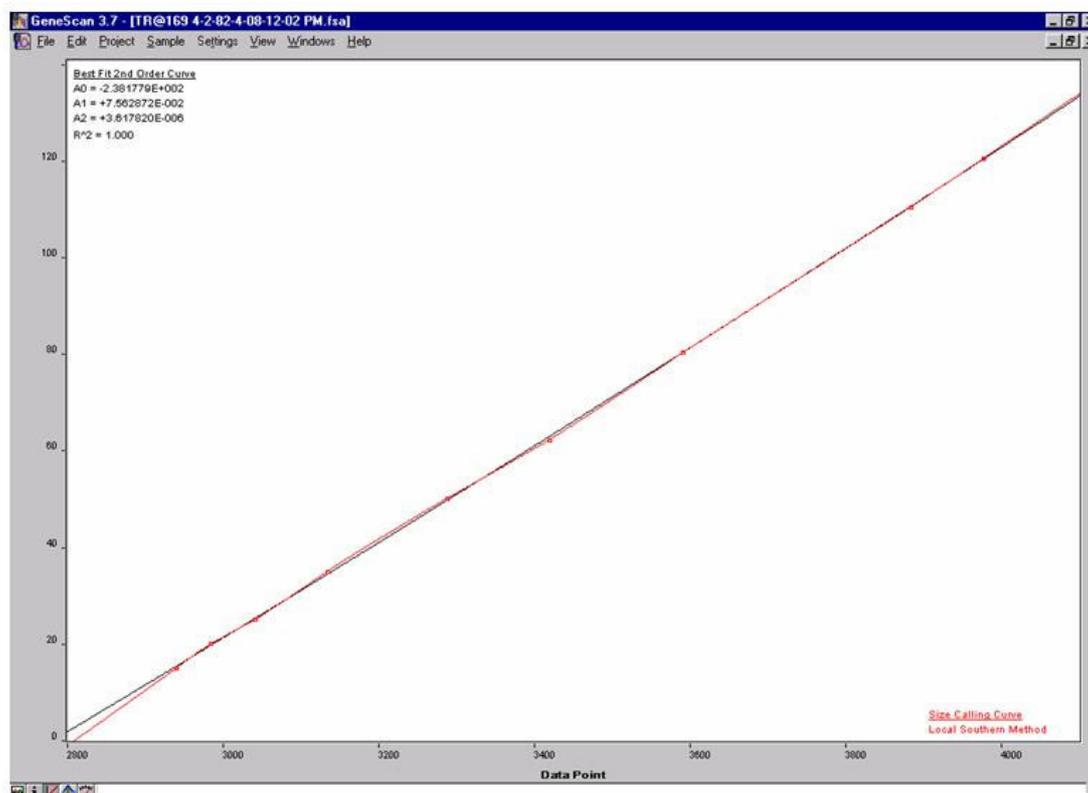


Figura 5. Curva patrón del marcador interno de peso molecular GeneScan LIZ 120.

Los fluoróforos usados en el marcaje de los ddNTPs modifican la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA, así, los tamaños obtenidos tras el análisis diferirán en unas pocas bases del tamaño real. Esto es debido a que la contribución relativa del fluoróforo en la movilidad electroforética es mayor en los fragmentos cortos. Para conocer los tamaños de los fragmentos de DNA se realizó una reacción SNaPshot® PrimerFocus para cada cebador (Tabla 9) (Figura 6-13).

Tabla 9. Tamaño de los alelos de cada mutación.

MUTACIÓN	ALELO NORMAL (nt)	ALELO MUTADO (nt)
CD6	34.43	31.98
CD8/9	31.75	30.32
IVSI-1	22.39	24.74
IVSI-6	38.49	37.33
IVSI-110	33.28	35.11
CD37	26.67	29.77
CD39	23.87	26.23
IVSII-1	36.29	37.99

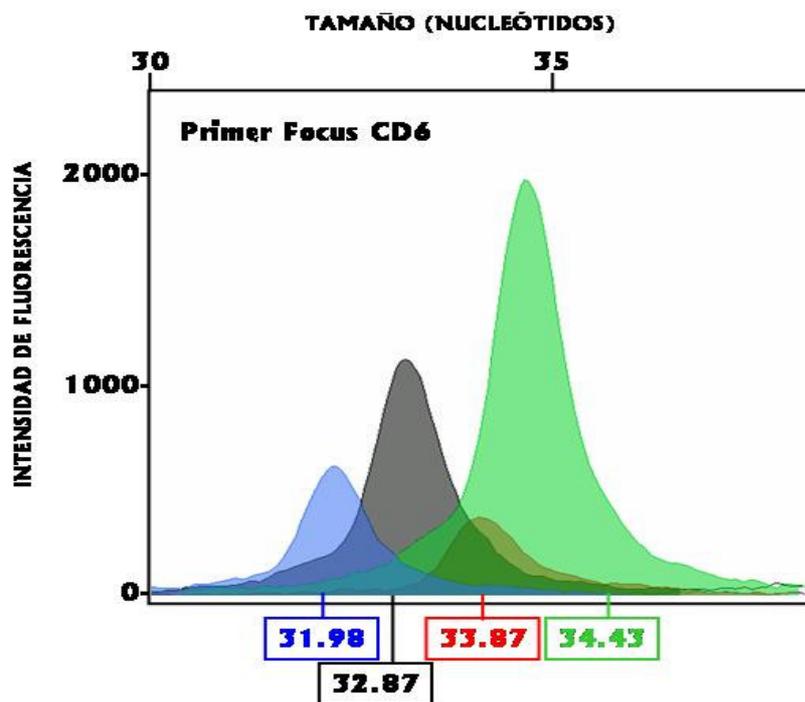


Figura 6. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación CD6.

RESULTADOS

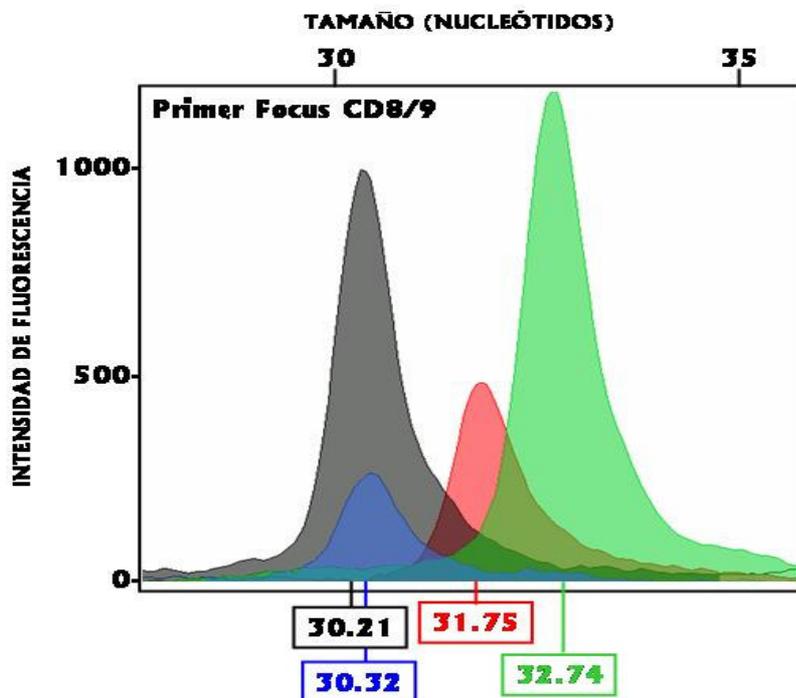


Figura 7. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación CD8/9.

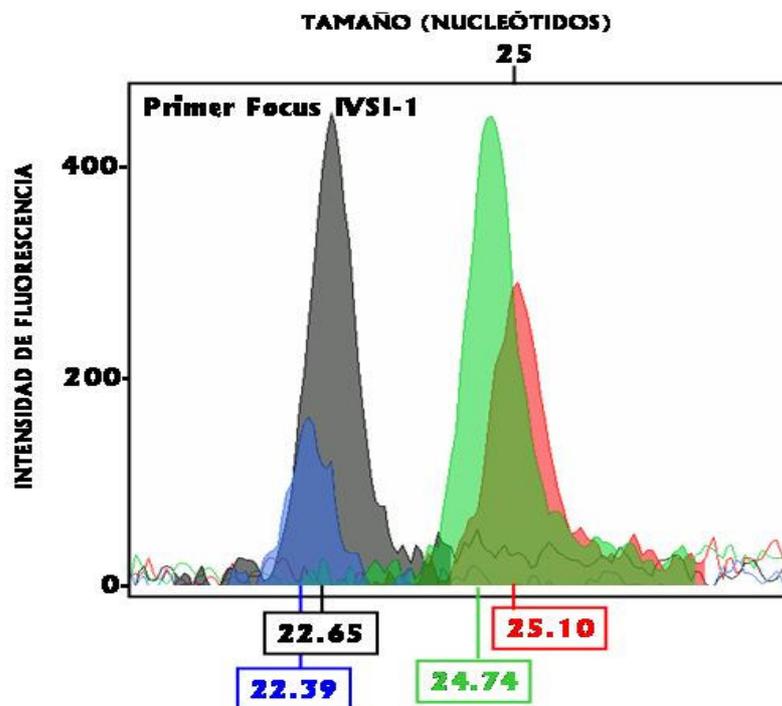


Figura 8. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación IVSI-1.

