

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Sección Departamental de Fisiología Animal**



**MONTAJE DE LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN DEL ÁCIDO  
DESOXIRIBONUCLEICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN  
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). SU APLICACIÓN EN EL  
ESTUDIO MOLECULAR DE LA B-TALASEMIA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Rafaela Raposo González**

Bajo la dirección de la doctora

Ana María Villegas Martínez

**Madrid, 1993**

**ISBN: 84-669-1320-3**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

MONTAJE DE LA TECNICA DE  
AMPLIFICACION DEL ACIDO  
DESOXIRRIBONUCLEICO MEDIANTE LA  
REACCION EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR). SU APLICACION EN  
EL ESTUDIO MOLECULAR DE LA  $\beta$ -  
TALASEMIA

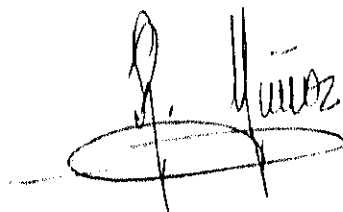
TESIS DOCTORAL

D<sup>a</sup>. RAFAELA RAPOSO GONZALEZ  
MADRID, ABRIL DE 1993

D<sup>a</sup> ROCIO MUÑOZ CALVO, DIRECTORA DE LA SECCION DEPARTAMENTAL DE FISILOGIA ANIMAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA U.C.M.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "MONTAJE DE LA TECNICA DE AMPLIFICACION DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). SU APLICACION EN EL ESTUDIO MOLECULAR DE LA  $\beta$ -TALASEMIA", dirigido por D<sup>a</sup> Ana M<sup>a</sup> VILLEGAS MARTINEZ, constituye la Memoria presentada por D<sup>a</sup> Rafaela RAPOSO GONZALEZ para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Lo que certifico en Madrid a 26 de Marzo de mil novecientos noventa y tres.-----



D<sup>a</sup> ANA M<sup>a</sup> VILLEGAS MARTINEZ, PROFESORA TITULAR DE  
PATOLOGIA MEDICA (HEMATOLOGIA) DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA DE LA U.C.M.

CERTIFICA: Que D<sup>a</sup> Rafaela RAPOSO GONZALEZ ha realizado  
en el Hospital Clínico de San Carlos de la  
U.C.M. el trabajo titulado: "MONTAJE DE LA  
TECNICA DE AMPLIFICACION DEL ACIDO DESOXI-  
RRIBONUCLEICO MEDIANTE LA REACCION EN CADENA  
DE LA POLIMERASA (PCR). SU APLICACION EN EL  
ESTUDIO MOLECULAR DE LA  $\beta$ -TALASEMIA", para  
optar al grado de Doctor en Farmacia, por lo  
que autorizo su presentación como Tesis  
Doctoral, ya que a mi juicio, se han cubier-  
to los objetivos propuestos.

Y para que conste, expido y firmo el presen-  
te certificado en Madrid a 26 de Marzo de  
mil novecientos noventa y tres.-----





A mi tesón (*firmeza y  
constancia en realizar  
un trabajo*)

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la profesora Dra. Dña. Ana María Villegas Martínez por sus acertadas orientaciones y sugerencias.

A la profesora Dra. Dña. Rocío Muñoz Calvo por su desinteresada ayuda.

Al profesor Dr. D. Manuel Córdoba Borrego por su comprensión y amistad.

A todas aquellas amigas que han demostrado su interés por mi futuro en esta Facultad y dan a la amistad un sentido real y cotidiano.

A mis compañeras de despacho, además, por su compañía y conocimientos.

A Juan por sus "ratos libres".

A María sin quien mi "mano izquierda" hubiera sido incapaz de finalizar este trabajo y además pasarnoslo tan bien.

# INDICE

## INDICE

I-JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO . . . . .	1
---	---

### II-REVISION BIBLIOGRAFICA

1. RECUERDO HISTORICO . . . . .	5
---------------------------------	---

2. ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA . . . . .	13
---	----

2.1 ESTRUCTURA PRIMARIA

2.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA

2.3 ESTRUCTURA TERCIARIA

2.4 ESTRUCTURA CUATERNARIA

2.5 HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS Y DEL ADULTO

2.6 ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA

3. BIOSINTESIS DE LA HEMOGLOBINA . . . . .	28
--	----

3.1 ORGANIZACION Y ESTRUCTURA DE LOS  
GENES DE GLOBINA HUMANA

3.2 SINTESIS DE GLOBINA

3.3 SINTESIS DEL HEMO

3.4 ENSAMBLAJE DE LAS UNIDADES DE  
HEMOGLOBINA

4. HEMOGLOBINOPATIAS. CONCEPTO Y CLASIFICACION .	51
--	----

4.1 TALASEMIAS . . . . .	53
--------------------------	----

GENETICA Y BASE MOLECULAR

MUTACIONES

TALASEMIA ALFA

TALASEMIA BETA

TALASEMIA DELTA-BETA-ALFA

OTRAS

4.2	PERSISTENCIA HEREDITARIA DE LA HEMOGLOBINA FETAL (PHHF) . . . . .	65
4.3	HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUCTURALES . . . . .	66

GENETICA Y BASE MOLECULAR  
CLASIFICACION

5.	TECNICAS EN BIOLOGIA MOLECULAR . . . . .	73
----	--	----

SOUTHERN-BLOTTING  
RPLF  
PCR  
PCR-OLIGONUCLEOTIDOS MUTADOS

III- MATERIAL Y METODOS

1.	SUJETOS ESTUDIADOS . . . . .	90
----	------------------------------	----

2. TECNICAS UTILIZADAS

2.1.	DE DESCRIPCION CONVENCIONAL . . . . .	91
------	---------------------------------------	----

ESTUDIOS HEMOCITOMETRICOS  
ESTUDIOS DE HEMOGLOBINAS

2.2.	DE BIOLOGIA MOLECULAR . . . . .	94
------	---------------------------------	----

EXTRACCION DEL ADN  
ESTUDIO DEL HAPLOTIPO  
AMPLIFICACION POR ARMS

IV-	RESULTADOS . . . . .	101
-----	----------------------	-----

1. RESULTADOS HEMOCITOMETRICOS
2. RESULTADOS DEL HAPLOTIPO
3. RESULTADOS DE AMPLIFICACION POR ARMS

## V- DISCUSION

1. COMENTARIOS A LOS RESULTADOS DEL HAPLOTIPO . . . . .	111
2. COMENTARIOS A LA TECNICA DE ARMS . . . . .	115
3. MUTACIONES DE LA $\beta$ -TALASEMIA ENCONTRADAS . . . . .	119
4. MUTACIONES DE LA $\beta$ -TALASEMIA EN LITERATURA . . . . .	122
5. DIAGNOSTICO PRENATAL . . . . .	132
VI- CONCLUSIONES . . . . .	135
VII- BIBLIOGRAFIA . . . . .	138
VIII-INDICE DE FIGURAS Y TABLAS . . . . .	167

# I-JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Las talasemias constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias en las que existe un déficit de síntesis en una o mas de las cadenas polipeptídicas que forman la hemoglobina.

Los genes encargados de la síntesis de las cadenas de globina humana se agrupan en dos conjuntos denominados familia de genes  $\alpha$ , situada en el brazo corto del cromosoma 16, y la familia de genes no  $\alpha$  localizada en el brazo corto del cromosoma 11.

La  $\beta$ -Talasemia está causada por el déficit o ausencia de síntesis de la cadena  $\beta$ ; clínicamente se pueden presentar como un cuadro severo, transfusión dependiente denominado  **$\beta$ -Talasemia mayor**; como una condición cuyas manifestaciones clínicas son menos graves, conocida como  **$\beta$ -Talasemia intermedia**, o bien como un estado de portador heterocigótico, generalmente asintomático, llamado **rasgo talasémico o  $\beta$ -Talasemia menor**.

Estos cuadros talasémicos, homocigóticos y heterocigóticos, pueden expresar una gran variabilidad de manifestaciones clínicas que obedecen, no solo a las interacciones de diferentes tipos de  $\beta$ -Talasemias ( $\beta^0$  y  $\beta^+$ ), sino al elevado polimorfismo genético que interviene en la génesis de la  $\beta$ -Talasemia.

A diferencia de lo que sucede en la  $\alpha$ -Talasemia, en la  $\beta$ -Talasemia son extraordinariamente raras las deleciones genéticas. Sin embargo, son frecuentes las mutaciones que implican a los procesos necesarios para que el flujo de la información llegue desde el gen (ADN) a las cadenas de globina. Comúnmente se origina por mutaciones puntuales, en las cuales existe sustitución, inserción o deleción de



nucleótidos, que son difíciles de poner de manifiesto mediante la técnica de Southern.

Un gran avance en el estudio de las mutaciones moleculares de la  $\beta$ -Talasemia se abrió a partir de 1987 con la posibilidad de amplificar fragmentos de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha revolucionado, no sólo el estudio de la  $\beta$ -Talasemia, sino el mundo de la biología molecular.

Recientemente, una modificación de la PCR denominada "Amplification Refractory Mutation System" (ARMS) o PCR con oligonucleótidos mutados, permite el estudio directo de  $\beta$ -Talasemia.

Un mejor conocimiento de la base molecular de las talasemias ha permitido una prevención y consejo genético de los pacientes.

El objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto de la técnica ARMS, o PCR con oligonucleótidos mutados, con la cual es posible detectar en un corto espacio de tiempo una posible lesión molecular.

Esta técnica ha sido posteriormente aplicada para la amplificación del ADN en sujetos normales y en pacientes con  $\beta$ -Talasemia con el fin de determinar el defecto concreto causante de la  $\beta$ -Talasemia en la región centro de España.

## II-REVISION BIBLIOGRAFICA

# RECUERDO HISTORICO

## 1. RECUERDO HISTORICO

Los conocimientos que actualmente poseemos sobre la hemoglobina y su patología es el resultado de un gran número de investigaciones a lo largo de estos siglos.

La unión del O<sub>2</sub> a la sangre fue un tópico que suscitó el interés de todos los científicos del siglo XIX. HOPPE-SEYLER (1862), estableció por métodos espectroscópicos el papel central del pigmento rojo de la sangre para unirse al O<sub>2</sub> y fue el primero en utilizar el término HEMOGLOBINA, para describir éste pigmento.

Detectó los cambios espectrales que se producían, cuando el O<sub>2</sub> era eliminado por reducción química con sulfato ferroso.

En el s.XX es donde, más avances se han producido y con un crecimiento exponencial de los conocimientos según nos acercamos a su final.

Aun sabiendo que todos los descubrimientos no se producen aislados sino que en muchas ocasiones unos han servido de base para otros, podemos considerar una mitad de siglo, hasta el año 1949 en que PAULING y sus colaboradores descubren que la anemia de células falciformes estaba causada por una hemoglobina anormal.

Este período se caracterizó, de una parte, por la existencia de científicos dedicados a conocer la estructura y función de la hemoglobina y por otra, médicos clínicos, que comenzaban a identificar determinadas anemias, cuyas características clínicas y hereditarias fueron estableciendo progresivamente (Dacie, 1988).

Estos dos grupos, podríamos decir que se fusionaron con el descubrimiento de Pauling, pues a partir de entonces, las descripciones clínicas tenían una base molecular y las alteraciones moleculares tenían su representación en clínica.

Abordamos los siguientes puntos por separado:

- 1) Establecimiento de la estructura de la hemoglobina.
- 2) Conocimiento de la función de la hemoglobina.
- 3) Descripciones clínicas y descubrimiento de variantes de hemoglobina.
- 4) Control genético.

### 1) ESTABLECIMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

Al inicio del s.XX, el avance de la química orgánica atrajo el interés sobre los grupos prostéticos que contenían hierro.

En 1912 KUSTER estableció la estructura del Hemo, sintetizándose en 1919 por HANS FISCHER. Pronto se evidenció que esta porfirina era el grupo prostético, no solamente de la hemoglobina sino también de otras proteínas respiratorias como mioglobina y otros citocromos.

El desarrollo de los espectrofotómetros, permitió la determinación detallada de las propiedades espectrales de la hemoglobina. La oxidación a metahemoglobina y la unión de la hemoglobina con otros ligantes del Hemo, como el CO, produjeron alteraciones características en el espectro visible de absorción.

El desarrollo de una nueva rama de la ciencia, la Bioquímica, permitió hacia 1920 que se lograran técnicas para medir el tamaño de la molécula de hemoglobina.

Fu  ADAIR, quien desarrolló membranas coloidales, que eran libremente permeables al agua y sal pero no a la hemoglobina, logrando determinar su peso molecular valorando la presión osmótica, estableciendo en 67.000 daltons, lo que fue comprobado años después por SVEDBERG mediante centrifugación analítica, con una diferencia tan sólo de 1.000 daltons ( $P_m = 68.000$ ).

Un punto clave en el conocimiento de la estructura de la hemoglobina ocurrió en 1956 cuando INGRAM separ  los péptidos producidos después de que la globina fuese hidrolizada con tripsina, la cual rompe los enlaces peptídicos solamente a nivel de residuos lisina-arginina.

Del número de residuos obtenidos dedujeron que la hemoglobina estaba constituida por dos mitades identicas. Además comprobó tres años después las diferencias entre los péptidos de la hemoglobina A y de la hemoglobina S.  
(Ingram, 1959)

En 1957 RHINESMITH, SCHROEDER y PAULING por una parte y BRAUNITZER por otra, indicaron que la hemoglobina era un tetrámero, compuesto de dos pares de cadenas polipeptídicas distintas, las cuales fueron denominadas alfa y beta y asumieron que cada cadena estaba pegada a un grupo hemo.

A principios de la década de los 60, con el desarrollo de nuevos métodos para determinar la estructura de las proteínas, se hicieron rápidos progresos en dos frentes:

- a) El establecimiento de las secuencias de aminoácidos en las cadenas de globina humanas normales.
- b) Determinación de la estructura tridimensional de la oxihemoglobina y desoxihemoglobina, que fue lograda por MAX PERUTZ y cols, mediante difracción con rayos x, demostrando como la unión con el  $O_2$  alteraba la conformación de la hemoglobina, lo que le valió el premio Nobel de Química en 1962.

Esto permitió a PERUTZ en años sucesivos, explicar propiedades funcionales de la hemoglobina, tales como el efecto Bohr, interacción con los fosfatos orgánicos y la unión cooperativa con el  $O_2$ , así como información sobre la estructura de variantes anormales, responsables de diversos trastornos clínicos.

Esta investigación ha progresado tanto en 35 años, que las coordenadas tridimensionales de los 4.600 átomos no hidrógeno de la hemoglobina, están establecidos con un alto grado de certeza.

## 2) CONOCIMIENTO DE LA FUNCION DE LA HEMOGLOBINA

El acúmulo gradual de información sobre la estructura de la hemoglobina, permitió incrementar los datos sobre el papel fisiológico en el transporte de  $O_2$  y  $CO_2$ , así como sus mecanismos de acción molecular.

En 1904 CHRISTIAN BOHR, demostró la forma sigmoide de la curva de disociación de la hemoglobina y que la posición de la curva era sensible a los cambios en la presión del  $CO_2$ . Esta curva fue definitivamente establecida por BARCROFT en 1928.

En 1936 PAULING predijo la naturaleza de la unión de  $O_2$  al hemo, considerando el comportamiento cooperativo de la hemoglobina como un problema químico. Razonó que la unión del  $O_2$  a uno de los grupos hemo en el tetrámero, ocasionaba una alteración estructural en la proteína, que hacía al resto de los hemo más ávidos por el  $O_2$ , lo que puede considerarse como el primer modelo alostérico de la función de la hemoglobina.

El aumento de datos  $\text{CO}_2\text{-CO}_3\text{H}^-$ , como buffer y sistema de excreción de ácidos, permitió a BOHR-HASSELBALCH interpretar que, el mayor efecto del  $\text{CO}_2$  sobre la afinidad de la hemoglobina por el  $\text{O}_2$  era a través del cambio que provoca en el pH, de tal forma que la dependencia, que el pH tiene la curva de disociación de la hemoglobina, se ha conocido como EFECTO BOHR.