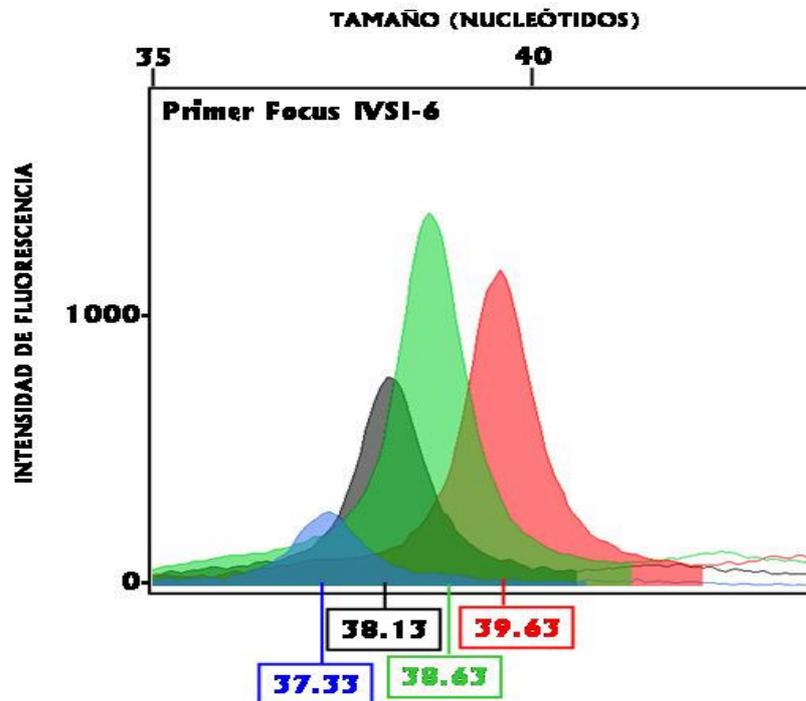


Figura 9. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación IVSI-6.

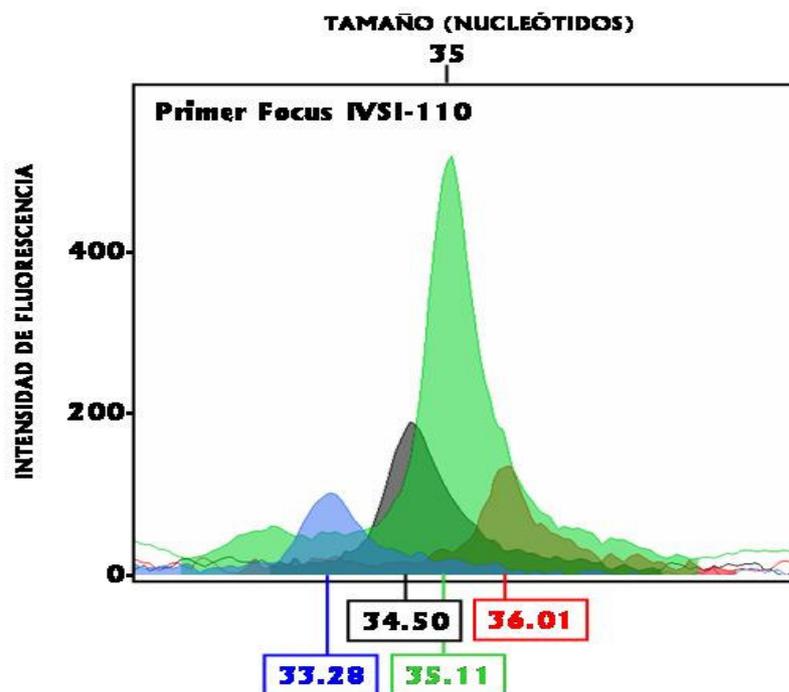


Figura 10. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación IVSI-110.

RESULTADOS

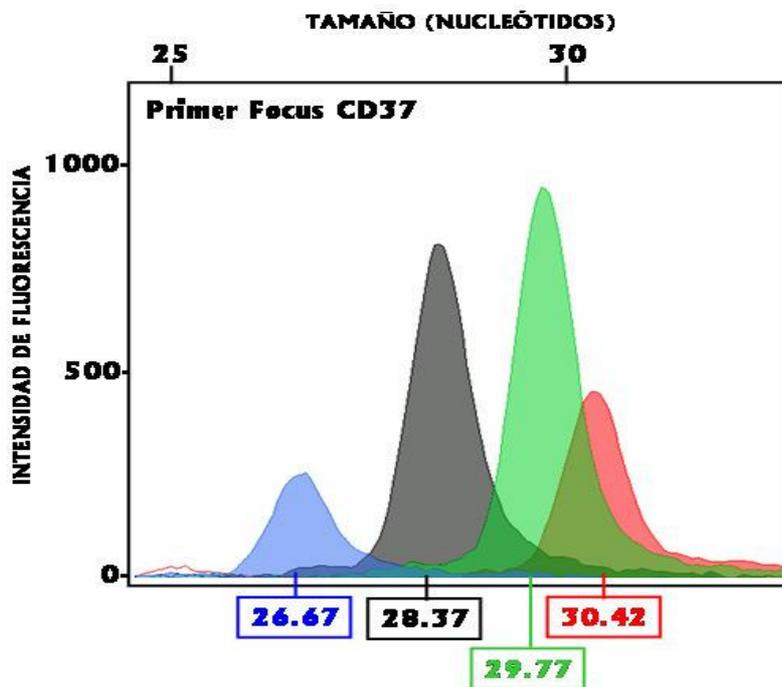


Figura 11. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación IVSI-110.

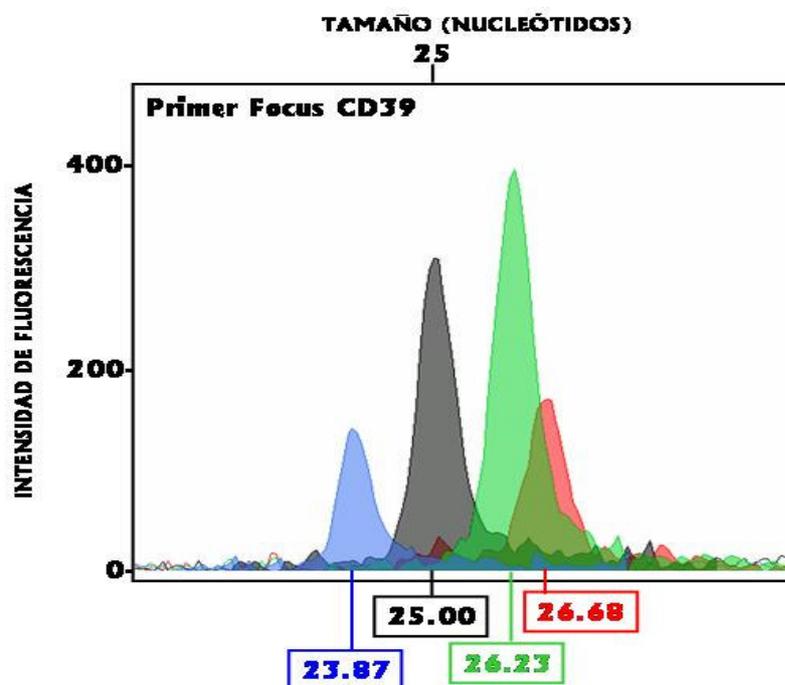


Figura 12. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación CD39.

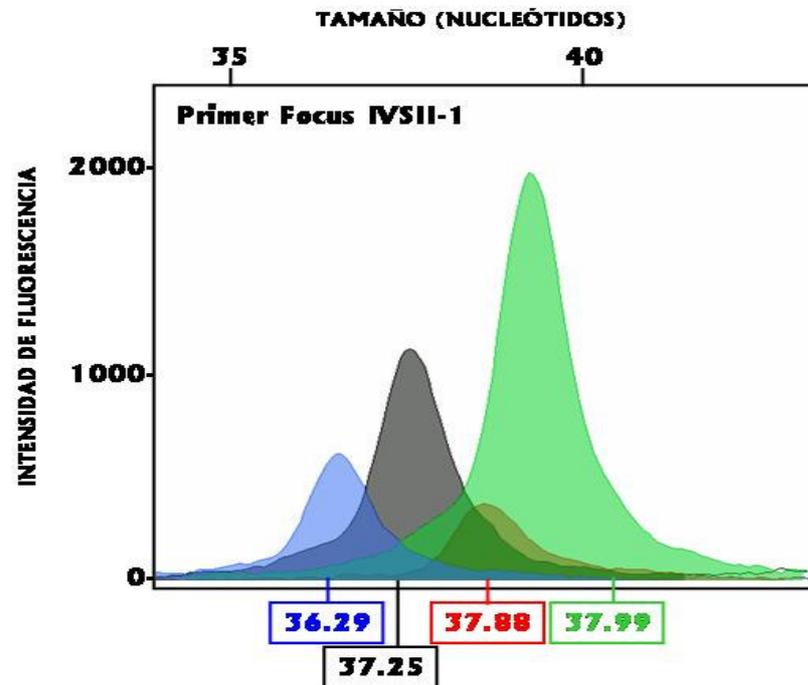


Figura 13. Electroforegrama de la reacción de Primer Focus correspondiente a la mutación IVSII-1.

Las condiciones óptimas para la amplificación del amplicón donde se encuentran las mutaciones objeto de estudio, de acuerdo con lo expuesto en el apartado Material y Método, fueron las siguientes:

Concentración DNA 50 ng

Concentración de los cebadores: 0,2 μ M.

Temperatura de hibridación: 55°C

Ciclos: 30

RESULTADOS

Las condiciones óptimas para el ensayo de extensión de un único nucleótido, de acuerdo con lo expuesto en el apartado Material y Método, fueron las siguientes:

Temperatura de hibridación: 59°C

Ciclos: 30

Concentración de cebadores: 0,2 µM

La aplicación de este método en una muestra de DNA perteneciente a un individuo que no presenta ninguna de las mutaciones objeto de estudio se distingue:

- a) cuatro picos en la multiplex 1 (M1), el primer pico (azul) corresponde al alelo normal para la mutación IVSI-1, el segundo pico (azul) corresponde al alelo normal para la mutación CD37, el tercer pico (verde) corresponde al alelo normal para la mutación CD6 y el cuarto pico (verde) corresponde al alelo normal para la mutación IVSI-6 (Figura 14).
- b) cuatro picos en la multiplex 2 (M2), el primer pico (azul) corresponde al alelo normal para la mutación CD39, el segundo pico (rojo) corresponde al alelo normal para la mutación CD8/9, el

tercer pico (azul) corresponde al alelo normal para la mutación IVSI-110 y el cuarto pico (azul) corresponde al alelo normal para la mutación IVSII-1 (Figura 15).

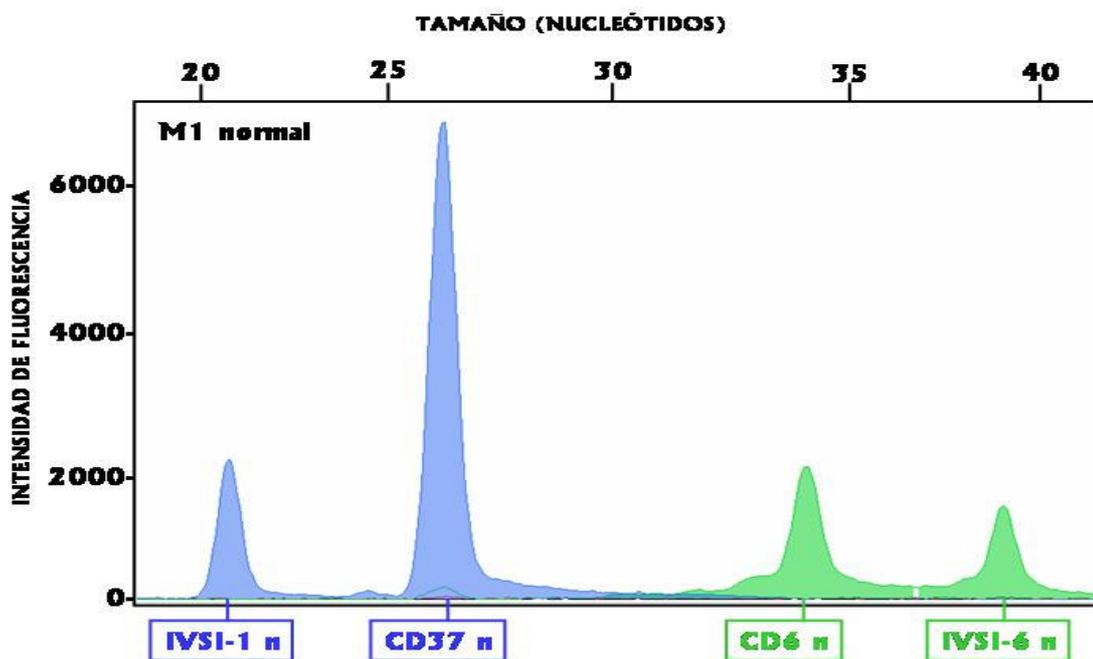


Figura 14. Electroforegrama de la multiplex 1 de un individuo con alelo normal para las mutaciones estudiadas.

RESULTADOS

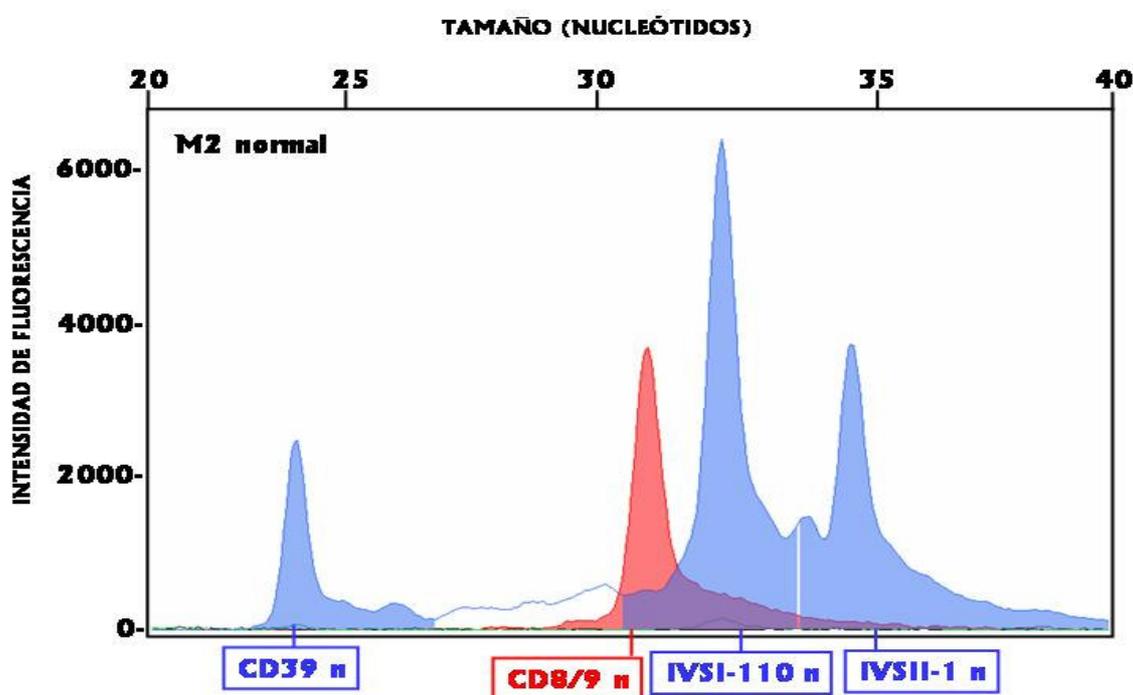


Figura 15. Electroforegrama de la multiplex 2 de un individuo con alelo normal para las mutaciones estudiadas.

En el análisis multiplex de las muestras de DNA de los 125 individuos estudiados se detectaron los siguientes genotipos: IVSI-1 heterocigoto, CD8/9 heterocigoto, IVSI-6 homocigoto, IVSI-110 heterocigoto, CD39 heterocigoto y HbAS, cuyos resultados se muestran respectivamente en las figuras 16, 17, 18, 19, 20 y 21, donde “m” indica alelo mutado y “n” alelo normal.

En el caso de que no exista alteración alguna en el amplicón correspondiente para la detección de la mutación CD6, en el ensayo de extensión de un nucleótido usado por nosotros, se unirá un ddATP al cebador

usado para detectar la posible alteración dando lugar en el electroforegrama a un pico de color verde. En el caso de que se produzca la delección del nucleótido de adenina causante de la mutación CD6 el ddNTP que se une al cebador en este caso es el ddGTP y por lo tanto da lugar en el electroforegrama a un pico de color azul. Cuando la alteración se produce por el cambio de la adenina por una timina entonces este cambio produce la anemia falciforme y el pico resultante es de color rojo (figura 21).