### 3) DESCRIPCIONES CLINICAS Y HALLAZGO DE VARIANTES DE HEMOGLOBINA

Paralelamente a estas investigaciones puramente científicas, se estaban describiendo un conjunto de enfermedades, que en principio no se relacionaban con hemoglobinas anormales, hasta 1948 en que HÖRLEIN y WEBER describieron una hemoglobina con propiedades espectrales anormales responsable de una cianosis familiar.

En 1922, MASON introdujo el término de anemia de células falciformes (sickle-cell anemia), y sugirió que podría ser una enfermedad de la raza negra. Posteriormente se comprobó que es una enfermedad heredada, no ligada al sexo y que afecta también a la raza blanca.

En 1925 COOLEY, describe en Detroit cuatro niños con una apariencia mongoloide peculiar con anemia y hepatoesplenomegalia. En años posteriores se le describió a esta enfermedad como Talasemia y se localizó preferentemente en el mediterraneo.

En 1949 PAULING, ITALO, SINGER y WELLS demostraron mediante electroforesis, que los eritrocitos falciformes contenían moléculas de hemoglobina defectuosa, denominando la hemoglobina de la enfermedad de células falciformes (Pauling y cols., 1949). Este descubrimiento fue el pie para la aparición de toda una serie de hemoglobinopatías estructurales.



Cada año se describen un número cada vez mayor de éstas por lo que en 1975 se establece el Centro Internacional de Información sobre la Hemoglobina para proporcionar mayor comunicación entre los investigadores, editando un listado anual con los nuevos descubrimientos y los ya existentes.

#### 4) CONTROL GENETICO DE LA HEMOGLOBINA

El conocimiento del control genético de las hemoglobinas humanas ha tenido dos fases, una primera derivada de la observación del patrón de herencia y de los tipos de hemoglobinas descubiertos y otra a partir de la utilización de la tecnología del DNA recombinante.

El gran número de estudios realizados y los conocimientos a los que se ha llegado en los últimos 20 años en genética molecular, se deben a la denominada tecnología de ADN recombinante, con una fecha clave, la del descubrimiento en 1970 del enzima TRANSCRIPTASA REVERSA, capaz de sintetizar una copia de ADN (ADN complementario) a partir de una molécula de ARN obtenida del citoplasma de una célula eucariota. (Baltimore, 1970; Temin, 1970; High, 1985)

Pronto se vió que en condiciones adecuadas éste DNA se hibridaba de una manera altamente específica al DNA o RNA complementario, lo que permitió demostrar la presencia de esa secuencia complementaria y de esta forma DEISSEROTH y cols. establecieron con técnicas de hibridación en solución, que los genes de globina alfa y beta residían sobre cromosomas diferentes, localizando el gen alfa sobre el cromosoma 16 y el beta sobre el 11.

Otro descubrimiento clave, fueron las ENDONUCLEASAS de RESTRICCIÓN las cuales cortan el ADN cuando encuentran determinadas secuencias de nucleótidos. (Nathans, 1975)

En 1975 SOUTHERN introdujo un método de hibridación, que permitía inmovilizar uno de los componentes de la reacción, el DNA objeto de estudio, al transferirlo sobre nitrocelulosa, después de haber sido separado según su tamaño mediante electroforesis en agarosa previa digestión con endonucleasas. (Southern, 1975; Orkin, 1984)

El progreso sobre todo en los últimos 10 años ha permitido, que muchos trastornos monogénicos puedan ser examinados, lo que supone un mejor conocimiento de la base molecular de los mismos y la posibilidad de detección prenatal de portadores (Antonarakis, 1989).

La fabricación por bacterias del producto de un gen determinado (vacunas, hormonas, etc) abre un campo a las posibilidades de la reparación de los genes anormales o frenados en su expresión.

**ESTRUCTURA  
DE LA  
HEMOGLOBINA**

## 2. ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

Cuando Perutz se propuso en 1937 escoger la hemoglobina como proteína cuya estructura quería resolver, no contó con la complejidad de ésta, por lo que tuvo que esperar 20 años para resolver dicho problema, pero sin duda éste ha sido uno de los grandes triunfos de la moderna biología molecular y por tanto el primer paso para el conocimiento de las hemoglobinas anormales (Bunn, 1986; Weatherall, 1981; Lehmann, 1976).

La hemoglobina es la proteína vital que transporta O<sub>2</sub> desde los pulmones a los tejidos y facilita la vuelta del CO<sub>2</sub> desde los tejidos a los pulmones. Se localiza en el interior de los hematíes. En un hematíe hay alrededor de 280 millones de moléculas de Hb, cada una con un peso molecular de 64.458 daltons, forma elipsoide y dimensiones 64x55x60 Å.

Como todas las proteínas consta de aminoácidos, unidos unos a otros en una secuencia lineal llamada cadena polipeptídica. Los aminoácidos son de 20 clases diferentes y su secuencia en la cadena está determinada genéticamente.

Una molécula de hemoglobina está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas alfa de 141 restos de aminoácido cada una y las cadenas beta de 146 restos cada una. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  tienen diferentes secuencias de aminoácidos, pero se entremezclan para formar estructuras tridimensionales similares.

Cada cadena contiene un grupo HEMO, que consiste en un anillo de átomos de carbono, nitrógeno e hidrógeno, denominado protoporfirina IX, con un átomo de hierro ferroso en el centro. Una única cadena polipeptídica combinada con un sólo hemo se llama subunidad de hemoglobina ó monómero de hemoglobina.

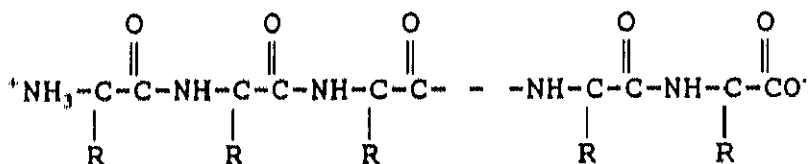
En la molécula completa las cuatro subunidades están estrechamente entrelazadas, como un rompecabezas tridimensional, formando un tetrámero.

El grupo hemo se combina por sí mismo con el O<sub>2</sub> tan fuertemente que el enlace, una vez formado, es difícil de romper. Esto ocurre porque un átomo de hierro puede existir en dos estados de valencia: hierro ferroso, que transporta dos cargas positivas y el grupo férrico, que transporta tres cargas positivas.

Normalmente, el hierro ferroso reacciona con el O<sub>2</sub> de modo irreversible para formar hierro férrico, pero cuando el hierro ferroso está acoplado en los pliegues de la cadena de globina, queda protegido de manera que la reacción con el O<sub>2</sub> es reversible.

Para que la globina funcione con eficacia deben satisfacerse tres condiciones:

1\* Libre acceso del H<sub>2</sub>O a la superficie de la globina para mantenerla en solución, para ello el exterior molecular debe ser rico en cadenas laterales hidrofílicas polares.



El monómero de hemoglobina de caballo según la imagen generada por ordenador (Perutz, 1979) quedaría reflejado en la figura 1.

Los restos más numerosos son los hidrófobos (Ala, Val, Leu) siendo también muy abundante la histidina, cuyo grupo imidazol es responsable de una parte esencial de las propiedades funcionales de la molécula, como son: El poder tampón y el efecto Bhor.

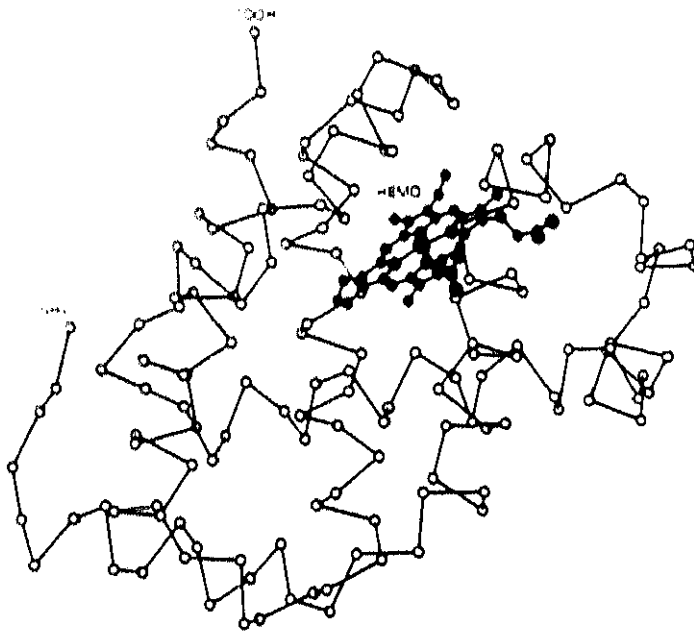


FIG. 1  
SUBUNIDAD DE  
HEMOGLOBINA

**La cadena alfa:** consta de 141 aminoácidos en secuencia lineal. El hierro del grupo hemo está unido por un enlace covalente al imidazol de un residuo histidina en la posición 87, es la llamada histidina proximal.

**La cadena beta:** es ligeramente más larga que la alfa, consta de 146 aminoácidos. El hemo se une a la histidina 92.

**Las cadenas delta, gamma, epsilon y zeta:** hay una homología estructural entre delta, gamma, epsilon y la cadena  $\beta$ , no en vano son productos de un grupo de genes localizados en el cromosoma 11 y tienen también 146 aa.

De la misma forma la cadena zeta es homóloga con la  $\alpha$ , posee 141 aa y es, como la  $\alpha$ , producto de los genes situados en el cromosoma 16.

2\* El interior de la molécula debe seguir siendo hidrofóbico, resultado de su alto contenido en aminoácidos lipofílicos.

3\* La molécula de globina debe mantenerse razonablemente rígida, lo que logra con una proporción extraordinariamente alta de aminoácidos en disposición helicoidal.

## 2.1 ESTRUCTURA PRIMARIA

Se refiere al esqueleto de la cadena polipeptídica de globina y establece de modo específico la secuencia de sus aminoácidos.

Las proteínas están compuestas por  $\alpha$ -aminoácidos unidos por un fuerte enlace covalente llamado enlace peptídico, que se establece entre los grupos carboxilo y amino de los aminoácidos.

Los aminoácidos tienen un grupo amino cargado positivamente y un grupo carboxilo cargado negativamente, neutralizándose estas cargas al establecerse el enlace peptídico, permaneciendo sólo cargados sus residuos N-terminal y C-terminal. Quedan también cargadas las cadenas laterales (grupos R), pudiéndose dividir los aminoácidos según la naturaleza de estos grupos laterales en hidrofílicos o polares, que se disponen en la superficie de la molécula o tapizando la cavidad central de la misma; e hidrofóbicos, situados en el interior molecular.

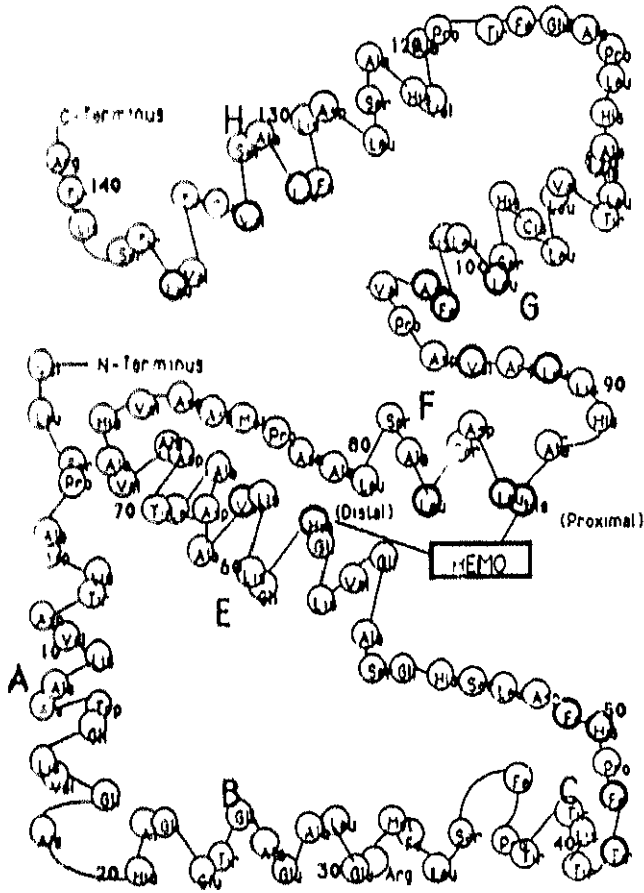


FIG 2 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA CADENA ALFA. Los segmentos helicoidales se señalan con letras mayúsculas. Se indica la relación del Hemo con la histidina proximal y distal

## 2.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA

Se refiere a la relación espacial entre residuos que están próximos el uno del otro en la secuencia lineal.

Las subunidades de hemoglobina son un buen patrón de  $\alpha$  hélice dextrógira, conteniendo aproximadamente 3,6 restos aminoácidos por vuelta, manteniéndose estables al formarse enlaces de hidrógeno intracatenarios entre el carboxilo de cada residuo y el grupo amino de otros aminoácidos.

En su estado nativo, alrededor del 75% de la molécula de hemoglobina es una  $\alpha$ -hélice, pero hay tramos que adoptan



una posición lineal, los cuales están situados entre las hélices, por donde la cadena suele angularse. Además hay dos pequeños segmentos helicoidales en los extremos.

Los segmentos helicoidales se denominan con letras que van desde la A a la H, comenzando por el extremo N-terminal de la molécula y los no helicoidales reciben su denominación a partir de las hélices entre las que están situados, es decir: NA, AB, CD, EF y así hasta GH (los segmentos teóricos BC y DE no existen como secuencias no helicoidales). Los dos pequeños segmentos lineales situados en los extremos se denominan NA y HC.

Debido a que el número de aminoácidos en las cadenas es diferente, 141 en  $\alpha$  y 146 en  $\beta$ , y con objeto de lograr una máxima homología entre las subunidades, cada aminoácido es numerado de acuerdo con su posición en la cadena lineal y con el lugar que ocupa en cada segmento, así por ejemplo la histidina F8 es la  $\alpha$ -87 y  $\beta$ -92.

### 2.3 ESTRUCTURA TERCIARIA

Hace referencia a cómo está plegada tridimensionalmente la cadena polipeptídica, refiriéndose a la situación en el espacio de los residuos aminoácidos que forman parte de la estructura lineal, lo que facilita la comprensión de las propiedades funcionales de la proteína.

La secuencia primaria de los aminoácidos es la que determina fundamentalmente los plegamientos de la proteína en el espacio tridimensional y solamente la secuencia primaria de aminoácidos es determinada genéticamente, produciéndose posteriormente las estructuras secundaria y terciaria por uniones entre los radicales de los aminoácidos que forman la misma.

Los plegamientos hacen que dentro de la forma esferoide que adopta la molécula, se cree una cavidad donde se alojará el hemo, denominada "bolsillo", limitada por las hélices B, G y H en el fondo, por las E y F en sus paredes y con una abertura, próxima a la superficie, tapada en parte por la hélice C y D. Esta cavidad está esencialmente tapizada por residuos cuyas cadenas laterales, fuertes hidrófobas, evitan la presencia de H<sub>2</sub>O y por tanto la oxigenación del átomo de O<sub>2</sub>.