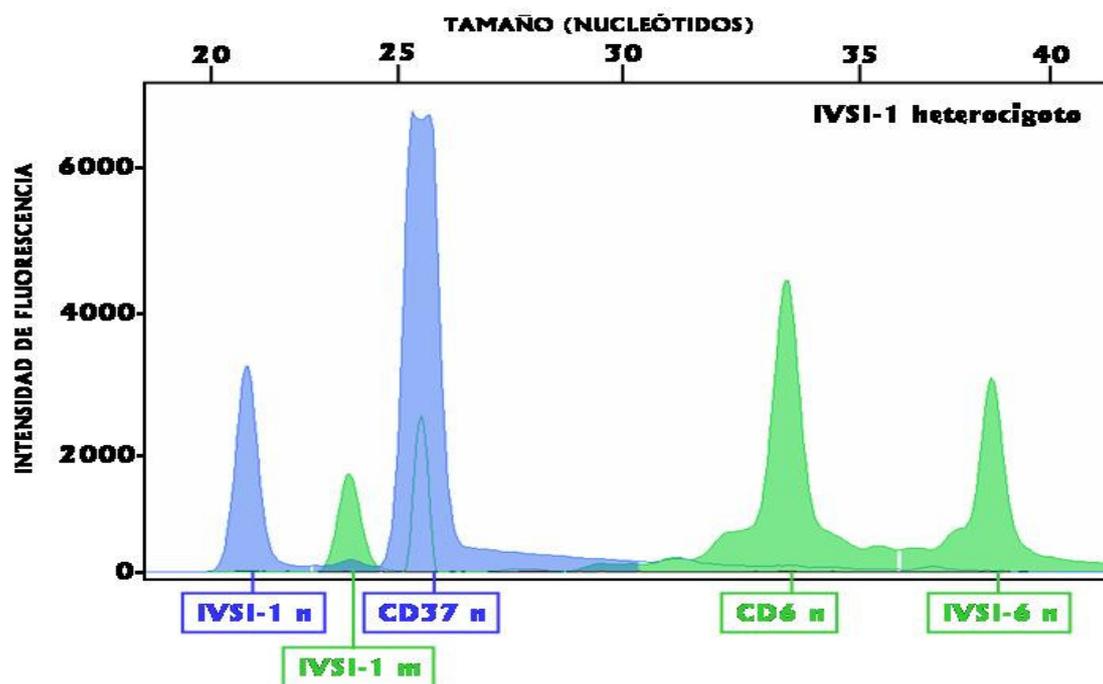


Figura 16. Electroforegrama de la multiplex 1 de un individuo heterocigoto para la mutación IVSI-1.

RESULTADOS

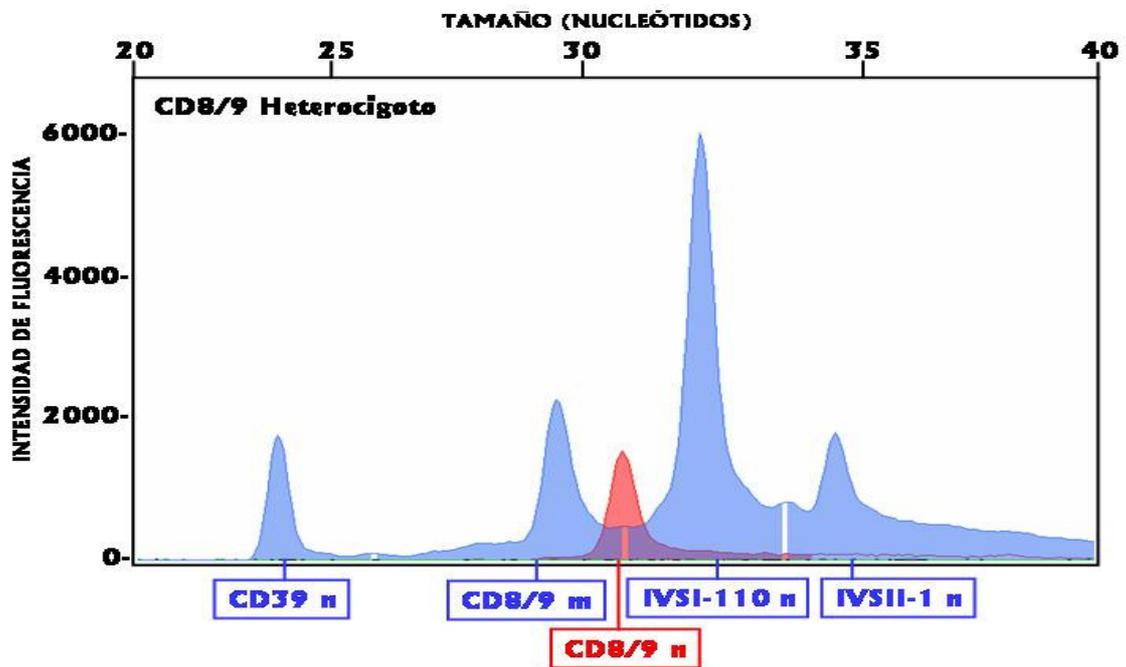


Figura 17. Electroforegrama de la multiplex 2 de un individuo heterocigoto para la mutación CD8/9.

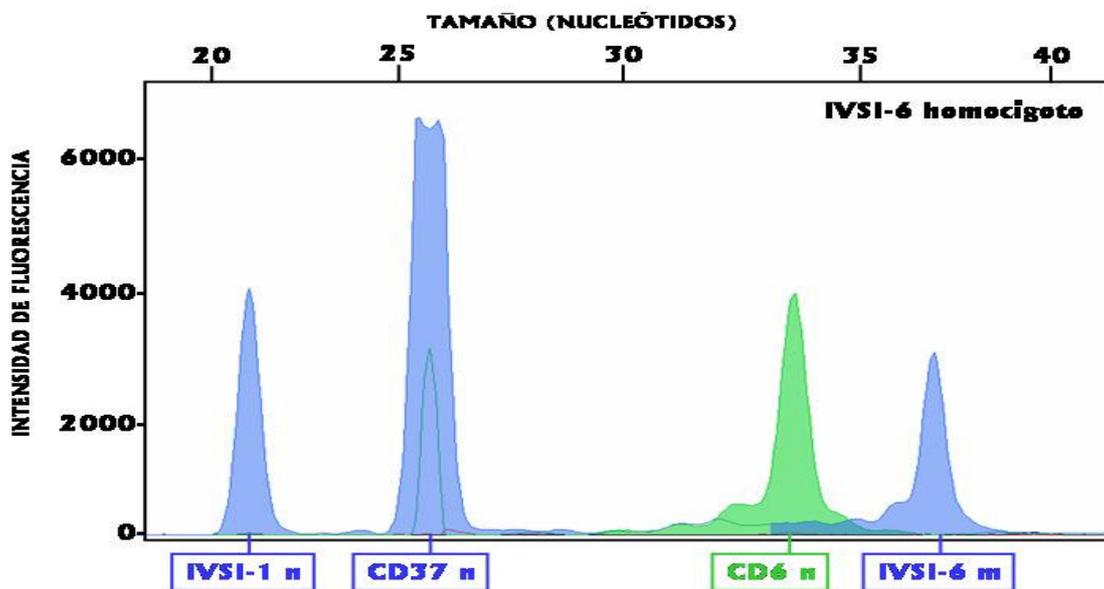


Figura 18. Electroforegrama de la multiplex 1 de un individuo homocigoto para la mutación IVSI-6.

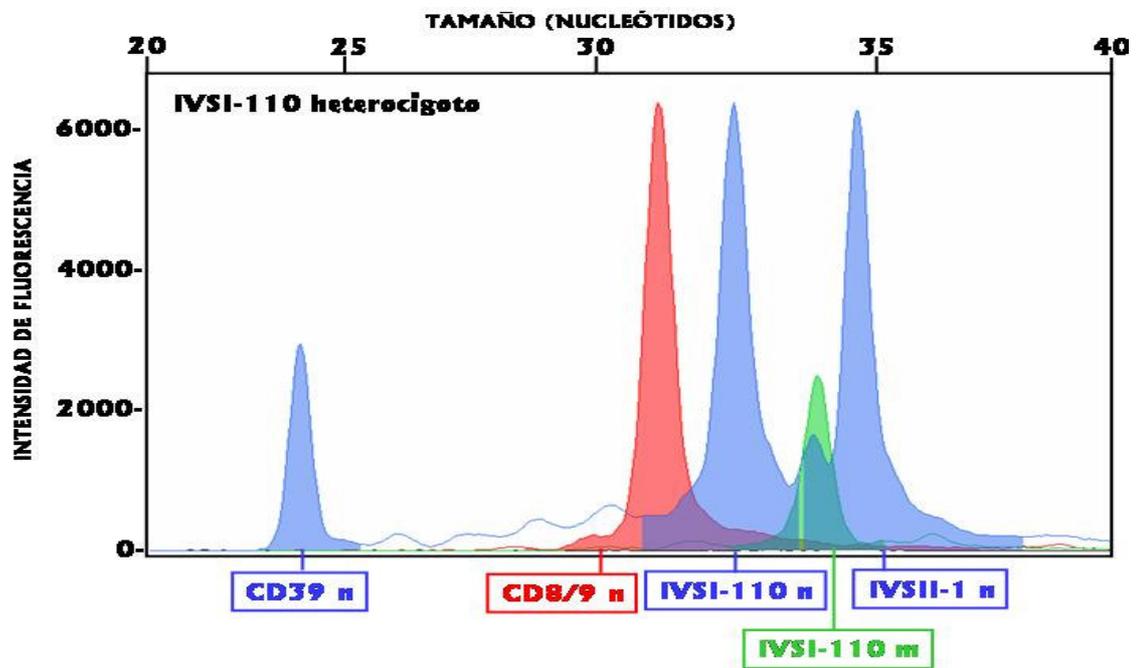


Figura 19. Electroforegrama de la multiplex 2 de un individuo heterocigoto para la mutación IVSI-110.