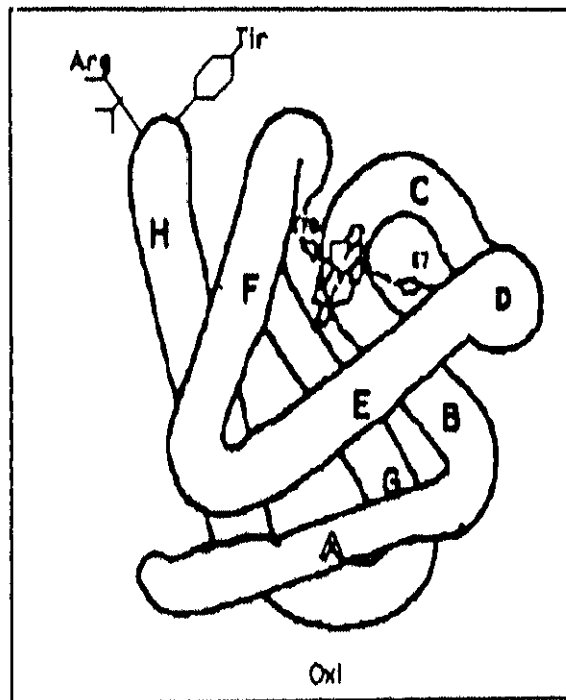


FIG. 3 DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA CADENA BETA

#### 2.4 ESTRUCTURA CUATERNARIA

Se refiere a la forma como se articulan las cuatro subunidades, lo cual se realiza no por fuertes enlaces covalentes, sino por uniones más débiles como son los enlaces iónicos y fuerzas no covalentes tipo Van der Waals.

La unidad funcional de la hemoglobina es un tetrámero de forma elipsoide, pero puede considerarse como dos dímeros colocados uno encima de otro.

Las diferencias físicas y químicas que se producen entre la forma OXI y DESOXI se manifiestan por cambios en la estructura cuaternaria de la molécula.

Al observar un tetrámero de hemoglobina se aprecia que cada cadena alfa contacta con las dos cadenas  $\beta$  a lo largo de dos diferentes superficies, de aquí que si las unidades son designadas Alfa 1, Alfa 2, Beta 1 y Beta 2, pueden definirse dos interfases entre distintas subunidades:  $\alpha_1 \beta_1$  y  $\alpha_1 \beta_2$ , que son estructuralmente idénticas a las  $\alpha_2 \beta_2$  y  $\alpha_2 \beta_1$ .

La interfase  $\alpha_1 \beta_1$  y  $\alpha_2 \beta_2$  permanecen relativamente fijas durante la oxigenación. La unión entre estos dímeros es muy estrecha debido a los 40 contactos entre residuos que en esta interfase se producen, incluyendo 9 puentes de hidrógeno, por lo que no hay diferencias entre la forma oxi y la desoxihemoglobina, permitiéndose movimientos sólo de 1Å.

El contacto en la interfase  $\alpha_1 \beta_2$  y  $\alpha_2 \beta_1$  son menos rígidos y permiten una mayor movilidad durante la oxigenación (7Å).

En la desoxihemoglobina (también llamada forma Tensa "T") hay alrededor de 40 contactos, incluyendo 19 puentes de hidrógeno. Cuando la hemoglobina se oxigena (oxihemoglobina ó forma Relajada "R") el número de contactos desciende a 22, incluyendo 12 puentes de hidrogeno.

Durante la transición de la estructura T a la R existe, por tanto una reestructuración de las subunidades con respecto al otro par.

Cada columna  $\alpha$  está fuertemente unida a la cadena  $\beta$  y el dímero así formado se mueve como un cuerpo rígido. Si un dímero se mantiene fijo, el otro gira 15 grados alrededor de un eje y se desplaza un tanto a lo largo de éste. La simetría doble de la molécula se mantiene, si bien el eje de simetría ha girado 7,5 grados. (Perutz, 1979).

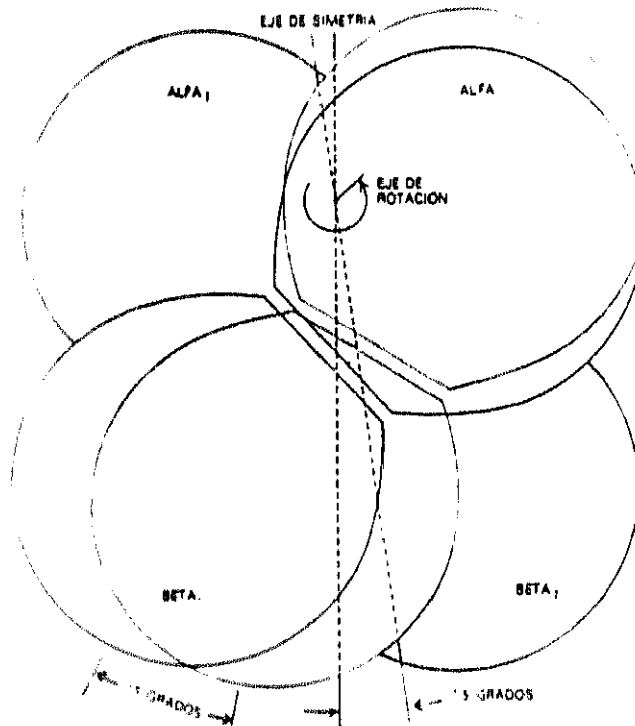


FIG. 4 REESTRUCTURACION DE LAS SUBUNIDADES durante la transición de la estructura T a la estructura R

Los contactos entre cadenas similares son muy escasos, así entre las cadenas  $\alpha_1$   $\alpha_2$  solamente se producen en la forma desoxi, aunque desempeñan un importante papel en la interacción Hemo-Hemo, efecto Böhr y el transporte de  $\text{CO}_2$ .

En cuanto a las cadenas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  al estar más separadas que las alfa permiten en la forma desoxi, que entre ellas se aloje una molécula de 2,3 DPG, lo que contribuye a aumentar la estabilidad de esta conformación.



FIG. 3 MOLÉCULA COMPLETA DE HEMOGLOBINA

## 2.5. HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS Y DEL ADULTO

Las cadenas de hemoglobina humana han sido denominadas de acuerdo con las letras del alfabeto griego, Alfa, Beta, Gamma, Delta, Epsilon y Zeta.

Las HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS fueron descubiertas en 1961 por Huehns y colaboradores (Huehns y cols, 1961) en la sangre de embriones humanos. Se denominaron Gower 1 y Gower 2, posteriormente Capp y colaboradores denominaron Hb Portland a una nueva hemoglobina, con propiedades electroforéticas semejantes a la Hemoglobina A a pH alcalino, pero que migra más rápidamente que ésta a pH ácido.

Son tres hemoglobinas transitorias, con una elevada afinidad por el O<sub>2</sub>.

**GOWER 1:** es un tetrámero compuesto por subunidades denominadas (Zeta 2 Epsilon 2).

**GOWER 2:** es un tetrámero compuesto por subunidades denominadas (Alfa 2 Epsilon 2). Las cadenas épsilon están codificadas por un gen del complejo de genes de la cadena beta, situado por tanto sobre el cromosoma 11.

**PORTLAND:** tiene (Gamma 2 Zeta 2). La cadena Zeta muestra una fuerte homología estructural con la cadena Alfa (Kamuzorra y cols., 1974), y cuyo gen se sitúa en el cromosoma 16.

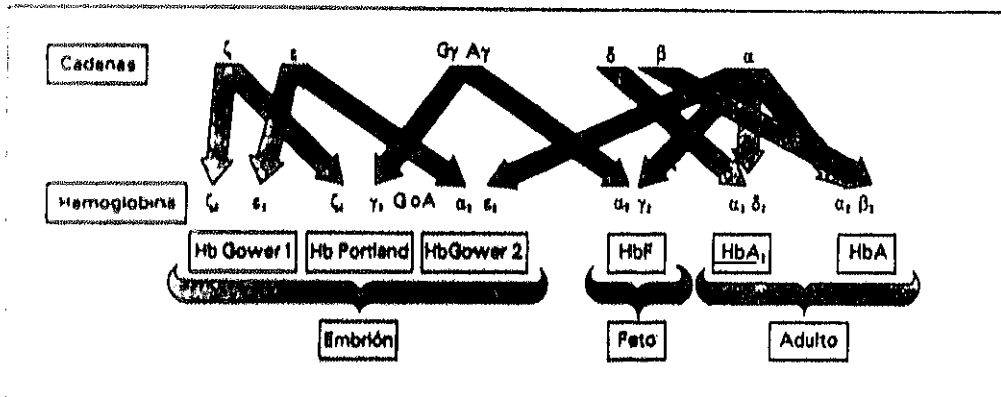


FIG. 6 HEMOGLOBINAS

Durante la vida fetal, la hemoglobina predominante es la Hemoglobina FETAL (Hb F) que es una (Alfa 2 Gamma 2) y aunque está presente en grandes cantidades al nacer (65 a 95%), en la vida adulta solo se producen trazas (menos del 1%) (Pataryas, 1972).

La hemoglobina F es una proteína heterogénea, su cadena Gamma, que difiere de la Beta en 39 de los 146 aminoácidos, puede contener un residuo alanina ó glicina en la posición 136, siendo designadas como A gamma ó G gamma respectivamente.

En el recién nacido el 75% es G gamma y el 25% A gamma (relación 3/1), por el contrario en el adulto, la pequeña cantidad de Hb F que poseen contiene 40% de G gamma y 60% de A gamma. La transición a este patrón de adulto tiene lugar durante el primer año de vida.

Otra importante heterogeneidad de la cadena gamma ha sido documentada, se trata de una sustitución de la Treonina por Isoleucina en la posición 75, esta sustitución se produce exclusivamente sobre la cadena Gamma A por lo que se le designa Gamma AT. Esta cadena gamma es la que forma la variante de la Hb F denominada SARDINIA cuya presencia se ha visto en el 30% de los recién nacidos blancos y en el 20% de la raza negra (Trecartín y cols.,1981; Pirastu y cols.,1984).

La Hb F puede estar aumentada en trastornos hereditarios tales como  $\beta$ -Talasemias, Persistencia Hereditaria de la Hemoglobina Fetal, Anemia Drepanocítica y en trastornos adquiridos tales como Anemia Megaloblástica, Aplasia Medular y en algunas Leucemias.

Los niveles de Hb F pueden también verse afectados por diferencias en la atracción para el ensamblaje de unas cadenas con otras, sugiriéndose que las subunidades alfa se combinan menos fácilmente con las gamma, que con las beta, habiéndose observado por tanto, Hb F más baja en recién nacidos con  $\alpha$ -Talasemia, que en aquellos que tienen los cuatro genes normales (Bunn,1987), lo mismo que en casos de deficiencia de hierro (Adams y cols.,1985).

La hemoglobina adulta normal (Hb A) es un tetrámero de globinas que consta de dos cadenas alfa y dos cadenas beta ( $\alpha_2 \beta_2$ ), como ya se ha comentado la cadena  $\alpha$  contiene 141 restos de aminoácidos, mientras que la cadena  $\beta$  la constituyen 146 aminoácidos. En el adulto normal, el 97% de la hemoglobina es A, mientras que en el recién nacido su cuantía es del 20 al 40 % y solamente una pequeña cantidad es Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ).

La Hb A<sub>2</sub> en el adulto representa el 2,5 % del total de hemoglobina, mientras que en el neonato no suele superar el 0,5 %. En cuanto a la estructura hay una marcada homología entre la cadena  $\beta$  y la delta ( $\delta$ ), difieren solamente en 10 de los 146 aminoácidos.

El significado fisiológico de la Hb A<sub>2</sub> no se conoce, su función es probablemente la misma que la de la Hb A. Puede encontrarse aumentada en  $\beta$ -Talasemia, en algunas variantes de hemoglobinas inestables, hemoglobina A/S, Anemia Megaloblástica y en hipertiroidismo. Por otra parte está disminuida ó normal en estados de carencia de hierro, Anemia Sideroblástica y en Talasemias  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\delta\beta$ , Hb Lepore y PHHF (Bunn y cols., 1977).

## 2.6. ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA

Las hemoglobinas que predominan en el embrión son la Gower 1, Gower 2 y Portland; la proporción de las dos primeras fué del 42% y 24% del total respectivamente, el resto fué Hb Fetal. En las etapas posteriores la proporción de hemoglobinas Gower desciende hasta ser casi indetectables en la 10ª a 12ª semana de gestación.

El tiempo de aparición y desaparición de la Hb Portland ha sido más difícil de determinar.



La hemoglobina Fetal aparece precozmente durante la gestación, 30 % del total de la Hemoglobina de embriones se incrementa posteriormente hasta un 90 % del total hacia la 8ª a 10ª semana, permaneciendo así hasta poco antes del parto.

A los seis meses de vida extrauterina la cantidad de Hb F es el 1 % ó inferior, aunque pueda encontrarse normalmente en niveles de 2 a 5 % en niños normales, para posteriormente al año, situarse en los valores que mantendrá durante toda la vida.

La hemoglobina A, en cantidades del 5 al 10 % es detectada en fetos normales desde la 6ª semana en adelante, aunque electroforéticamente no sea demostrable hasta la 12ª semana (Pataryas y cols., 1972).

Pequeñas cantidades de cadena beta pueden comprobarse por síntesis de globinas antes de la 6ª semana. Posteriormente, aunque se observa un ligero incremento en la síntesis de cadena beta (hacia la 12ª a 20ª semana) la proporción permanece constante hasta iniciarse la síntesis de hemoglobina del adulto.

La hemoglobina A<sub>2</sub> es la última en aparecer, comenzando su producción en el tercer trimestre de vida intrauterina, detectándose solo trazas de Hb A<sub>2</sub> en la sangre de cordón umbilical. Su síntesis va incrementándose a lo largo de los seis a doce primeros meses de vida hasta alcanzar el nivel definitivo.

El déficit ó anomalía de la cadena alfa se manifiesta mejor en el periodo neonatal. En esta etapa de desarrollo, la cadena  $\beta$  va aumentando progresivamente con respecto a la cadena gamma y puesto que la apetencia de la cadena  $\alpha$  es mayor por la  $\beta$ , se detectan mejor las pequeñas cantidades de Hb Bart (4 gammas).

Además, como la cadena Alfa se combina secuencialmente con la Epsilon, Gamma, Beta y Delta, para formar las hemoglobinas Gower 2, F, A y A<sub>2</sub> respectivamente, las alteraciones de la misma pueden afectar a todas las etapas del desarrollo.

**BIOSINTESIS  
DE LA  
HEMOGLOBINA**

### 3. BIOSINTESIS DE LA HEMOGLOBINA

#### 3.1. ORGANIZACION Y ESTRUCTURA DE LOS GENES DE HEMOGLOBINA HUMANA

##### I-RECUERDO HISTORICO

El siglo XXI será la época del gen. En los laboratorios e institutos de investigación de todo el mundo, equipos de científicos están tratando de obtener el secreto de la herencia humana, el objetivo final se conoce como **GENOMA HUMANO**, esto es, el conjunto de unos 100.000 genes que contienen todas las instrucciones para que la naturaleza cree un ser humano. Por tanto, para principios del siglo XXI, los científicos esperan haber desenredado, diseccionado y comprendido las instrucciones escritas en cada gen.

Las consecuencias serán enormes, el conocimiento del genoma humano no es un fin en sí mismo, más bien abrirá un camino hacia una meta superior, volver a escribir la herencia y si así lo decidimos nos podremos liberar de enfermedades como la fibrosis quística o el cancer (Spritz y cols., 1980; Eaton, 1980).

Este viaje se inició en 1953, en la universidad de Cambridge, cuando James Watson y Francis Crick, descubrieron que el mensaje de nuestra herencia estaba escrito en forma química, codificado en las espirales de la molécula de doble hélice del ADN.

El ADN se localiza en el núcleo formando parte, junto con nucleoproteínas e histonas, de los cromosomas. Está constituido por un azúcar, la desoxiribosa, al que se unen unas estructuras anulares cíclicas nitrogenadas, las bases que pueden ser de dos tipos: púricas (Adenina y Guanina) o pirimídicas (Citosina y Timina).

El compuesto químico formado por la unión de una base a la desoxirribosa se denomina nucleósido, éstos se unen entre sí mediante residuos fosfato originando una estructura denominada NUCLEOTIDO. El ADN está formado por cadenas de nucleótidos conectados entre sí por puentes fosfato que unen al extremo 5' de un azúcar con el 3' del siguiente. Paralelamente a la cadena de ADN se coloca otra igual y complementaria, de manera que frente a una guanina (G) siempre se coloca una citosina (C) y frente a una timina (T) siempre se coloca una adenina (A), ver figura 7.

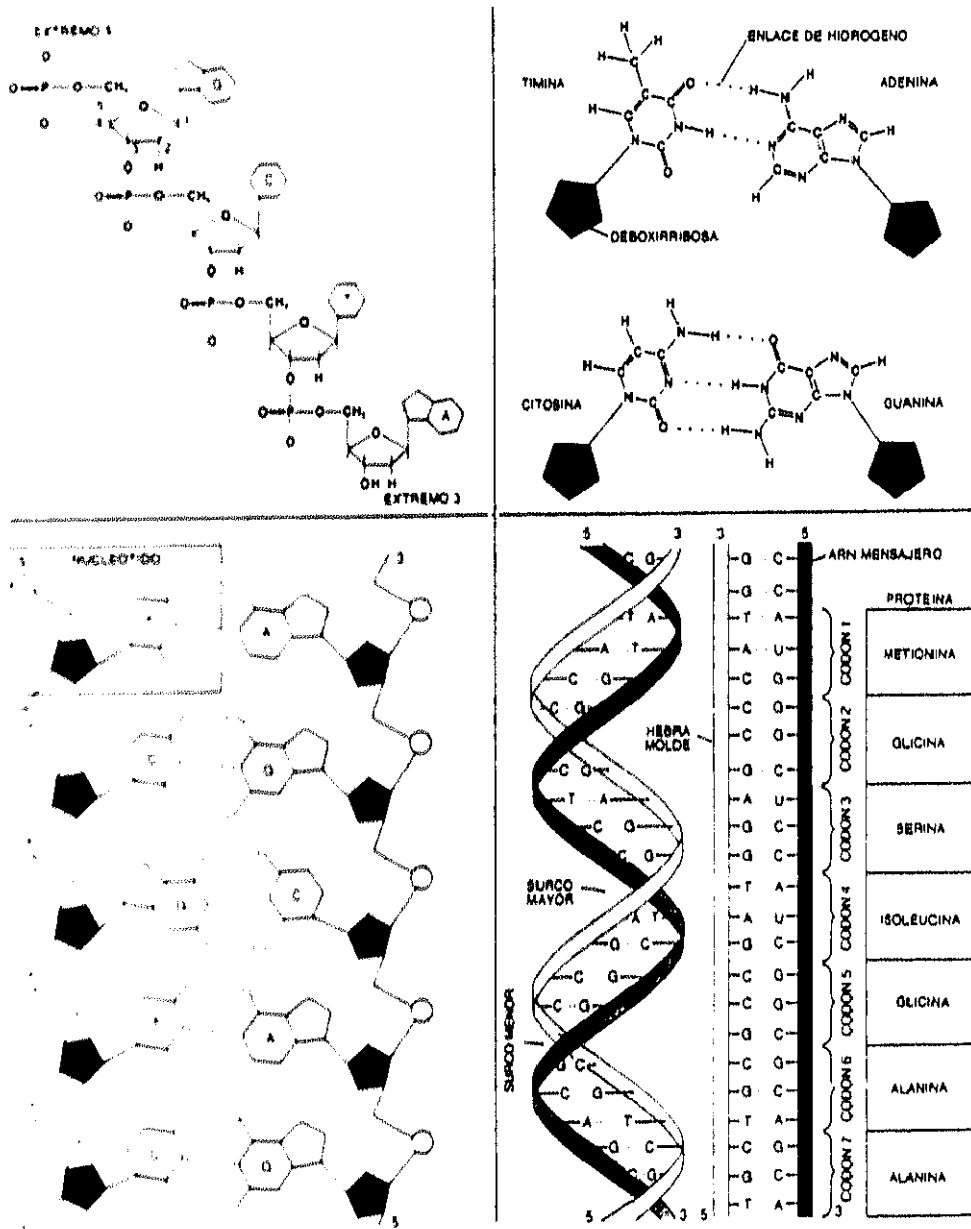


FIG. 7 ESTRUCTURA DEL ADN

La doble hélice así formada tiene un eje central, constituido por las bases apiladas, y un esqueleto periférico constituido por los azúcares unidos mediante grupos fosfato.

Mientras que la información hereditaria está escrita en la secuencia de nucleótidos del ADN, la estructura de cada proteína va a depender de la secuencia de sus aminoácidos. La diferencia esencial radica en que el ADN contiene cuatro nucleótidos distintos mientras que las proteínas contienen 20 aminoácidos diferentes.

La clave genética o código genético, va a ser el diccionario que relaciona los lenguajes del ADN y las proteínas. El texto nucleico se lee en una dirección prefijada y contiene señales de iniciación y terminación del mensaje; los nucleótidos comprendidos entre una y otra se leen sucesivamente en grupos de tres (codones).

Cada triplete de nucleótidos significa un aminoácido determinado. Hay 64 tripletes posibles, tres de ellos no significan ningún aminoácido y se usan como señales de terminación. Los otros 61 tripletes significan aminoácido; como sólo hay 20 aminoácidos distintos, varios tripletes pueden determinar un mismo aminoácido. Un triplete, el que determina el aminoácido metionina, se usa como señal de iniciación.

**El código genético**

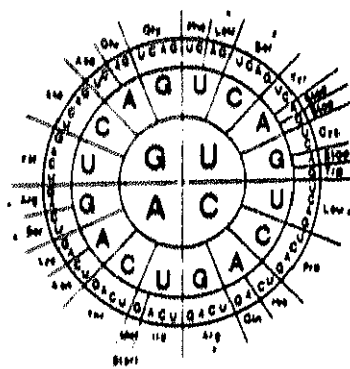


FIG. 8  
EL CODIGO GENETICO

Los codones se leen de dentro afuera.  
Los aminoácidos marcados con un asterisco son codificados por más de un codón.

Se escogieron los nucleosidos del mRNA si se prefiere utilizar los símbolos correspondientes al DNA es suficiente sustituir la uridina (U) por la desoximidina (T).

El genoma humano está constituido por alrededor de  $3 \times 10^9$  pares de bases [la unidad habitual de medida del ADN es el kilobase (Kb), de tal manera que podemos decir que el genoma humano mide tres millones de kilobases] agrupados en secuencias denominadas genes que codifican entre 30.000 y 100.000 proteínas diferentes. De todo el genoma humano, sólo el 10 % de sus secuencias están encargadas de codificar proteínas.

El ADN no pasa al citoplasma, lugar donde tiene lugar la síntesis de proteínas por lo que debe transmitir su información a una molécula intermediaria, el ARN.

Un gen no es sino un fragmento de ADN que contiene la información necesaria para sintetizar una cadena polipeptídica.

No toda la secuencia de nucleótidos que constituyen los genes está implicada en la síntesis proteica, podemos precisar que los genes están formados por dos tipos de segmentos: los encargados de codificar las proteínas, **EXONES** y otros, utilizados en la regulación de la expresión genómica, los **INTRONES**. Además de estos segmentos, en el extremo 5' de los genes, se localizan secuencias que no se transcriben pero son de gran importancia para regular el inicio de la transcripción (promotores) y la intensidad de los mismos (potenciadores).

La información se transmite desde el gen hasta la proteína siguiendo la secuencia:



El primer flujo de información necesita de la presencia de una enzima, la ARN polimerasa encargada de pasar la información del ADN a una molécula de ARN, ésta última tras sufrir una serie de modificaciones en el núcleo por las que pierde las secuencias correspondientes a los intrones, pasa al citoplasma denominándose ARN mensajero (ARNm). Una vez en el citoplasma, el ARNm se une a los ribosomas, estructuras que contienen otro tipo de ARN, el ARN ribosómico (ARNr). Un tercer tipo lo constituye el ARN de transferencia (ARNt) que actúa reconociendo los dos códigos en juego (el de bases y el de aminoácidos), existiendo al menos un ARNt específico para cada aminoácido. Estas moléculas transportan una secuencia de bases codificadas por sus aminoácidos que son complementarias al codon del ARNm y que se denomina anticodon del ARNt. El apareamiento codon-anticodon es el proceso responsable de la incorporación del aminoácido a la cadena proteica en síntesis (Watson y cols., 1986).

## II-HEMOGLOBINA

El número y la estructura de las diferentes hemoglobinas humanas normales requería que hubiese al menos un gen distinto para cada una de las cadenas de globina.

Del estudio de las variantes de hemoglobina y del análisis de la heterogeneidad bioquímica de las cadenas gamma y alfa estaban duplicados. Sin embargo, la conexión de los distintos genes no  $\alpha$  se estableció al estudiar las variantes de hemoglobina que contenían cadenas fusionadas, presumiblemente resultantes del entrecruzamiento no homólogo entre locus de genes de globina no  $\alpha$ . Así pues la Hb Lepore con su fusión delta-beta, estableció que el gen de globina delta estaba localizado sobre el lado 5' (o N-terminal) del gen de globina beta, mientras que en la Hb Kenia con su cadena fusionada gamma-A-beta proporcionó datos para la posición del gen gamma A sobre el lado 5' de los genes delta y beta.

Deisseroth y colaboradores establecieron claramente que los genes de la globina humana alfa y beta residían sobre cromosomas diferentes (Deisseroth y cols., 1976), y que los genes alfa se localizaban sobre el brazo corto (banda p 13.3) del cromosoma 16 (Gonzalez-Redondo y cols., 1988), mientras que el grupo de los genes beta se situaban en el cromosoma 11 sobre el tercio distal del brazo corto más allá de la banda p 14 (Deisseroth y cols., 1978).

Los genes de la globina humana se agrupan en dos conjuntos denominados familia Alfa ó grupo "Alfa-Like" y familia Beta ó grupo "Beta-Like" distribuidos en el cromosoma desde el N-terminal (5') al C-terminal (3') en el mismo orden en el que se expresan durante el desarrollo.



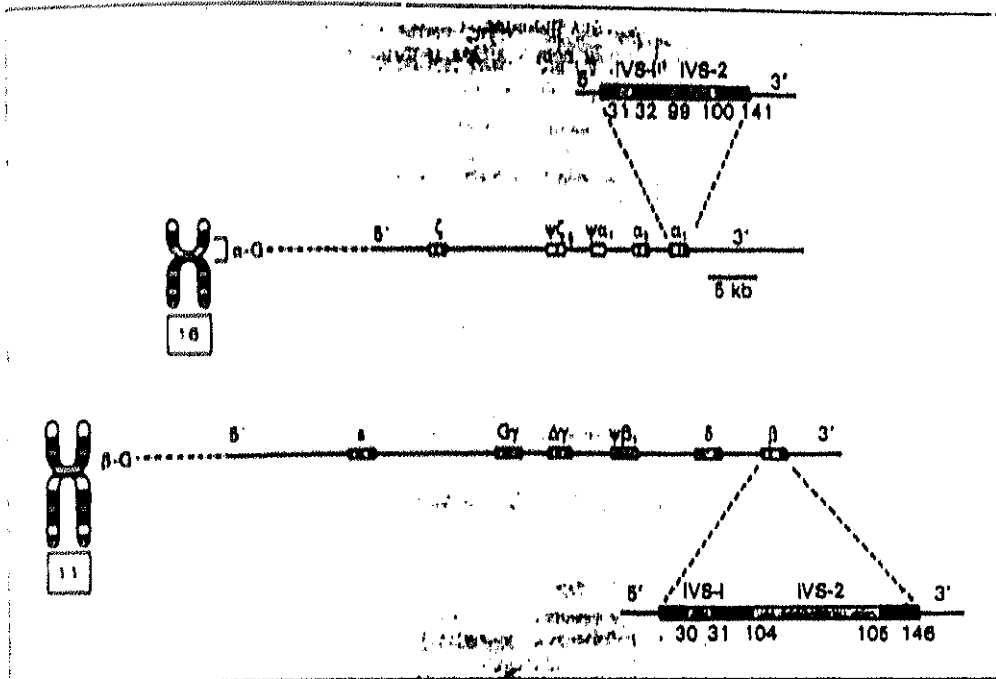


FIG 9 MAPA CROMOSOMICO

El grupo de genes alfa está localizado en un segmento de 40 Kb sobre el cromosoma 16 p 13.3 en el siguiente orden:

5'-Zeta 2-Pseudo Zeta 1-Pseudo  $\alpha_2$ -Pseudo  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\beta$ -3'

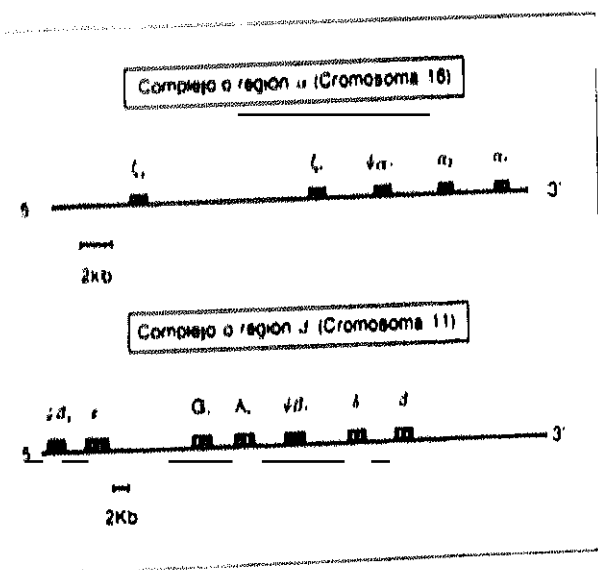


FIG 10 Localización cromosómica de los genes que codifican la síntesis de las cadenas globínicas: región  $\alpha$  (cromosoma 16) y región no- $\alpha$  (cromosoma 11)

Incluye por tanto tres genes funcionales, tres pseudogenes y un gen descrito recientemente  $\phi 1$ , todavía con funciones no definidas (Grosveld y cols., 1981).

El grupo de genes beta se localiza en el tercio distal del brazo corto del cromosoma 11 más allá de la banda p 14, en el siguiente orden:

5'-Epsilon-Gamma G-Gamma A-Pseudo  $\beta$ -Delta-  $\beta$ -3'

Al principio se detectaron dos pseudogenes en el grupo de genes no alfa, uno entre los genes Gamma A y Delta (Pseudo  $\beta$  1) y otro 5' en el gen Epsilon que le llamaron Pseudo  $\beta$  2, confirmandose posteriormente que éste último no era un verdadero pseudogen.

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

Si se realiza un ESTUDIO DE LOS GENES, vemos que están separados entre sí por una cantidad variable de pares de bases, conocidas como "distancias intergénicas", observándose que los genes que han aparecido en una duplicación relativamente reciente, están situados más próximos que los evolutivamente más antiguos, tal como sucede con los dos genes alfa, delta, beta y los dos gamma, mientras que las distancias son mayores con los genes epsilon y zeta.

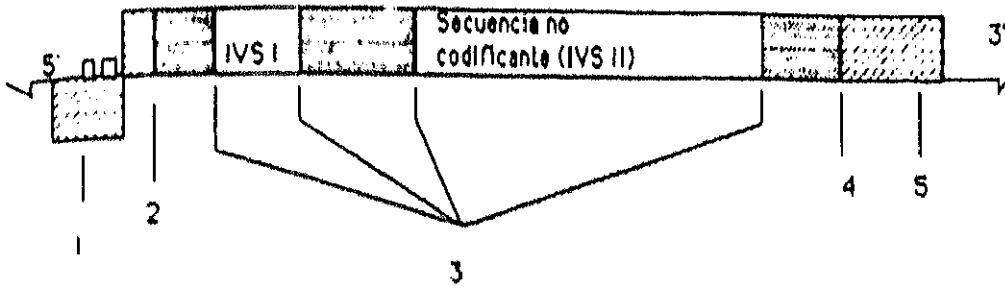
Así mientras que sólo 4 Kb separan los dos genes alfa, más de 20 Kb les separan del gen embrionario zeta, ocurriendo lo mismo con el grupo beta donde sólo 5 a 6 Kb median entre el par de genes delta, beta y los dos gamma siendo las distancias mucho mayores, de 15 a 16 Kb las que le separan del gen epsilon.

En este ADN intergénico existen "secuencias repetitivas" del mismo denominadas Alu 1 o Kpn1 cuyo papel preciso se desconoce.