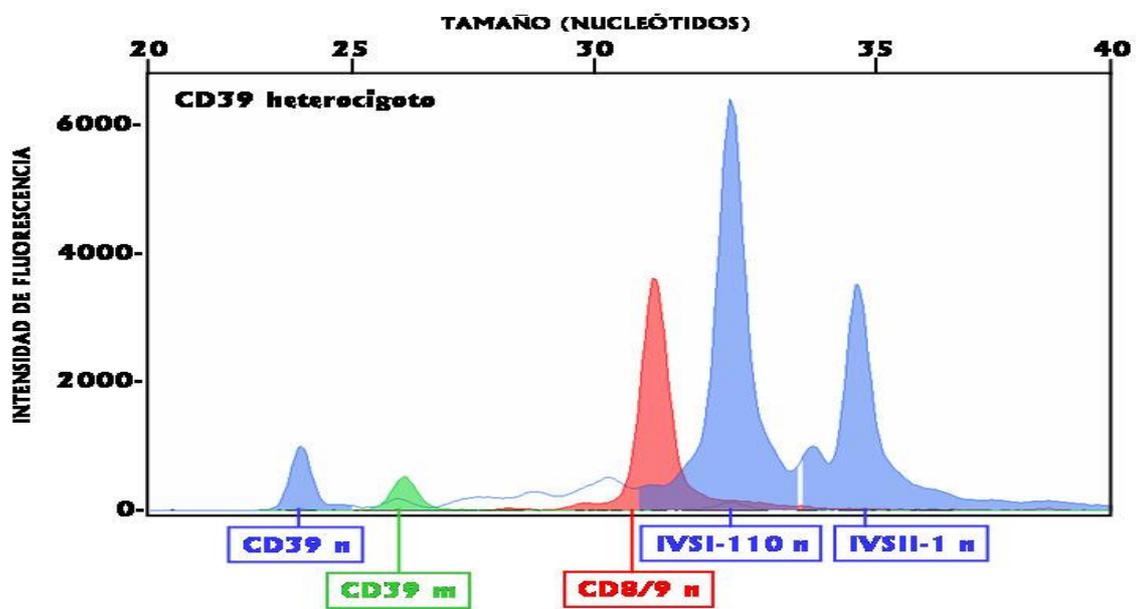


Figura 20. Electroforegrama de la multiplex 2 de un individuo heterocigoto para la mutación CD39.

RESULTADOS

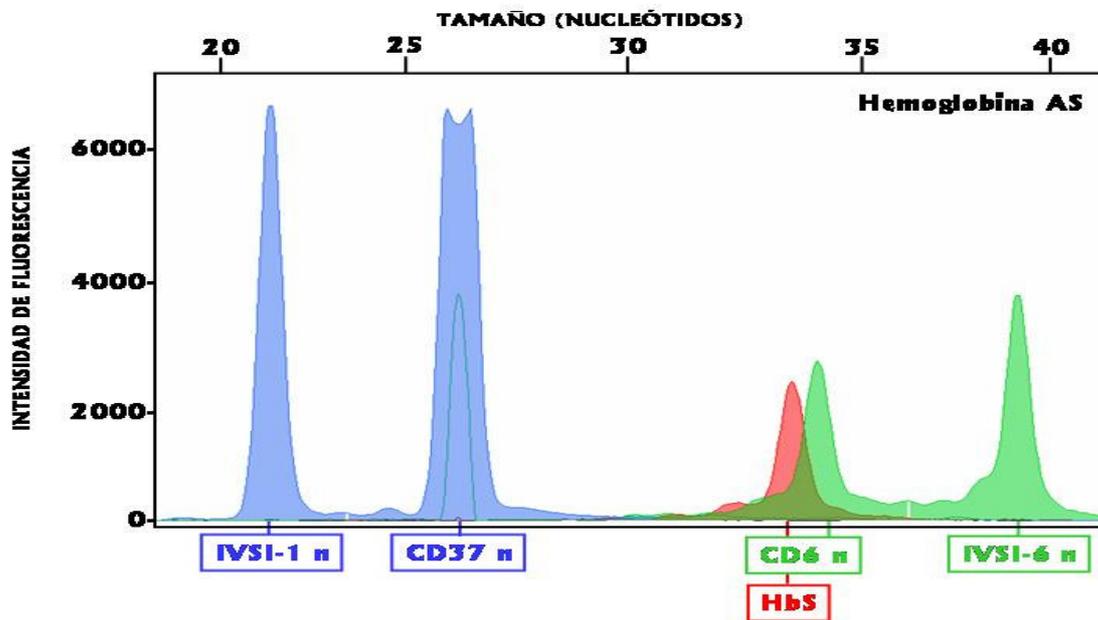


Figura 21. Electroforegrama de la multiplex 1 de un individuo heterocigoto para la HbS.

4.2. PACIENTES.

Este método se utilizó para la caracterización molecular de β -talasemia de 125 individuos del sur de España cuyos resultados se recogen en la tabla 10.

RESULTADOS

Tabla 10. Caracterización molecular de las mutaciones estudiadas asociadas a la β -talasemia.

Mutaciones	Alelos	%	Fenotipo
IVSI-1	13	16.6	β^e
IVSI-6	4	5.1	β^+
IVSII-1	0	0	β^e
IVSI-110	15	19.2	β^+
CD6	0	0	β^e
CD8/9	10	12.8	β^e
CD37	0	0	β^e
CD39	35	44.8	β^e
HbAS	1	1.3	

Tabla 11. Distribución regional de β -talasemia en España (Villegas, et al., 2001) en comparación con la llevada a cabo en nuestro estudio.

Mutaciones	Andalucía	Cataluña	Huelva	Valencia	Mallorca	España	Este estudio
IVSI-1	22.3	13.0	55.6	9.3	3.1	3.5	16.6
IVSI-6	8.9	10.2	5.6	16.3	-	15.5	5.1
IVSII-1	-	-	-	-	-	-	0
IVSI-110	26.7	8.8	-	4.7	24.2	8.5	19.2
CD6	-	2.9	-	18.6	20.4	5.0	0
CD8/9	-	-	-	-	-	-	12.8
CD37	-	-	-	4.7	-	1.7	0
CD39	31.1	43.2	33.3	44.2	45.9	64.0	44.8

RESULTADOS

Tabla 12. Media de los datos hematológicos de los pacientes a quienes se detectó alguna mutación.

Datos hematológicos	Rango normal	MUTACIONES					
		IVSI-1	IVSI-6	IVSI-110	CD8/9	CD39	HbAS
Hematíes (10 ⁶ /μl)	4.2-5.4	5.9	5.5	5.6	6.1	5.7	4.5
Hb (g/dl)	12-16	12.1	11.9	11.8	12.1	11.3	10.8
VCM (fl)	81-99	64.2	67.3	65.6	64	63	76.4
HCM (pg)	27-31	20.4	21.6	21.2	20.1	19.8	24.3
ADE (%)	11.5-14.5	15.6	19.9	15.5	15.1	16	15.9
CHCM (g/dl)	33-37	31.9	32.1	32.4	31.3	35.5	31.8
Ferritina (ng/ml)	30-400	146	170	93	133	75	3
HbA₂ (%)	<3.8	4.5	4.5	4.6	4.5	4.7	4.5
HbF (%)	0-2	1.1	3.9	0.43	0.9	1.1	0.5

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

Los rápidos avances que se están consiguiendo en la comprensión de la vida a nivel molecular, están cambiando en muchos aspectos la medicina.

En la actualidad es posible conocer las diferencias entre la secuencia de DNA de un gen normal y de su alteración responsable de una enfermedad, lo que ha permitido diseñar pruebas que puedan detectar estas diferencias y así diagnosticar a nivel molecular la enfermedad.

Se admite hoy en día que la mayoría de las enfermedades tienen una causa molecular, cualquier enfermedad cursa en mayor o menor medida con alteraciones en la estructura, propiedades, metabolismo o función de las biomoléculas; de ahí que un estudio moderno de la enfermedad requiera la consideración de los aspectos moleculares que acompañan a las observaciones clínicas. Las clasificaciones clínicas se basan en el diagnóstico a partir de la observación médica (exploración) con el apoyo de los datos del laboratorio. Las clasificaciones moleculares, o el estudio de la enfermedad bajo un enfoque molecular, se basan exclusivamente en criterios genotípicos. Los polimorfismos de un único nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) son las variaciones más frecuentes en la secuencia del DNA, ganando cada vez más importancia en las aplicaciones biológicas y biomédicas.