En el extremo 5' de los genes de globina hay tres grupos de secuencias que son comunes a todos ellos, que se sitúan a una distancia relativamente similar del lugar de iniciación de la transcripción (el lugar 5'CAP del ARNm) que se conocen como "cajas promotoras" y que presumiblemente constituyen lugares de unión u otras señales reguladoras para la ARN polimerasa II.

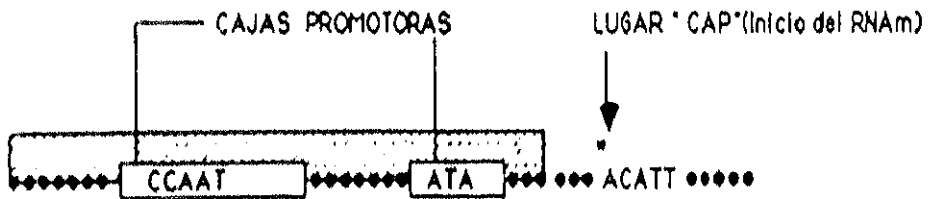
Estas cajas promotoras son la ATAA, situada 30 nucleótidos del lugar CAP, la CCAAT situada a 75 del CAP y la tercera más variable que se sitúa a unos 100 nucleótidos del CAP y es la GGGGGCG. (Michelson, 1983)

Estas secuencias son fundamentales para la expresión normal de genes de globina, de tal forma que en ocasiones una expresión disminuida de los genes beta de la globina, en ciertas formas de  $\beta$ -talasemia, son debidas a sustitución de bases en esas secuencias. En el extremo 3' todos tienen la secuencia AAUAAA la cual se considera una señal para la adicción del poli A al ARN transcrito.



A - Señales de transcripción.

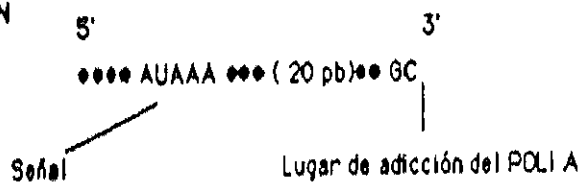
1-REGION DE ALTA HOMOLOGIA NECESARIA PARA LA TRANSCRIPCION COMPLETA



B - Señales para el procesamiento del RNAm.

3-LUGARES DE ROTURA (SPlicing) 5' GU ●●● IVS ●●● AG 3'

5-SEÑAL DE POLIADENILACION



C - Señales de traducción del RNAm.

2 -CODON INICIADOR ( AUG en el RNAm ) (INICIO DE LA TRASLACION)

4- CODON FINALIZADOR (UAA en RNAm) (FINAL DE LA TRASLACION)



FIG 11 ANATOMIA FUNCIONAL DEL GEN DE GLOBINA BETA

Los genes tienen dos secuencias de bases que se transcriben a ARNm, pero se prenden antes de que éste llegue al citoplasma, denominadas secuencias no codificadoras ó INTRONES, que separan a tres fragmentos de secuencias denominadas codificantes o EXONES cuya transcripción, si produce ARN detectable en el citoplasma y por tanto interviniendo en la síntesis de la proteína (Lawn y cols, 1980).

Los exones de los genes  $\alpha$  tienen una longitud de 93, 204 y 126 pares de bases que codifican los aminoácidos que van del 1 al 31, del 32 al 99 y del 100 al 141 en la estructura primaria y sus intrones tienen una longitud de 127 y 134 bases de longitud.

Los genes  $\beta$  también tienen tres exones, que codifican los residuos aminoácidos del 1 al 30, del 31 al 104 y del 105 al 146 respectivamente, separados por dos intrones de 122 al 130 bases el primero y de 850 a 914 bases el segundo.

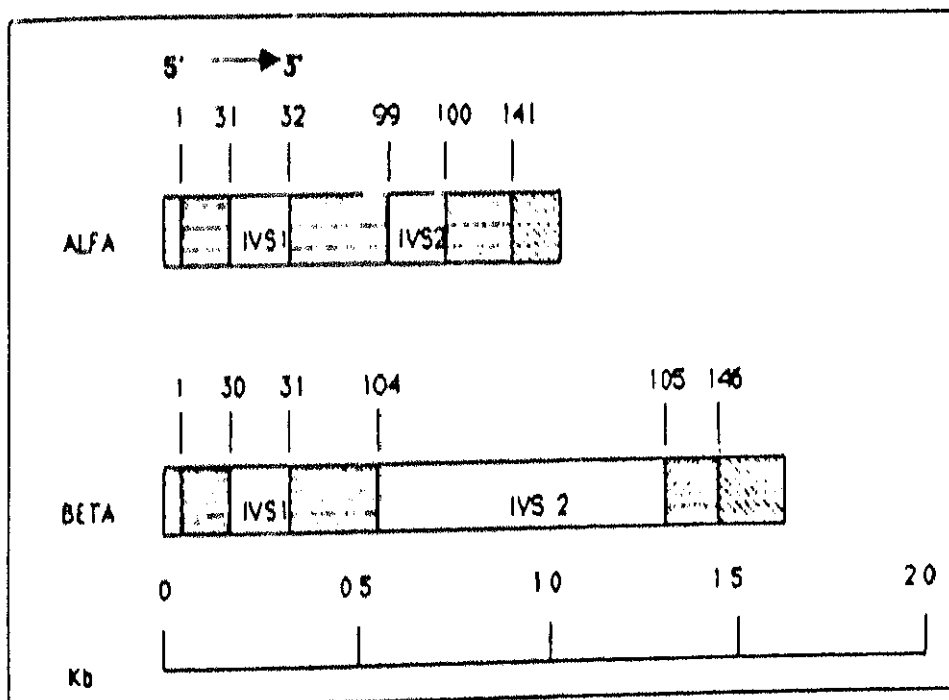


FIG. 12 ESTRUCTURA DE LOS GENES ALFA Y BETA

Por tanto el exón central de los diferentes genes de globina codifican la región de unión con el Hemo y la mayoría de los contactos entre subunidades Alfa 1- Beta 2, mientras que los dos genes laterales codifican las regiones que no se unen al Hemo (High, 1985).

En el estudio de las secuencias codificantes de los exones, si bien parece que todos los posibles codones para un aminoácido dado se utilizan de una manera aparentemente al azar sin predilección estadísticamente significativa, se ha observado una marcada tendencia al uso de ciertos codones de entre los posibles para algunos aminoácidos, como es el caso de la valina con el codon CUG y la leucina con el CUG.

## 3.2. SINTESIS DE LA GLOBINA

Las etapas incluidas en la expresión genética y en la síntesis proteica se ilustran esquemáticamente en la Fig.13

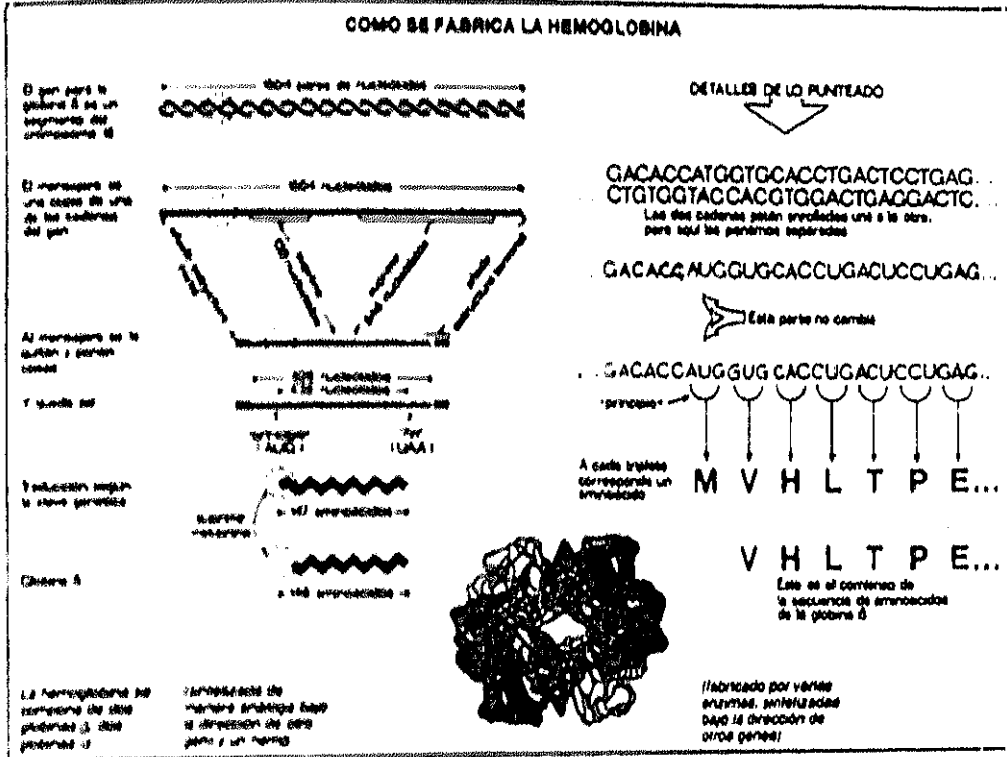


FIG. 13 COMO SE FABRICA LA HEMOGLOBINA

Siguiendo el esquema anterior podemos considerar dos etapas en la síntesis proteica:

### 1. Transcripción

Fenómeno básico mediante el cual una parte del ADN es copiado al ARN.

Todo gen es transcrito, sufriendo posteriormente una serie de modificaciones como son, la adición en la región 5' de la estructura CAP y en el 3' una cadena de residuos poliadenílicos, el Poli A, proceso que se conoce como "CAPPING".

Seguidamente es separada la parte del ARN que corresponde a los intrones y aproximados y unidos los extremos finales de las secuencias codificantes para formar ARNm maduro. Este proceso es lo que se conoce como "SPLICING" o **Empalme**. En este empalme parece ser importante la unión del fragmento con un ARN de bajo peso molecular (RNA U1), el cual forma parte de una pequeña partícula ribonucleínica nuclear y la presencia de secuencias de nucleótidos específicas en las uniones entre exones e intrones.

Algunos tipos de  $\beta$ -Talasemias pueden producirse por una anomalía de éste fenómeno. Después de este procesamiento en el núcleo, este ARN maduro es transportado al citoplasma.

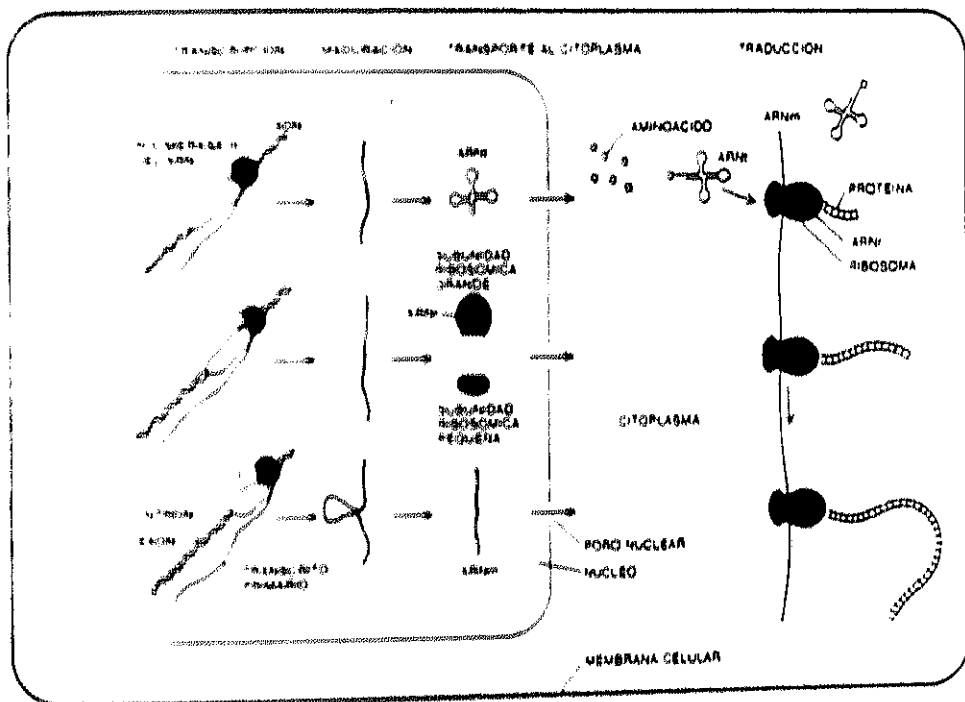


FIG. 14 SINTESIS DE GLOBINA



## 2. Traducción

Comprende el conjunto de procesos que se realizan en el citoplasma del eritroblasto para producir las cadenas de globina. El ARNm es el molde sobre el que secuencialmente los residuos de aminoácidos se unirán unos a otros siguiendo varias fases:

\* **Activación:** el ARNt se encuentra doblado en su mitad dejando en esta dobladura un triplete de bases sin aparear (anticodon), que debe complementarse con los codones de ARNm. A cada molécula se le une por esterificación un aminoácido específico, catalizándose este proceso por una aminoacil-ARNt-sintetasa en presencia de ATP y magnesio, originando un aminoacil-ARNt.

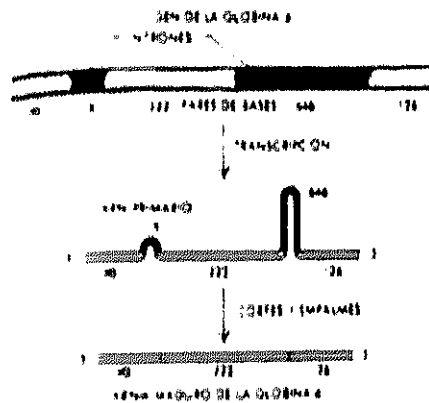


FIG 15 Eliminación de intrones durante la maduración del ARNm de la  $\beta$ -globina

\* **Iniciación:** en esta etapa se produce la unión del ARNm al ribosoma, con reacciones enzimáticas complejas que aproximan hasta juntar el ARNm, la subunidad ribosómica 40S, un ARNt iniciador especial, el cual lleva el aminoácido metionina y la subunidad ribosómica 60S. La reacción requiere un número de factores proteicos añadidos GPT y ATP.

El codon iniciador AUG del ARNm (complementario del UAC del ARNt) señala el punto de arranque para la traducción del ARNm, constituye también el único codon para el aminoácido metionina, siendo posteriormente escindido.

\* **Elongación:** cuando van llegando nuevos ARNt con su aminoácido (aminoacil ARNt) al ribosoma, se unen a éste mediante la intervención de un factor de elongación EF-1, en presencia del cofactor GPT.

Se va uniendo al codon complementario del anticodon transfiriéndose el aminoácido transportado a la cadena en formación, abandonando el ribosoma y avanzando un puesto el aminoácido recién llegado, con lo que queda libre un nuevo punto aceptor, repitiéndose así el proceso.

El ribosoma se desplaza como a través de un rail realizando la lectura del ARNm desde el extremo 5' hasta el 3' de una forma ininterrumpida y sin saltos, hasta encontrar la señal de finalización.

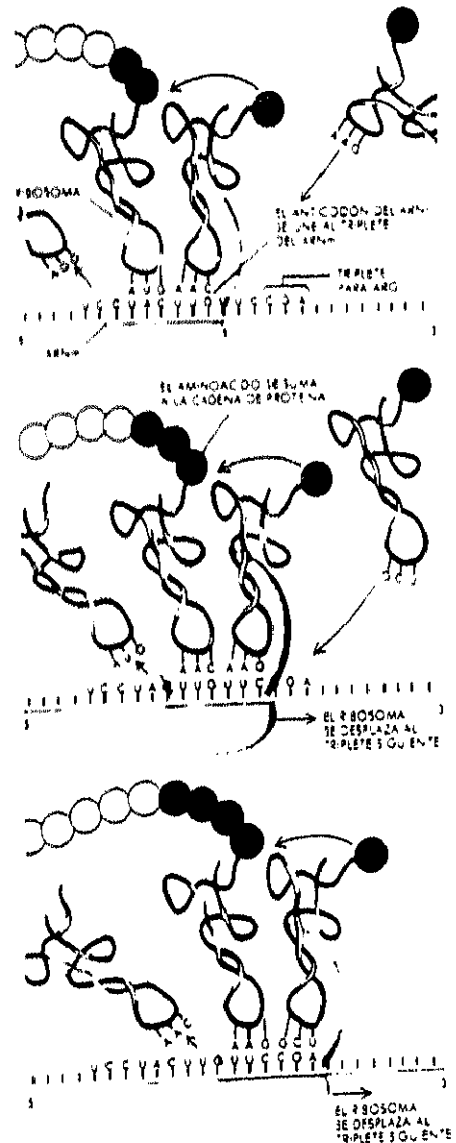


FIG. 16 En el ribosoma los tripletes del ARNm se aparean con las anticciones de los ARNt cargados con aminoácidos

\* Finalización: la cadena peptídica crece hasta que el ribosoma encuentra alguno de los tres codones de finalización ( UAA, UAG, UGA) que le indican que la síntesis de la cadena debe cesar. Separándose el polipéptido del ARNt por acción de la Peptidil-Transferasa, que en presencia de un factor de liberación actúa como una hidrolasa, disgregándose así mismo las dos partes del ribosoma que participarán posteriormente en la síntesis de otras cadenas.

### REGULACION DE LA SINTESIS DE LA GLOBINA

Los factores específicos que activan la expresión del gen de globina en las células eritroides y la suprimen en las no eritroides, no se conocen, aunque algunos datos caracterizan y diferencian los genes activos de los inactivos y proporcionan alguna información sobre los prerrequisitos para la expresión del gen de globina, así:

- El estado de metilación del ADN de un gen, influencia su capacidad para ser expresado. En general los genes que están siendo activamente transcritos están casi siempre hipometilados. En los tejidos no eritroides los genes de globina están generalmente metilados extensamente como puede esperarse de genes inactivos.

Aunque la hipometilación del ADN en el lado 5' pueda ser un prerrequisito para la expresión del gen, es probable que no sea el suceso primario y sean otros factores responsables del inicio, una vez que el gen está en situación de ser expresado (Proudfoot y cols., 1980). Además otros factores deben ser requeridos para causar su metilación en regiones específicas de un gen determinado en un tejido y tiempo específico del desarrollo.

- Estructura de la cromatina: el ADN se encuentra en la célula asociado con distintas proteínas para formar la cromatina. La estructura física de la cromatina puede

variar en regiones donde el ADN está transcribiéndose activamente, siendo más sensibles en esta situación a la digestión por nucleasas, por lo que en algunos aspectos, la sensibilidad de un gen dado a la nucleasa, parece ser otro prerrequisito para la expresión del mismo.

- Asociación con la matriz nuclear es otro dato de los genes activamente transcritos, es decir que tienden a estar asociados preferencialmente con una estructura filamentosa reticular, llamada matriz nuclear.

Ya en el citoplasma, a nivel de la etapa de iniciación de la cadena, parece tener lugar una regulación menor de su síntesis por el grupo Hemo, dado que la presencia de Hemo o de hierro estimula la misma y en situaciones de déficit, se origina un freno en la síntesis principalmente de la cadena  $\alpha$ , produciéndose una situación de pseudo  $\alpha$ -talasemia.

### 3.3. SINTESIS DEL HEMO (Moore, 1980)

El Hemo consiste en un ión divalente de hierro rodeado por un anillo de Protoporfirina IX, cuando el hierro se oxida forma el Hemo.

La síntesis del hemo comienza con la condensación de Glicocola y Succinil-CoA, y consta de varias etapas fundamentales, dos de ellas mitocondriales. (Ver fig. 17).

En la primera de ellas se sintetiza el precursor: ácido delta amino levulinico [Delta-ALA], mediante la acción enzimática de la delta amino levulinato sintetasa (Delta-Ala-Sintetasa) cuyo cofactor es el piridoxal fosfato (Vit. B<sub>6</sub>) y el ión ferroso.

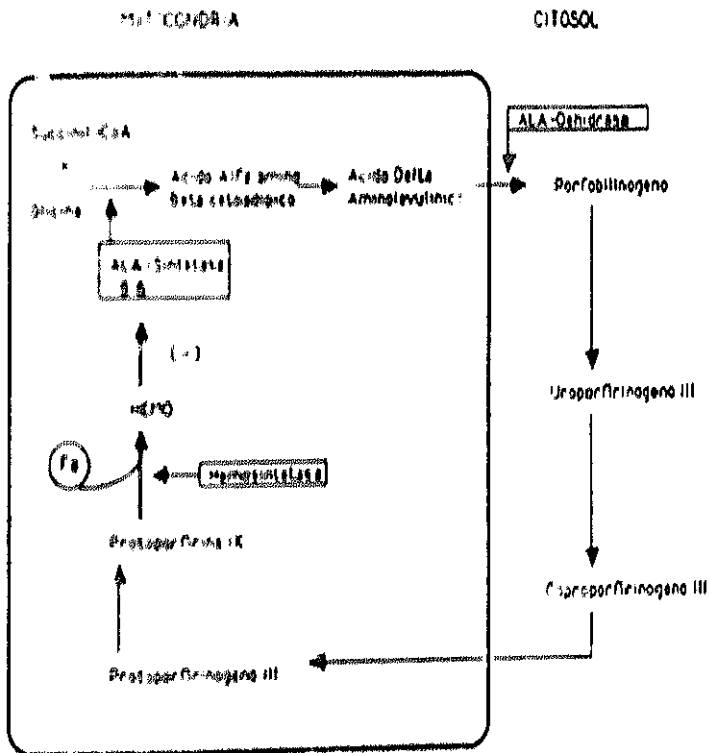


FIG. 17 Esquema de la biosíntesis del Hemo

En la segunda etapa, con intervención de una cadena enzimática donde destaca la ALA-Deshidrasa, se produce la condensación de dos moléculas de ALA para formar Porfobilinógeno (PBG).

En sucesivas etapas, y a través de varias reacciones de isomerización, con condensación de cuatro moléculas de PBG, se forma un tetrapirrol, la Protoporfirina IX al que finalmente se incorpora el hierro ( $Fe^{++}$ ), mediante una reacción enzimática catalizada por una Hemosintetasa obteniéndose así el grupo Hemo (Gidari,1977).

La síntesis del hemo es en gran parte controlada por el proceso de represión del producto final y feedback negativo (inhibitorio) de la enzima ALA-Sintetasa. El propio grupo hemo tiene dos efectos sobre esta enzima, el primero, interacciona directamente con la enzima y la inactiva (represión del producto final), y en segundo lugar, la ALA-Sintetasa tiene una vida media corta, sus niveles celulares descienden rápidamente despues que su síntesis es suprimida debido a una inhibición feedback (Tenhunen,1972). Similares mecanismos afectan la actividad de la hemosintetasa pudiendo limitar la formación del hemo desde la Protoporfirina (Lebo y cols.,1979).

La síntesis del hemo es tambien controlada hasta cierto punto por la síntesis de globina; la inhibición está probablemente mediada por la vía del hierro libre, el cual se acumula en ausencia de síntesis de globina.

La reducción anormal de la síntesis del hemo observada en la talasemia presumiblemente resulta de un mecanismo similar debido al inicial descenso en la síntesis de globina que ocurre en este desorden.

### 3.4. ENSAMBLAJE DE LAS SUBUNIDADES DE HEMOGLOBINA

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

Una biosíntesis eficiente de hemoglobina requiere la producción balanceada de cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ , permitiéndose un ligero desajuste en la biosíntesis, debido a los eficaces mecanismos proteolíticos de los precursores eritroides (Jelinek, 1982).

Una vez que cantidades equivalentes de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  han sido traducidas de sus respectivos polirribosomas y que el Hemo ha sido insertado, las subunidades de hemoglobina formarán dímeros  $\alpha$ - $\beta$  facilitados por la atracción electrostática de la subunidad  $\alpha$  cargada positivamente con la subunidad  $\beta$  negativamente cargada. Estos dímeros se disocian muy lentamente, al contrario que el tetramero el cual fácilmente se disocia en dímeros (Anfinsen, 1973 ; Perutz, 1970).

Este modelo de ensamblaje de la hemoglobina explica los diferentes niveles de mutantes de hemoglobina con cargas positivas y negativas que pueden encontrarse en heterocigotos, así como el efecto que las  $\alpha$ -Talasemias y los estados de deficiencia de Hemo ejercen en la modificación del nivel de las variantes de hemoglobina.

Como podría esperarse del patrón de herencia, ya que un gen es heredado de cada padre, un individuo heterocigoto para una variante de cadena  $\beta$  debería tener aproximadamente niveles iguales de hemoglobina normal y anormal, sin embargo diversos factores independientes influyen la formación de hemoglobina normal y de mutantes.

Así, algunas variantes se sintetizan en una cuantía significativamente más baja que su contrapartida normal, tal es el caso de la Hb E, Hb Lepore y Hb Knosos (Orkin y cols., 1984), en las cuales la mutación conduce a un defecto en el procesamiento del ARNm y por tanto a una síntesis reducida de la proteína y en consecuencia un fenotipo talasémico.

En contraste, la gran mayoría de las variantes tienen unos índices de transcripción y traducción normales, existiendo otros factores que influyen la cuantía de esta hemoglobina en los hematíes, así:

1) la estabilidad de la subunidad anómala. La mayoría de las variantes inestables de la cadena  $\beta$ , representan menos de 30 % del total de hemoglobina, debido a un aumento en el catabolismo de la variante tanto en el precursor eritroide como en la circulación periférica.

2) la diferencia en la velocidad del ensamblaje de las subunidades, lo que puede explicar las desigualdades en los niveles de la mayor parte de las variantes estables.

En este último caso, si la variante  $\beta$  es producida con velocidad, estabilidad y solubilidad normal, los heterocigotos deberían tener igual cantidad de hemoglobina normal que anormal, sin embargo en muchas ocasiones no ocurre así, encontrándose variantes  $\beta$  en cantidades significativamente más bajas que la hemoglobina A.

Esto suele producirse con las hemoglobinas anormales, que poseen cadenas cargadas positivamente en las que además al asociarse con  $\alpha$ -Talasemia, la cantidad de variante cargada positivamente disminuye en proporción al número de genes  $\alpha$  delecionados. En contraste, las variantes cargadas negativamente están a menudo presentes en cantidades mayores que la hemoglobina A en los heterocigotos, cuando se asocian con  $\alpha$ -Talasemia (Beale, 1965).



# HEMOGLOBINOPATIAS

## 4. HEMOGLOBINOPATIAS

### CONCEPTO Y CLASIFICACION

Las hemoglobinopatías son alteraciones cualitativas o cuantitativas de la globina, sin embargo el término de hemoglobinopatía se emplea para las alteraciones de la estructura y síntesis de la proteína (Weatherall, 1981; Bunn, 1986).

Se originan como alteraciones secundarias a mutaciones genéticas, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural (hemoglobinopatías estructurales) o una disminución, más o menos intensa, de la síntesis de una cadena globínica estructuralmente normal (talasemias). Finalmente hay un tercer grupo caracterizado por un fallo genético del cambio en la producción de hemoglobina fetal a hemoglobina adulto, producido normalmente durante el proceso neonatal, denominado **persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal**; no tiene significado clínico y su síntesis se centra en el estudio de la regulación de genes.

Aunque el presente trabajo se dedica especialmente a las  $\beta$ -talasemias, comentaremos brevemente los conceptos y clasificación de los demás transtornos, puesto que en poblaciones donde las talasemias son comunes, a menudo existen individuos dobles heterocigotos para ambos transtornos.

**4.1 TALASEMIAS** (Villegas y cols., 1988; Bank y cols., 1968; Nathan, 1972)

Son alteraciones genéticas cuyo resultado es la ausencia, o producción disminuida de una o más de las cadenas de globina normales. El término talasemia procede del griego (Thalassa y Haima) y significa "mar y sangre", refiriéndose a la elevada frecuencia de esta enfermedad en cierta población cercana al mar, que en un principio era el Mar Negro, aunque posteriormente se ha hecho extensiva al Mediterráneo, en cuyo litoral también es frecuente esta enfermedad.

La secuencia de aminoácidos es normal, por lo que las talasemias se consideran defectos cuantitativos, ya que estructuralmente la globina es generalmente normal (Ramot y cols., 1973).

Se clasifican según la cadena afectada en Alfa, Beta, Delta, Gamma, Delta-Beta, Gamma-Delta-Beta y Epsilon-Gamma-Delta-Beta o según sus manifestaciones clínicas en formas mayores, intermedias y menores, dependiendo de la gravedad de cada una de ellas.

Las alfa y Beta talasemias son además subdivididas en formas Alfa<sup>0</sup> y Beta<sup>0</sup> en las cuales no se produce cadena afectada y formas Alfa<sup>+</sup> y Beta<sup>+</sup> en las que algo de cadena se sintetiza pero en cantidad reducida.

El defecto de síntesis ocasiona un desequilibrio en la producción de ambas cadenas, precipitándose en la médula ósea o posteriormente en el eritrocito maduro la que se produce en exceso, con el consiguiente trastorno en la maduración y supervivencia de la célula.

## GENETICA Y BASE MOLECULAR

La herencia en la talasemia sigue las leyes de Mendel, siendo autosómica codominante. Las mutaciones que originan las talasemias pueden afectar al propio gen de la globina o a cualquiera de los procesos necesarios para que el flujo de información llegue desde el gen a la cadena de globina. Las mutaciones causantes de talasemia más comunes son (Kazazian, 1985; Nienhuis, 1984):

**Delección del gen:** Como consecuencia de un entrecruzamiento no homólogo durante la meiosis, un cromosoma puede resultar con grandes pérdidas de material genético que incluya uno o varios genes de globina o fragmentos de un gen. La mayor parte de las mutaciones causantes de  $\alpha$ -talasemias son de este tipo. Sin embargo, en la  $\beta$ -talasemia este mecanismo causal es muy poco común.

**Mutaciones que afectan al promotor:** El promotor del gen lo forman unas secuencias situadas unos 150 nucleótidos "corriente arriba" del primer exón del gen de globina. Estas secuencias son esenciales para una correcta iniciación de la transcripción. Las mutaciones que afectan al promotor pueden ser de dos tipos:

a) Mutaciones en las secuencias del promotor que actúan sobre la expresión del gen.

b) Mutaciones en secuencias alejadas del promotor que influyen en su función. Se han descrito casos de gamma-delta-beta-talasemia originada por una delección de los genes gamma y delta quedando intacto el gen  $\beta$ , sorprendentemente no funcionando (Chebloune y cols., 1984; Wood y cols., 1978).

### **Mutaciones que afectan al procesamiento del ARN.**

Se distinguen:

a) Alteraciones en el Splicing. Algunas mutaciones que afectan sin sentido a las regiones fronterizas exón-intrón, pueden alterar la correcta expulsión de las secuencias de los intrones de la molécula de pre-ARNm, dando lugar a un ARN anómalo. Se han descrito varios casos de  $\beta$ -talasemia producidos por estas mutaciones (Nienhuis, 1987).

b) Alteración de la señal de poliadenilación. En el extremo 3' del ARNm existe una secuencia de nucleótidos que actúa como una señal que permite la adición de un tracto de residuos de adenosoma (poliA). Se han descrito  $\alpha$ -talasemas "no deleción" por anomalías de nucleótidos a este nivel (Bunn, 1987).

**Mutaciones que alteran la traducción.** En el proceso de traducción del ARNm a cadena de globina, pueden darse mutaciones que afectan al codon que indica la terminación de la síntesis de la cadena de globina, dando lugar a la aparición de cadenas de globina acortadas o elongadas (Orkin y cols., 1981; Piratsu y cols., 1984).

a) Síntesis de cadenas de globina acortadas. La aparición prematura en el ARNm de un codon de terminación (UAA, UAG ó UGA) puede deberse a substitución de un nucleótido por otro o a deleción de un nucleótido con alteración en el marco de lectura del código genético. Se han descrito varias mutaciones de este tipo causantes de la  $\beta$ -talasemia (Baglioni y cols., 1969).

b) Producción de cadenas de globinas elongadas. El codon de terminación de la síntesis de cadena de globina es UAA y el  $\alpha$  y  $\beta$ -ARNm. La substitución de un nucleótido en este codon hace que la cadena se elongue hasta encontrar un nuevo codon de terminación.