DISCUSIÓN

Pueden afectar tanto a regiones codificantes del genoma como no codificantes. Los SNPs ocurren en un rango de 1.3 Kb en el genoma humano, y son fundamentalmente bi-alélicos (Smigielski EM *et al.*, 2000; Venter JC *et al.*, 2001).

Estas alteraciones del genoma, en algunos casos, son responsables de determinadas enfermedades como es el caso de la β -talasemia.

Se han descrito una gran variedad de métodos para el diagnóstico de las mutaciones relacionadas con la β -talasemia. La mayor parte de los estudios para el diagnóstico molecular están basados en la amplificación de la región específica por PCR, seguido de la detección de la mutación:

1. Análisis de polimorfismos de conformación de una sola hebra (SSCP).

Es una técnica usada para la identificación de nuevas mutaciones y de diferencias genéticas. Se amplifica mediante PCR un fragmento de 200-300 bases del DNA genómico, se desnaturaliza y se corren en un gel de archilamida. Las hebras de DNA presentaran una estructura secundaria de acuerdo con su secuencia nucleotídica, así, el cambio de la secuencia de DNA producirá una estructura secundaria diferente, que resultará en una movilidad electroforética distinta (Orita *et al.*, 1989).

2. Análisis mediante enzimas de restricción.

Quizás sea el método más usado, la importancia de estas enzimas radica en su gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta de DNA dúplex y la consiguiente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas del DNA llamadas sitios de reconocimiento o de restricción.

Las mutaciones crean un sitio de restricción, la enzima cortará el alelo que contiene la mutación y no el salvaje. Mediante electroforesis en gel de agarosa se pueden separar los dos alelos de acuerdo a la diferencia de tamaño de los fragmentos generados en el análisis de restricción (Stott MK *et al.*, 1999).

3. Análisis de heterodúplex.

Se basa en la amplificación de un fragmento de DNA genómico, este fragmento se desnaturaliza e inmediatamente se renaturaliza, para favorecer la unión de las dos hebras, con otro fragmento corto de ácido nucleico, llamado sonda, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana, marcado de forma que permita su detección (radiactivo, coloreado, fluorescente), formándose un heterodúplex.

DISCUSIÓN

Cuando los fragmentos son renaturalizados y son corridos en un gel de acrilamida, las regiones no complementarias de los fragmentos de DNA formarán una horquilla que será el responsable de una migración más lenta del heterodúplex. Mutaciones y variaciones en la secuencia del DNA se detectan por la presencia de bandas que alteran la movilidad en el gel (Su et al., 2003).

4. Hibridación específica de cebadores.

Una pequeña región del gen se amplifica se transfiere y se fija a una membrana de nylon, se hibrida con una sonda marcada, la cual es complementaria en secuencia al gen mutado o al haplotipo particular. La sonda puede estar marcada radiactivamente o no, y visualizarse por colorimetría o quimioluminiscencia (Queck *et al.*, 2007).

Los requerimientos necesarios de los métodos de diagnóstico y de screening incluyen entre otras características las de poseer una alta especificidad y reproducibilidad, bajo coste y la posibilidad de poder automatizarse. La tecnología empleada en el diagnóstico genético debe ser suficientemente robusta para permitir una clasificación exacta de todos los posibles genotipos del locus genético estudiado (Eng B *et al.*, 2007).

No obstante muchos de estos métodos requieren tiempo para su ejecución, una manipulación excesiva de la muestra con aumento del riesgo de contaminación y por lo tanto no gozan de la simplicidad y rapidez suficientes para ser usados de forma rutinaria en el diagnóstico molecular de enfermedades de origen genético como la β -talasemia.

Recientemente el análisis de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR se han podido detectar, cuantificar y en cierta medida automatizar gracias a una nueva metodología basada en la detección de la fluorescencia del DNA (Fluorescence Based DNA Análisis Technology, FDAT).Esta combinación de tecnología PCR/FDAT ofrece el potencial suficiente para automatizar y caracterizar a bajo costo las mutaciones genéticas.

Esta tecnología permite realizar:

- a) Secuenciación automática de 600 bases con 98.5% de exactitud en un tiempo total de 2.5 horas
- b) Medición de tamaños de diferentes fragmentos de DNA con una resolución de 2 bases en un tiempo de unos 20 minutos
- c) Cuantificación de productos de RT-PCR de hasta 1000 pares de bases con una precisión mayor del 4%
- d) Detección automática de fragmentos de DNA fluorescentemente marcados mediante electroforesis capilar

DISCUSIÓN

El uso de la tecnología PCR/FDAT junto con la electroforesis capilar aumenta significativamente tanto la resolución como la sensibilidad de los ensayos, lo que permite trabajar con cantidades de DNA mucho menores, siendo además necesario usar un número menor de ciclos en la amplificación por PCR.

En el presente estudio se ha llevado a cabo la puesta a punto de un nuevo ensayo multiplex de extensión de una única base para la detección simultánea de las mutaciones más frecuentes de la región mediterránea, utilizando la detección fluorescente y electroforesis capilar.

El ensayo de extensión de una única base, aquí descrito, permite de una forma específica y reproducible la discriminación alélica de las diferentes mutaciones diagnosticadas relacionadas con la β -talasemia.

Nuestro ensayo se ha basado en el uso de la electroforesis capilar, que ha permitido la identificación de las mutaciones objeto de estudio de una forma rápida, eficaz y evitando la toxicidad de los productos usados en la electroforesis tradicional en geles (archilamida, bromuro de etidio, etc.), además de minimizar los costes ya que se requieren volúmenes más pequeños de muestra para realizar el diagnóstico.

Este ensayo se basa en el uso de ddNTPs marcados fluorescentemente junto con cebadores no marcados, los cuales se unen específicamente al DNA en la posición adyacente al nucleótido responsable de la mutación. En presencia de la polimerasa el cebador se extenderá en una única base, uniéndose al extremo 3' del cebador el ddNTP complementario dando un fragmento marcado fluorescentemente, que posteriormente se somete a electroforesis capilar detectándose la fluorescencia del ddNTP correspondiente.

El ensayo multicolor ofrece numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales usados para la detección de las mutaciones responsables de la β -talasemia, entre ellas se encuentra la rapidez, la simplicidad, una menor manipulación de las muestras evitando de esta forma posibles contaminaciones, junto con la posibilidad de semi-automatización y de análisis de un gran número de muestras que permite el uso de la electroforesis capilar.

La elevada especificidad de la incorporación de un solo ddNTP, catalizado por una DNA polimerasa, hace que la reacción de SNaPshot sea un método adecuado para la determinación de los polimorfismos de un solo nucleótido.

La posibilidad de usar un marcador interno de pesos moleculares permite la linearización de los picos y así poder detectar el fragmento de DNA

DISCUSIÓN

objeto de estudio tanto por su tamaño, como por su color, detectando de forma simultánea, en dos multiplex, las diferentes mutaciones.

La utilización del software de recogida de datos y de análisis de los mismos, Data Collection y GeneScan permite además la posibilidad de trabajar con 4 o 5 fluoróforos diferentes, y por lo tanto realizar el estudio simultáneo de las mutaciones objeto de estudio.

Esta tecnología nos ha permitido desarrollar un método nuevo semiautomático, de una alta reproducibilidad, ya que la movilidad electroforética de los fragmentos analizados varía ± 1 nt del tamaño que presenta el fragmento, y también de una gran sensibilidad debido a la detección de la fluorescencia de los fluoróforos unidos a los fragmentos objeto de análisis.

Las talasemias constituyen un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por una reducción o ausencia completa de la síntesis de una o más cadenas de globina.

La mayoría de los defectos genéticos responsables de la β -talasemia en España corresponde a mutaciones puntuales que afectan a uno de los procesos moleculares relacionados con la expresión, transcripción o el procesamiento del gen de la β -globina. Es por eso que el método desarrollado

por nosotros en este trabajo, capaz de detectar las variaciones de un único nucleótido, es adecuado para la detección de las alteraciones genéticas causantes de la β -talasemia en nuestra región.

La distribución geográfica de esta enfermedad está relacionada con dos factores:

- a) El origen y la ventaja biológica que las mutaciones que producen la β -talasemia en regiones donde existe o haya existido malaria.
- b) Diferencias entre distintas poblaciones.

Cada grupo étnico tiene su propio espectro de alelos, y cuando una misma mutación aparece en dos grupos raciales diferentes se puede explicar porque ambos grupos raciales tengan orígenes diferentes. Así, las mutaciones que produce la β -talasemia se producen con una alta incidencia en la región mediterránea, África tropical, sudeste de Asia y sur de China.

En España la frecuencia de heterocigotos con Hb A₂ elevada se sitúa entre 0.1-2 %, cifra más baja que la que se da en otras regiones del mediterráneo (Beris et al., 1995).