La primera descripción de una de estas cadenas elongadas fue la hemoglobina Constant Spring (CS) producida por un ARNm que codifica 172 aminoácidos en lugar de los 141 de la cadena normal. El  $\alpha$ -ARNm CS se encuentra cuantitativamente deficitario quizás debido a su inestabilidad.

En las tablas I y II se detallan las alteraciones moleculares más importantes encontradas en  $\alpha$  y  $\beta$  talasemias.

**TABLA I. Base molecular de las betatalasemias**

$\beta$ -talasemia	$\beta^+$ -talasemia	Localización de la alteración
Delección	Alteraciones que afectan al promotor	ADN (secuencias codificadoras) Promotor (transcripción)
Alteraciones en el <i>splicing</i>	Alteraciones en el <i>splicing</i>	<i>Splicing</i> (procesamiento)
Cadenas acortadas		Traducción

**TABLA II. Base molecular de la alfatalasemia**

<i>Delección</i>	
Talasemia alfa-2	- $\alpha$ / $\alpha\alpha$
Talasemia alfa-1 "cis"	-- / $\alpha\alpha$
Talasemia alfa-1 "trans"	- $\alpha$ /-- $\alpha$
Enfermedad de la HbH	- $\alpha$ /--
Hidropesía fetal por Hb Bart	-- /--
<i>No delección</i>	
Cadenas $\alpha$ elongadas: Hb <i>Constant Spring</i> , etc.	
Otras mutaciones	

## Talasemias Alfa (Wise, 1970; Wasi y cols., 1973)

Hay dos formas clínicas importantes de talasemia alfa, el Hidrops Fetal por hemoglobina Bart y la enfermedad de la hemoglobina H, las cuales resultan de la interacción de dos determinantes genéticos talasémicos alfa ( $\alpha^0$  y  $\alpha^+$ ).

**TALASEMIA ALFA<sup>0</sup>** resulta de la pérdida (delección) de ambos genes de globina alfa del cromosoma 16, cuyo haplotipo sería (--/).

**TALASEMIA ALFA<sup>+</sup>** resulta bien por la delección solamente de uno de los genes de cada par, o en otros casos denominados no delección en los que el gen está intacto, pero tiene mutaciones que le hacen inactivo parcial o completamente.

Se clasifican en:

1. Tipo delección cuyo haplotipo es (-alfa/)( $-\alpha/-\alpha$ )
2. Tipo no delección: se han caracterizado diversos tipos cuyo haplotipo sería (alfa alfa T/) o (alfa + alfa).
3. Hemoglobina Constant Spring, se considera otro grupo de no delección, se origina por la mutación de una única base en el codon de terminación de la cadena alfa2 continuando la lectura del ADN cuando debería finalizar y por tanto sintetizándose una cadena alfa con 31 aminoácidos más en el extremo C terminal, pero en cantidad reducida dado que el ARN alargado es inestable. El haplotipo es (alfa CS/) y se comporta como  $\alpha^+$  talasemia ( $-\alpha$ ).

Considerando que la síntesis de la cadena alfa está regida por cuatro locus, de la interacción de los determinantes genéticos citados anteriormente podemos esperar los siguientes fenotipos:

### **1. Estado de portador silente o $\alpha^+$ heterocigótica**

Son los heterocigotos para el determinante alfa<sup>+</sup>, es la forma más leve de enfermedad y su genotipo puede ser:

(-alfa/alfa alfa), (alfa alfa T/alfa alfa) ó (alfa alfa CS/alfa alfa). Hematologicamente son normales y algunos de ellos tienen un 1-2% de hemoglobina Bart al nacer.

### **2. Rasgo talasémico alfa**

Que resulta del estado heterocigótico para el determinante alfa<sup>0</sup> (--/alfa alfa) o del homocigótico para el determinante alfa<sup>+</sup>(-alfa/-alfa) o (alfa alfa CS/alfa alfa CS). Se manifiesta por una seducción marcada del VCM y HCM con una hemoglobina A2 normal o disminuida, así como un 5 a 10 % de hemoglobina Bart al nacer.

### **3. Enfermedad de la hemoglobina H (Clegg, 1967)**

Es el resultado del estado doble heterocigótico para el determinante alfa<sup>0</sup> y alfa<sup>+</sup>. Su genotipo puede ser (- -/alfa), (--/alfa alfa T), (--/alfa alfa CS).

Los pacientes presentan anemia microcítica de intensidad variable con acentuada dismorfía eritrocitaria, reticulocitosis, signos bioquímicos de hemólisis y esplenomegalia. La confirmación electroforética y la síntesis in vitro de cadenas de globina, así como el estudio familiar y genético confirman el diagnóstico (Kan y cols., 1975; Old y cols., 1977; Kirchsman y cols., 1978).

### **4. Hidropesía fetal por hemoglobina Bart**

Es el resultado del estado homocigótico para el determinante talasémico alfa<sup>0</sup>, cuyo genotipo es (--/--).

Es incompatible con la vida, constituye una causa de aborto hacia la 30 semana del embarazo o de muerte fetal poco después del nacimiento; mostrando la electroforesis un 80% de hemoglobina Bart y 20% de hemoglobina Portland con ausencia total de hemoglobina A y F (Weatherall y cols., 1970).



## Talasemia Beta

La intensidad del déficit de cadenas depende del grado de alteración genética y puede variar desde una ausencia completa de síntesis ( $\beta^0$ ) hasta una síntesis parcial pero siempre deficiente ( $\beta^+$ ). La diferente expresividad clínica de la  $\beta$ -talasemia resulta de la combinación de ambas posibilidades ( $\beta^0$  y  $\beta^+$ ) o de cada una de ellas con el gen  $\beta^A$  normal (Kantor y cols., 1980; Wasi y cols., 1973).

La participación de un mismo par cromosómico de ambas formas se traduce en diferentes genotipos ( $\beta^+/\beta^+$ ,  $\beta^+/\beta^0$  y  $\beta^0/\beta^0$ ) cuya expresividad clínica o fenotipo sería la  **$\beta$ -Talasemia homocigótica**, mientras que la combinación del gen  $\beta^+$  o  $\beta^0$  con el gen  $\beta^A$  normal daría lugar a dos posibles fenotipos ( $\beta^+/\beta^A$  y  $\beta^0/\beta^A$ ) cuya expresividad clínica sería la  **$\beta$ -Talasemia heterocigótica**. La  $\beta$ -talasemia homocigótica incluye lo que se conoce con el nombre de Talasemia Mayor o Intermedia en algunos casos y la  $\beta$ -talasemia heterocigótica el rasgo talasémico o la Talasemia Menor. (Braverman, 1981; Testa y cols., 1981).

La variabilidad clínica del síndrome talasémico puede obedecer, no sólo a una interacción exclusiva de los genes  $\beta^+$  y  $\beta^0$  entre sí, con el gen  $\beta^A$  normal, sino también a la de cada uno de ellos con otros genes talasémicos, tales como la PHHF, delta-beta-talasemia, hemoglobina Lepore, etc.

Debido al elevado polimorfismo genético y a la existencia de diversos mecanismos fisiopatológicos en el desarrollo de la anemia, la expresividad clínica de la  $\beta$ -talasemia puede variar considerablemente (Comi y cols., 1977).

Weatherall ha establecido una clasificación clínica de la  $\beta$ -talasemia heterocigota y homocigota, de acuerdo con que el gen  $\beta$  afectado presente una reducción ( $\beta^+$ ) o ausencia ( $\beta^0$ ) de síntesis de cadenas globínicas.

<i>Tipo</i>	<i>Expresividad hematológica</i>
<i>β-talasemia heterocigota</i>	
β <sup>+</sup> talasemia	} Anemia microcítica HbA <sub>2</sub> =3.5-6 %
β <sup>-</sup> talasemia	
β <sup>0</sup> talasemia (variedad moderada)	
β <sup>+</sup> talasemia con HbA <sub>2</sub> normal	
tipo 1 (talasemia silente)	Hb γ, HbA <sub>2</sub> normales
tipo 2	Anemia microcítica HbA <sub>2</sub> =3.5 %
<i>β-talasemia homocigota</i>	
β <sup>+</sup> talasemia	Anemia intensa con requerimiento transfusional periódico HbF=70-95 %
β <sup>0</sup> talasemia	Anemia muy intensa con requerimiento transfusional periódico HbF=98 % HbA <sub>2</sub> =2 %
β <sup>-</sup> talasemia (variedad moderada)	Talasemia intermedia (Hb=90-111 g/l) HbF=20-40 % HbA <sub>2</sub> =2-5 %
β <sup>+</sup> talasemia con HbA <sub>2</sub> normal	
tipo 1	Talasemia intermedia (Hb % 90-111 g/l)
tipo 2	HbF=10-30 % HbA <sub>2</sub> =3-4 %

Tabla III Clasificación de las formas más frecuentes  
de β-talasemia

La **β-talasemia heterocigótica** es la forma más frecuente en nuestro medio y se caracteriza por una pseudopoliglobulia microcítica con discreta anemia, rara vez se observa esplenomegalia (Villegas y cols.; 1990). Esta forma clínicamente asintomática de β-talasemia heterocigota se conoce también como "rasgo talasémico". Su diagnóstico suele realizarse con motivo de un examen hematológico practicado en el curso de un estudio familiar. Muy frecuentemente suele confundirse con anemia ferropénica, por ello es importante el diagnóstico diferencial con el fin de evitar al paciente una prolongada, inútil y nociva terapéutica marcial. (Benz y cols., 1984; Schwartz, 1970).

El procedimiento más asequible en la práctica para el diagnóstico de  $\beta$ -talasemia heterocigota es la electroforesis de hemoglobinas, donde se observa un aumento característico de la fracción de hemoglobina  $A_2$  (mayor o igual al 3,5%). Existe una forma "silente" con hemoglobina  $A_2$  y F normales, en la cual es necesario recurrir a técnicas más específicas que serán tratadas en otro capítulo con mayor amplitud.

En países como España, en los que existe una moderada incidencia de  $\beta$ -talasemia heterocigota se considera muy necesario tanto el escrutinio sistemático del déficit como la realización de un consejo genético a los individuos afectados, con el fin de prevenir la talasemia homocigótica.

La  **$\beta$ -Talasemia homocigota o anemia de Cooley**, se caracteriza por una expresividad clínica variable, pero generalmente intensa. Esta se inicia a partir de los seis meses del nacimiento y se caracteriza por una intensa anemia que obliga a instaurar un régimen transfusional periódico, con objeto de mantener el nivel mínimo de hemoglobina. La anemia se acompaña de esplenomegalia, que aparece casi siempre a partir del primer año de vida y de hepatomegalia variable; se produce también un retraso del desarrollo óseo y del crecimiento corporal. (Forget y cols., 1974; Chang, 1979).

El cuadro clínico de la talasemia mayor suele agravarse por las complicaciones debidas al exceso de hierro del organismo, o hemocromatosis secundaria a la mayor absorción de hierro a nivel intestinal y efecto del régimen transfusional. Entre tales complicaciones destacan cirrosis hepática, diabetes mellitus y miocardiopatía que en general constituyen la causa de muerte de estos pacientes, casi siempre antes de los veinticinco años de edad. (Bank, 1966)

El diagnóstico de la  $\beta$ -talasemia homocigota se basa en la observación morfológica de sangre periférica y en la práctica de estudio de hemoglobinas.

La  $\beta$ -talasemia intermedia constituye un cuadro hematólogo muy heterogéneo con un curso más benigno que el de la  $\beta$ -talasemia mayor. En general, la sintomatología no es tan grave, con menor requerimiento transfusional. El curso clínico es muy variable, sobreviviendo los pacientes largos períodos con relativa buena salud o presentando serias complicaciones, con malformaciones óseas, infecciones de repetición y sobrecarga férrica. (Thein y cols., 1984)

Considerada a nivel molecular, la  $\beta$ -talasemia intermedia es sumamente compleja con una larga serie de interacciones entre diferentes tipos de talasemias, tales como  $\beta^+$  talasemia/ delta-beta-talasemia, asociaciones de  $\alpha$  y  $\beta$ -talasemia, o de talasemias con hemoglobinopatías estructurales, etc. (Villegas y cols., 1992).

Talasemia Delta Beta (Ottolenghi y cols., 1976; Bernards y cols., 1979)

Se debe a un defecto en la síntesis de las cadenas delta y beta. Se caracteriza en su forma heterocigótica por un cuadro talasémico menor con hemoglobina A<sub>2</sub> normal y niveles relativamente altos de hemoglobina fetal, así como ausencia de hemoglobina A y A<sub>2</sub> en el estado homocigótico con clínica de talasemia intermedia. La hemoglobina fetal se encuentra heterogeneamente distribuida en los hematíes.

Talasemia Gamma-Delta-Beta (Orkin y cols., 1979; Orkin y cols., 1981)

Se han observado solamente en portadores heterocigóticos. Se caracterizan por hemólisis neonatal y cambios hematológicos de talasemia beta, con un nivel normal de hemoglobina A<sub>2</sub> en el adulto.

Otras variantes menos frecuentes serían:

- Talasemia gamma
- Talasemia delta
- etc.

Síndromes hemoglobina Lepore (White y cols., 1972; Gill y cols., 1972)

Se origina por la síntesis ineficaz de una cadena no alfa híbrida, estructuralmente anormal, formada por una porción N-terminal idéntica a la cadena delta y por una C terminal idéntica a la beta. Son productos de un gen nuevo, fusionado durante el entrecruzamiento en la meiosis de los genes delta y beta y transmitido posteriormente de forma mendeliana simple.

El punto de fusión es variable habiéndose detectado tres tipos de entre los posibles: Boston, Baltimore y Hollandia con propiedades similares. (Clegg y cols., 1965)

La síntesis de la cadena Delta Beta de la hemoglobina Lepore sigue un patrón casi idéntico al de la cadena delta de la hemoglobina A<sub>2</sub>, por ello no se detecta en la electroforesis alcalina de la sangre de cordón en el período neonatal. (Ottolenghi y cols., 1979)

Su movilidad electroforética a pH alcalino la sitúa entre la hemoglobina A<sub>2</sub> y la hemoglobina A, ligeramente más anódica que la hemoglobina S, no separándose de la hemoglobina A a pH ácido.

En el estado homocigótico las manifestaciones clínicas varían entre una forma intermedia y mayor, no se sintetiza hemoglobina A ni hemoglobina A<sub>2</sub>, apareciendo solamente Fetal y Lepore en una cuantía media del 15% del total, no muy diferente a la que se cuantifica en estado heterocigótico, que sin embargo cursa con cifras mucho más bajas de Hb F.

#### 4.2 PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL (PHHT)

Se denomina así a aquellas condiciones en las cuales la producción de hemoglobina fetal en el adulto excede el nivel normal en ausencia de cualquier cambio hematológico mayor (Tate y cols., 1986; Bernardis, 1980).

Son fenotípicamente heterogéneos tanto en la cantidad de hemoglobina fetal producida como en relación de las cadenas gamma G/ gamma A que contienen.

Según la patología molecular pueden agruparse en:

Tipo delección, son la mayoría, se debe a la pérdida de cantidad variable de material genético, que incluye generalmente los genes delta y beta.

Tipo no delección, se han descrito muchas variantes, en las que la mutación de la única base dentro o fuera del grupo de genes gamma-delta-beta origina el trastorno.

En estos casos la producción de cadena gamma deriva casi completamente de uno de los dos genes gamma. El gen beta sobre el cromosoma afecto se expresa correctamente.