Se han descrito más de 170 mutaciones diferentes causantes de la β -talasemia en el mundo (Hardison et al., 1998), aunque solo 5 o 6 de ellas son

DISCUSIÓN

responsables de mas del 80% de los alelos talasemicos detectados en diferentes regiones geográficas con una alta prevalencia de la β -talasemia.

De acuerdo con esto, hemos seleccionado para nuestro estudio las 8 mutaciones que se producen en España con una frecuencia mayor (IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, CD6, CD8/9, CD37, CD39) (Moreno et al., 2002; Villegas et al., 1998), incluso hemos incluido en nuestro estudio la mutación IVSII-1 que se ha detectado por primera en España recientemente (Moreno et al., 2000).

El diagnóstico prenatal está adquiriendo recientemente una nueva dimensión en relación con la prevención de la β -talasemia, sin embargo para que estos estudios puedan llevarse a cabo es necesario conocer mejor las mutaciones y su incidencia en un área de población concreta, nuestro estudio contribuirá sin duda a adquirir un mejor conocimiento de la genética molecular de la β -talasemia en la población de Granada.

El método que hemos desarrollado en este trabajo se ha aplicado al diagnóstico de 250 cromosomas pertenecientes a 125 individuos de los cuales, 106 encajan con el criterio diagnóstico de β -talasemia por presentar valores de Hb A₂ superior a 3,8 % y VCM menor a 81 fl.

Del estudio llevado a cabo en los 106 pacientes hemos identificado el 73% de los alelos que se agrupan en 5 mutaciones diferentes (IVSI-1, IVSI-6,

IVSI-110, CD8/9, CD39). De estas mutaciones el 44,8% de los alelos son debidos a la mutación CD39, seguida en frecuencia por la mutación IVSI-110 con un 19,2 %, la IVSI-1 con un 16,6 %, la CD8/9 con un 12,8 % y la IVSI-6 con un 5,1% (Tabla 11).

Estos resultados concuerdan con lo publicado para otras regiones europeas tales como Grecia, Italia y Portugal con las que coinciden la frecuencia de 4 de las 8 mutaciones estudiadas en este trabajo (IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110 y CD39) (Villegas et al., 2001).

La quinta mutación detectada por nosotros (CD8/9) varía sin embargo su frecuencia entre las distintas regiones y entre los diferentes estudios llevados a cabo. Esta mutación junto con la IVSI-1 representa la tercera y cuarta mutación más frecuente de nuestro estudio, resultados que demuestran una vez mas la heterogeneidad molecular de la β -talasemia en España donde la mutación CD8/9 se presenta con una relativamente alta frecuencia que no se produce en otros países de nuestro área. Así por ejemplo, en Portugal la mutación CD8/9 se manifiesta con una frecuencia muy inferior (1,5%) a la detectada por nosotros (Ribeiro et al., 1997).

Del resto de las mutaciones estudiadas en los pacientes en este trabajo, no se detectó la presencia de CD6, CD37 e IVSII-1. Este resultado no es sorprendente ya que coincide con otros estudios llevados a cabo en otras

DISCUSIÓN

regiones de España si exceptuamos la región de Valencia donde en el año 2000 se detectó por primera vez la presencia de la mutación IVSII-1 (Moreno et al., 2000).

La β -talasemia causada por la mutación IVSII-1 es relativamente frecuente en ciertos países fronterizos con el área mediterránea pero es muy rara su presencia en otros países. Dentro de los países del entorno mediterráneo esta mutación es particularmente frecuente en Hungría, Turquía y Líbano (Flint et al., 1998) y representa el 3-7 % de la β -talasemia. En otras regiones como Checoslovaquia o Azerbaiyán esta mutación representa el 14-16% de las alteraciones moleculares detectadas en la β -talasemia.

En la península ibérica se ha publicado la existencia de un solo caso de β -talasemia debido a la mutación IVSII-1 entre 88 talasémicos estudiados (Cabeda et al., 1999).

A pesar de que la mutación CD6 se produce con una baja frecuencia en la región andaluza (Villegas et al., 2001) la hemos elegido para incluirla entre las mutaciones objeto del estudio llevado a cabo en la provincia de Granada, puesto que con el diseño del método y de los oligonucleótidos llevado a cabo en este trabajo permite no solo determinar el polimorfismo de un único nucleótido para la detección de la mutación CD6 [esta mutación se produce

por la deleción de un nucleótido de adenina que alteraría la pauta de lectura del mensajero (mutación *frameshift*) sino que permite igualmente detectar un posible cambio del nucleótido de adenina por timina. En este caso el codón resultante codifica una valina en vez del aminoácido glutámico en la posición 6 de la cadena beta de la globina dando lugar a la alteración conocida como anemia falciforme.

Es decir, el diseño del oligonucleótido realizado por nosotros permite detectar no solo la mutación CD6 responsable de la β -talasemia sino también la alteración responsable de la anemia falciforme, lo que nos ha dado la oportunidad de diagnosticar entre los 125 individuos estudiados un individuo heterocigoto para la HbS (figura 21). La Hb S presenta una incidencia de entre un 40% y 50% en algunas regiones de África, el 25% en Turquía, Arabia Saudí, Israel y sur de la India, y el 32% en algunas zonas muy restringidas del sur de Europa (Sicilia, Chipre, Grecia). La Hb S puede afectar también la raza blanca y su incidencia es variable en diferentes regiones del área mediterránea como, por ejemplo, Grecia, Chipre, sur de Italia, Sicilia, España y Portugal. En España las áreas con especial incidencia de esta hemoglobinopatía son Andalucía y Extremadura.

En relación con los datos hematológicos de los pacientes, se encontraron para todas las mutaciones detectadas valores de hematíes,

DISCUSIÓN

hemoglobina, VCM, ADE, ferritina y Hb A₂ que están de acuerdo con los criterios establecidos en el diagnóstico hematológico de la β -talasemia.

Estos resultados difieren de los resultados encontrados en el caso de la Hb AS detectada en nuestro estudio y que presenta anemia con VCM menor a 81 fl, bajo nivel de ferritina y aumento de Hb A₂, situación que es compatible con la asociación Hb S y β -talasemia (tabla 12).

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

1. La elevada especificidad de la incorporación de un solo ddNTP, catalizado por una DNA polimerasa, junto con la electroforesis capilar y detección fluorescente hace que la reacción SNaPshot sea un método adecuado para la determinación de los polimorfismos de un solo nucleótido responsables de la β -talasemia.
2. Las condiciones ideales para la detección de las mutaciones responsables de la β -talasemia desarrollada en este trabajo han sido las siguientes:

a) Reacción de amplificación del amplicón:

Concentración de DNA 50 ng, , una concentración de cebadores de 0,2 μ M, 200 μ M dNTPs, 1,5 mM de Cl_2Mg , 1 U Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), 1X buffer PCR II (contiene 10 mM Tris-HCl pH 8.3 y 50 mM KCl), en un volumen final de reacción de 25 μ l. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial de 10 min a 95 $^{\circ}C$, 30 ciclos a 95 $^{\circ}C$ durante 30 s, con una temperatura de 55 $^{\circ}C$ durante 30 s y a 72 $^{\circ}C$ durante 2 min; y una extensión final a 72 $^{\circ}C$ durante 7 min.

CONCLUSIONES

b) Reacción de extensión de un único nucleótido:

La reacción de SNaPshot contenía, en un volumen final de 10 μL : 5 μL de "SNaPshot multiplex Ready Reaction Mix", 3 μL del producto de amplificación y una concentración final de 0,2 μM de cebadores. El programa de amplificación fue el siguiente: 10 min a 96 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 30 ciclos a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min.

3. La aplicación de este método ha permitido identificar el 73 % de los alelos responsables de la β -talasemia que se agrupan en cinco mutaciones diferentes (IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, CD8/9 y CD39).
4. La frecuencia alélica de las mutaciones detectadas ha sido la siguiente: 44.8% para la mutación CD39 seguida en frecuencia por la mutación IVSI-110 con 19,2%, IVSI-1 con 16.6%, la CD8/9 con un 12.8% y la IVSI-6 con un 5.1%.
5. De los 125 casos estudiados se ha detectado un individuo con Hb S en heterocigosis.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelrazik N. Pattern of iron chelation therapy in Egyptian beta thalassemic patients: Mansoura University Children's Hospital experience. *Hematology* 2007; 1.

Altay C, Oner C, Oner R, Mesci L, Balkan H, Tüzmen S, Basak AN, Gümrük F, Gurgey A. Genotype-phenotype analysis in HbS-beta-thalassemia. *Hum Hered* 1997; 47: 161-164.

Anand R, Boehm CD, Kazazian HH, Vanin EF. Molecular characterization of a β^0 -thalassemia resulting from a 1.4 kb deletion. *Blood* 1988; 72: 636-641.

Anderson N. Hydroxyurea therapy: improving the lives of patients with sickle cell disease. *Pediatr Nurs* 2006;32:541-543.

Aulehla-Scholz C, Spiegelberg R, Horst J. A β -thalassemia mutant caused by a 300-bp deletion in the human beta-globin gene. *Hum Genet* 1989; 81: 298-299.

Baglioni C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48: 1880-1886.

Baiget M. Los síndromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. *Sangre* 1986; 31: 609-613.

BIBLIOGRAFÍA

Bathia M, Walters MC. Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future. *Bone Marrow Transplant* 2007.

Beris P, Darbellay R, Extermann P. Prevention of β -thalassemia major and Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *Semin Hematol* 1995; 32: 244-261.

Beuzard Y. Towards gene therapy of hemoglobinopathies. *Semin Hematol* 1996; 33: 43-52.

Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, Saunders, 1986.

Cabeda JM, Correia C, Estevinho A, et al. Unexpected pattern of β -globin mutations in β -thalassemia patients from northern Portugal. *Br J Haematol* 1999; 105: 68-74.

Cao A, Galanello R, Rosatelli MC, Argillu F, de Virgilis S. Clinical experience of management of thalassemia. The Sardinian experience. *Semin Hematol* 1996; 33: 66-75.

Chaidos A, Makis A, Hatizimichael E, Tsiara S, Gouva M, Tzouvara E, Bourantas KL. Treatment of beta-thalassemia patients with recombinant human erythropoietin: effect on transfusion requirements and soluble adhesion molecules. *Acta Haematol* 2004;111:189-195.

Diaz-Chico JC, Yang KG, Kutlar A, Reese AL, Aksoy M, Huisman THJ. An approximately 300 bp deletion involving part of the 5' β -globin gene region is observed in members of a Turkish family with β -thalassemia. *Blood* 1987; 70: 583-586.

Durakbasa CU, Timur C, Sehiralti V, Mutus M, Tosyali n, Yoruk A. Pediatric splenectomy for hematological diseases: outcome analysis. *Pediatr Surg Int* 2006; 22:635-639.

Eng B, Walker L, Nakamura LM, Hoppe C, Azzimi M, Lee H, Waye JS. Three new beta-globin gene promoter mutations identified through newborn screening. *Hemoglobin* 2007; 31: 129-134.

Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11: 1-51.

Gilman JG, Huisman THJ, Abels J. Dutch beta⁰-thalassaemia: a 10 kilobase DNA deletion associated with significant γ -chain production. *Br J Haematol* 1984; 56: 339-348.

Goodman M, Czelusniak J, Koop BF, Tagle DA, Slightom JL. Globins: a case study in molecular phylogeny. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1987; 52: 875-890.

BIBLIOGRAFÍA

Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* 1987; **51**: 975-985.

Hardison R, Riemer C, Chui DHK, Huisman THJ, Miller W. Electronic access to sequence alignments, experimental and human mutation as an aid to studying globin gene regulation. *Genomics* 1998; **47**: 429-437.

Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H. Hb Var: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mut* 2002; **19**: 225-233.

Higgs DR, Word WG, Jarman AP, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM, Ayyub H. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Dev* 1990; **4**: 1588-1601.

Ingram VM. Specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 1956; **178**: 792.

Liebhaber SA, Griese EU, Weiss I, Cash FE, Ayubb H, Higgs DR, Horst J. Inactivation of human alpha-globin gene expression by a de novo deletion located upstream of the alpha-globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9431-9435.

Loukopoulos D. Current status of thalassemia and the sickle cell syndrome in Greece. *Semin Hematol* 1996; 33: 76-86.

Means RT. Polycythemia: Erythrocytosis En: Lee R, Forester J, Lukes J, Paraskevos F, Greer JP, Rodgers GM, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology* (10^a Ed.). Baltimore: Williams & Willkins, 1999.

Moreno I, Vaya A, Rosatelli MC, Mameli C, Bolufer P. Thalassemic trait caused by IVSII-1 (G→A) mutation detected in a Spanish family. *Haematologica* 2000; 85: 1215-1232.

Moreno I, Bolufer P, Perez ML, Barragan E, Sanz MA. Rapid detection of the major Mediterranean β -thalassemia mutations by real-time polymerase chain reaction using fluorophore-labelled hybridization probes. *Br J Haematol* 2002; 119: 554-557.

Mullis K, Faloona F, Sharf F, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-273.

Ottolenghi S, Giglioni B, Taramelli R, Comi P, Mazza U, Saglio G, Camaschella C, Izzo P, Cao A, Galanello R, Gimferrer E, Baiget M, Gianni AM. Molecular comparison of $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of

BIBLIOGRAFÍA

fetal hemoglobin DNAs: evidence of a regulatory area?

Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:2347-2351.

Padanilam BJ, Felice AE, Huisman THJ. Partial deletion of the 5' beta-globin gene region causes beta zero-thalassemia in members of an American black family. *Blood* 1984; 64: 941-944.

Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Grosveld F, de Laat W. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet* 2003; **35**: 190-194.

Papadakis MN, Patinos GP. Contribution of gene conversion in the evolution of the human beta-like globin family. *Hum Genet* 1999; **104**: 117-125.

Patrinós GP, de Krom M, de Boer E, Langeveld A, Imam AM, Strouboulis J, de Laat W, Grosveld FG. Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Genes Dev* 2004a; 18: 1495-1509.

Patrinós GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, Wajcman H, Hardison RC. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* 2004b; 32: D537-D541.

Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IG. Sickle-cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543.

Popovich BW, Rosenblatt DS, Kendall AG, Nishioka Y. Molecular characterization of an atypical β -thalassemia caused by a large deletion in the 5' β -globin gene region. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 797-810.

Queck DL, Ng YY, Wang W, Tan AS, Tang-Lim GI, Ng IS, Law HY, Chong SS. Rapid carrier screening for beta-thalassemia by single-step allele-specific PCR and detection. *Clin Biochem* 2007; 40: 427-430.

Ribeiro ML, Gonçalves P, Cunha E, Bento C, Almeida H, Pereira J, Martín G, Tamagnini GP. Genetic heterogeneity of β -thalassemia in populations of the Iberian Peninsula. *Hemoglobin* 1997; 21: 261-269.

Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST. SNP: a database of single nucleotide polymorphism. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 352-355.

Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, editors. The molecular basis of blood diseases. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. p 135-182.

BIBLIOGRAFÍA

Stott MK, Fellowes AP, Upton JD, Burt MJ, George PM. Simple multiplex PCR for the simultaneous detection of the C282Y and H63D hemochromatosis. *Clin Chem* 45: 426-428.

Su YN, Lee CN, Hung CC, Chen CA, Cheng WF, Tsao PN, Yu CL, Hsieh FJ. Rapid detection of beta-globin gene (HBB) mutations coupling heteroduplex and primer-extension analysis by DHPLC. *Hum Mutat* 2003; 22: 326-336.

Thein SL, Old JM, Wainscoat JS, Wetherall DJ. Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion β^0 thalassaemia. *Br J Haematol* 1984; 57: 271-278.

Trent RJ, Jones RW, Clegg JB, Weatherall DJ, Davidson R, Wood WG. A ($^A\gamma\delta\beta$) 0 thalassaemia: similarity of phenotype in four different molecular defects, including one newly described. *Br J Haematol* 1984; 57: 279-289.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, et al. The sequence of human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.

Villegas A, Pérez Clausell C, Sánchez J, Sal del Río E. A new case of thalassaemia intermedia: interaction of a triplicated α -globin locus and β -thalassaemia trait. *Hemoglobin* 1992; 16: 99-101.

Villegas A, Ropero P, González FA, Martí E, Anguita E, De Blas JM. High incidence of the CD8/9 (+G) β^0 -thalassemia mutation in Spain. *Haematologica* 1998; 83: 1066-1068.

Villegas A, Ropero P, González FA, Anguita E, Espinós D. The thalassemia syndromes: molecular characterization in the spanish population. *Hemoglobin* 2001; 25: 273-283.

Villegas A, Sánchez J, Sal del Río E. Síndromes talasémicos en España. Estudios moleculares. *Sangre* 1992; 37: 177-183.

Villegas A, Sánchez J, Sal del Río E. α -globin genotypes in a Spanish population. *Hemoglobin* 1992; 16: 427-429.

Villegas A. Patología de la hemoglobina en la población española y en la población emigrante. *An Med Interna* 2006; **23**: 44-48.

Vives Corrons JL, Pujades MA, Miguel-García A, Miguel-Sosa A, Cambiazzo S. Rapid Detection of Spanish $(\delta\beta)^0$ -thalassemia deletion by polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 80: 582-585.

Vives Corrons JL. Defectos congénitos de la hemoglobina. Talasemia y trastornos afines. En: Sans Sabrafen, Besses C, Vives Corrons JL, eds. Hematología clínica. Barcelona: Harcourt 2001.

BIBLIOGRAFÍA

Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford: Blackwell Science. 2001.

Weatherall DJ. The thalasseмии. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PH, Varmus H, eds. The molecular basis of blood diseases. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994: 157-205.

Zago MA, Costa FF, Freitas TC, Bottura C. Clinical, hematological and genetic features of sickle-cell anemia and sickle cell-beta thalassemia in a Brazilian population. *Clin Genet* 1980; 18: 58-64.