### 4.3 HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUCTURALES

Las hemoglobinopatías se caracterizan por presentar una cadena de globina estructuralmente anómala, debida generalmente a la substitución de un aminoácido por otro siendo su síntesis normal en la mayoría de los casos (Winter, 1986).

En 1949 nace el concepto de patología molecular al descubrir Pauling y colaboradores la hemoglobina S en un paciente con anemia de células falciformes.

Las mutantes de hemoglobina son un excelente ejemplo de cómo el cambio en la estructura de una proteína puede modificar su función y ser causa de enfermedad.

Actualmente existen más de 140 variantes de hemoglobina que afectan a la cadena alfa, 240 a la beta, 17 a la delta y 48 a la gamma. (Fairbanks, 1980; Old y cols., 1982)

Las variantes de hemoglobina se denominaron inicialmente según las sucesivas letras del alfabeto. Actualmente para identificación se hace referencia en primer lugar a la cadena donde se ha producido la mutación, seguido de la posición que ocupa la mutación en la hélice o interhélice, reseñando posteriormente el aminoácido sustituido o deletado. Así en la hemoglobina complutense que se origina por la substitución de glutamina por ácido glutámico en la posición 127 de la cadena  $\beta$  (posición H<sub>2</sub> de la hélice), la identificación es [ $\beta$ 127(H<sub>2</sub>)Gln→Glu] o por ejemplo la hemoglobina S que se designa Alfa<sub>2</sub>  $\beta$ 2<sup>Glu→Val</sup> ó simplemente Alfa<sub>2</sub>  $\beta$ 2<sup>Val</sup>, en ambos casos indicando la naturaleza de la substitución en el 6º residuo aminoácido numerado desde el extremo N al C.



Aunque se recomienda que los supraíndices sean evitados, no se ponga la cadena de globina no afectada y se indique rutinariamente la posición helicoidal. Así la hemoglobina S se designará por  $\beta_6(A3)\text{Glu-Val}$ .

La designación de la "porción helicoidal" tiene la ventaja de aportar información automáticamente de la región funcional y de la posible homología con variantes que afecten a regiones similares en otras cadenas de globina . Así las hemoglobinas Chesapeake y Wood tienen ambas la sustitución FG4GU, la primera en la cadena  $\alpha$  y la segunda en la  $\beta$ , puesto que es una función importante para el control de la afinidad por el  $\text{O}_2$ , no sorprende que ambas variantes tengan una expresión clínica similar. (Rieder, 1974)

## Genética y base molecular

Las hemoglobinopatías se heredan con carácter autosómico dominante siguiendo las leyes de Mendel. Si ambos padres son portadores heterocigóticos de la variante (AS) la mitad de su descendencia serán portadores (AS), la cuarta parte serán normales (AA) y la otra cuarta parte padecerán de anemia de células falciformes (SS).

En una proporción no despreciable de casos, las hemoglobinas inestables pueden originarse por mutaciones espontáneas, no estando afectado ningún otro miembro de la familia.

**Lesión molecular.** Diversas mutaciones en el ADN del gen de globina causan alteraciones en la estructura de la cadena de globina. Así por fusión de genes tenemos la hemoglobina Lepore (fusión delta-beta) y la hemoglobina Kenya (fusión gamma-beta). (Ramirez, 1979)

**Sustitución de un aminoácido.** El 95% de las hemoglobinopatías estructurales se originan por sustitución de una de las bases del triplete que forman cada codon. Esto da lugar al cambio de un aminoácido por otro. La hemoglobina S se produce por una mutación puntual del codon  $\beta 6$ , que en lugar de ser GAC que codifica al glutámico, se convierte en GUC que codifica Valina.

Se han descrito cinco variantes de hemoglobina originadas por la substitución conjunta de dos aminoácidos, por ej. hemoglobina C Harlem (Bunn, 1987; Weatherall, 1981).

**Elongación de la cadena.** Se produce por mutaciones puntuales en los codon de terminación de cadena.

El ejemplo más clásico lo constituye la hemoglobina CS, originada por la mutación del codon UAA de terminación por CAA.

Las variantes de la cadena  $\alpha$  producen un cuadro de  $\alpha$ -talasemia, mientras que las hemoglobinopatías con cadena  $\beta$  elongada pueden producir anemia hemolítica o ser asintomáticos en su estado heterocigótico. (IHIC, 1988).

**Acortamiento de la cadena.** Se origina por la pérdida de uno o varios aminoácidos (hasta 5 residuos) como consecuencia de la delección de uno o más codones. En general, se producen cadenas acortadas muy inestables dando lugar a un cuadro de hemoglobinopatía inestable con cuerpos de Heinz.

**Hemoglobinopatías con cadenas híbridas.** Se producen por un entrecruzamiento no homólogo durante la meiosis.

En cuanto a la herencia de las hemoglobinopatías estructurales, como se comentó anteriormente, se considera como caracteres codominantes de acuerdo con la herencia mendeliana clásica.

Algunas variantes solamente muestran manifestaciones clínicas cuando están en estado homocigótico, en contraste, las hemoglobinas inestables y aquellas con anomalías en la afinidad por el  $O_2$  suelen causar morbilidad en estado heterocigoto.

Los homocigóticos se han encontrado principalmente entre variantes con alta frecuencia genética tales como S, C ó E, y entre algunas de moderada frecuencia (D-Punjab, O-Arab) e incluso entre variantes raras, fruto estas últimas de matrimonios consanguíneos (Casals y cols., 1986).

En ocasiones las variantes de hemoglobina son el resultado de mutaciones espontáneas, dado que la mutación es a nivel de célula germinal, sólo será padecida por la persona afectada, los padres y hermanos serán normales. A este grupo también se les llama como mutaciones de "NOVO", fenómeno que se encuentra más frecuentemente entre aquellas hemoglobinopatías que cursan con manifestaciones clínicas.

## **Clasificación**

Para su mejor comprensión, las hemoglobinopatías estructurales se han clasificado en cinco grupos, de acuerdo con sus manifestaciones clínicas como se ve en la tabla IV de la página siguiente. (Myers y cols., 1985)

Sin embargo no todas las variantes de hemoglobinopatía producen sintomatología clínica, existiendo un gran número de ellas que son totalmente asintomáticas en el estado heterocigótico.

Las manifestaciones clínicas de las hemoglobinopatías pueden llegar a comprenderse mejor relacionandolas en lo posible, con el lugar que ocupa el aminoácido sustituido (Mercola, 1980).

Según sea el lugar que ocupe y el tipo de aminoácido cambiado en la molécula, así será la alteración que cause en la estructura y función de la misma. Si se produce en una parte crítica que altere sus propiedades físicas, podría originar un trastorno clínico de severidad variable.

Por tanto según la patología molecular se pueden considerar tres grandes grupos:

### **1- Sustitución de un aminoácido externo (polar) en la superficie de la molécula.**

Solamente en algunos casos da lugar a anemia hemolítica, cuando están en su forma homocigótica.

Hemoglobinas S, C, D y E son las más frecuentes.

### **2- Sustitución de un aminoácido interno (no polar)**

Siempre va a resultar de ella una anomalía severa, tanto en la estructura como en la función.

Pueden hacerse tres grandes subgrupos:

Hemoglobinas inestables

Metahemoglobinas

Hemoglobinas con afinidad alterada por el O<sub>2</sub>

La sustitución puede ser de un aminoácido hidrofóbico por otro hidrofóbico, en cuyo caso es menos grave que si la sustitución es de un hidrofóbico por otro hidrofílico cuyo cuadro hemolítico es más intenso

### 3- Cambios en las zonas de contacto entre subunidades (alfa 1 beta 1) y (alfa 1 beta 2)

Estos cambios pueden debilitar la hemoglobina haciéndola inestable y en otros casos puede alterar la colaboración hemo-hemo y aumentar o disminuir la afinidad de la molécula por el O<sub>2</sub>.

Así pues, las variantes estructurales más frecuentes en la población mundial son hemoglobina S, C, D y E. Las tres primeras sólo producen sintomatología en el paciente homocigótico. La mayoría de las variantes ocasionan hemoglobinopatías inestables, otras producen aumento de la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> y algunas originan metahemoglobinemia congénita. No es raro encontrar variantes que dan lugar a trastornos mixtos, asociándose inestabilidad molecular con alteración de la afinidad por el O<sub>2</sub> junto con metahemoglobinemia (Winter, 1986).

I-ASINTOMATICAS (Son la mayoría)

Portadores de Hb S (en condiciones muy especiales pueden dar síntomas)

Hb C

Hb D

Hb E

II- ANEMIA HEMOLITICA

A- SINDROME DE FALCIFORMACION

(Enfermedad de células falciformes)

1- SS

2- SC

3- SO Los Angeles

4- SO Arab

5- S Beta Talasemia

B HEMOGLOBINAS INESTABLES

III- POLIGLOBULIA

Hemoglobinas con ALTA AFINIDAD por el O<sub>2</sub>  
Eritrocitosis familiar (~ 40 familias)

IV- CIANOSIS FAMILIAR

Hemoglobinas con BAJA AFINIDAD por el O<sub>2</sub>

Hb Kansas

Hb Beth Israel

Hb St. Mandé

Hemoglobinas M

METAHEMOGLOBINAS

M-Boston

M-Saskatoon

M-Milwaukee-1

M-Iwate

M-Hyde-Park

M-FM Osaka

V-VARIANTES ESTRUCTURALES QUE SE EXPRESAN  
CON FENOTIPO TALASEMICO

A- Fenotipo de TALASEMIA  $\beta$

1- Hemoglobinas Lepore

2- Procesamiento anormal de RNAm : Hb E, Hb Knossos

3- Inestabilidad extrema : Hb Indianapolis

B- Fenotipo de TALASEMIA ALFA

1- Mutantes de TERMINACION DE CADENA

Hb Constant Spring

Hb Icaria

Hb Seal Rock

Hb Koya Dora

2- INESTABILIDAD EXTREMA

Hb Quong Sze

Tabla IV Clasificación clínica de las Hemoglobinopatías estructurales

# TECNICAS UTILIZADAS

## 5. TECNICAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Los medios de que disponen los investigadores para analizar el genoma humano han evolucionado considerablemente. Así, hace veinte años se descifró el código con el que está escrito el mensaje genético; hace diez años, el aislamiento de un gen y la lectura de un mensaje de algunos miles de nucleótidos eran el máximo exponente de la técnica del momento.

Ahora puede ya iniciarse la batalla asaltando al propio gen defectuoso. El territorio a explorar es amplio: los cromosomas humanos están formados por moléculas lineales de ADN bicatenario de una longitud total aproximada de tres mil millones de pares de bases. En comparación, un gen típico, esto es, una unidad completa de información genética, es un segmento muy pequeño que abarca sólo unos diez mil pares de bases. A pesar de todo, si se correlaciona la herencia de un segmento concreto de ADN, un "marcador", con la herencia de una enfermedad, puede localizarse el gen mutante hasta en una distancia de uno o dos millones de pares de bases, esto es, menos de la milésima parte del genoma humano. Con ese grado de precisión, el gen queda al alcance de las herramientas moleculares, lo que posibilita clonarlo y examinar su actividad. La identificación de un marcador genético estrechamente ligado a una enfermedad permite, además, seguir la herencia del gen que causa dicha enfermedad. (Ausubel y cols., 1989)

Las nuevas tecnologías suponen, a menudo, un cambio rápido y sustancial sobre la forma de abordar los problemas científicos que se nos plantean. La tecnología del ADN recombinante (Watson y cols., 1986) ha tenido un enorme impacto en la investigación y diagnóstico de las bases moleculares de las enfermedades.



Sin embargo, los métodos que se emplean en el análisis molecular son laboriosos y requieren una elevada especialización.

En los últimos años se ha desarrollado una nueva tecnología, basada en la amplificación de secuencias específicas del ADN, que se conoce como reacción en cadena de la polimerasa o PCR (polymerase chain reaction) (Mullis, 1987; Mullis y cols., 1988; Erlich y cols., 1989).

La evolución que la PCR ha supuesto en el campo de la investigación genética y molecular es comparable a la producida por el descubrimiento de los enzimas de restricción (Botstein y cols., 1980) o de los polimorfismos del ADN (Antonarakis y cols., 1985). Un gran número de métodos de estudio molecular se han visto sustituidos, complementados o altamente facilitados por la PCR. La aplicación de la nueva tecnología a la investigación ha permitido importantes contribuciones sobre la variabilidad, expresión, recombinación y evolución genética (Wrischnik y cols., 1987; Friedman y cols., 1988; Kawasaki, 1989). Entre los métodos más utilizados, destacan los citados a continuación:

### **SOUTHERN-BLOTTING**

Descrito originalmente por E.M. Southern en 1975, esta técnica se apoya en el carácter singular de la molécula de ADN. A lo largo de las dos cadenas del ADN, las bases se aparean de acuerdo con ciertas reglas, de manera que la secuencia de una cadena constituye la única posibilidad de apareamiento para la secuencia de la otra. En una muestra de ADN "desnaturalizado", esto es, calentado o expuesto a un pH alto para reparar sus cadenas, un fragmento de ADN de cadena sencilla puede actuar de sonda que busque y se una a su secuencia complementaria.

En esta técnica, una vez separados los fragmentos de ADN por electroforesis, se desnaturalizan y transfieren del gel a una membrana, donde se ponen en contacto con una sonda de ADN marcada con un isótopo radiactivo. La sonda sólo se hibrida, se une al fragmento o fragmentos que complementan su secuencia de bases. El marcaje radiactivo permite detectar la posición de los fragmentos y, por tanto, sus tamaños. (Orkin y cols., 1982).

El procedimiento requiere la purificación del ADN, su digestión con nucleasas de restricción, la separación de los fragmentos generados mediante electroforesis en agarosa, la desnaturalización y fraccionamiento de estos fragmentos y su transferencia a membranas de nylon o nitrocelulosa. Una vez fijado el ADN a la membrana, ésta es incubada con una sonda de ADN (fragmento de ADN que contiene secuencias complementarias a las que se quiere estudiar), marcada con un isótopo radiactivo o un colorante. Tras la hibridación, la sonda que no se ha fijado se retira y el lugar al que se ha fijado se detecta mediante autorradiografía.

El proceso más detalladamente sería:

a) Purificación del ADN. Para poder analizar el ADN es necesario contar con ADN puro de alto peso molecular. Los diferentes métodos de aislamiento del ADN constan, en general, de dos etapas bien diferenciadas: una primera en la que se rompen las células mediante un detergente y se aíslan los núcleos por centrifugación; y una segunda, en la que los núcleos son resuspendidos y tratados con un detergente iónico, como el SDS, que disocia el complejo ADN-proteínas y desnaturaliza las nucleasas citoplasmáticas. Una vez separadas, las nucleoproteínas son degradadas, mediante tratamiento con enzimas proteolíticas y retiradas mediante extracción con solventes orgánicos como el fenol y el cloroformo. El ADN así purificado permanece en la fase acuosa y, en presencia de etanol y una concentración relativamente alta de cationes monovalentes, que provocan un cambio estructural en las moléculas del ácido nucleico, se agrega y precipita.

b) Digestión con endonucleasas de restricción. El ADN obtenido con los procedimientos de extracción antes señalados presenta un tamaño superior a 100 Kb, lo que impide su posterior manipulación y análisis. Para poder manipular el ADN es necesario digerirlo previamente con endonucleasas de restricción; éstas son enzimas bacterianas que reconocen y cortan secuencias específicas de ADN bicatenario. La actividad de las endonucleasas de restricción se mide en unidades, definiéndose una unidad de enzima como la cantidad del mismo necesaria para digerir completamente un  $\mu\text{g}$  de ADN en una hora, siendo la temperatura óptima de la reacción de la mayoría de las endonucleasas de restricción de 37°C.

En 1978 Kan y Dozy demostraron que el tamaño del fragmento generado por una determinada endonucleasa varía, dando lugar a un polimorfismo en el tamaño de los fragmentos generados por dicho enzima denominados **RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM.**

Estos RFLP reflejan el polimorfismo existente habitualmente en el ADN humano y se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel (White, 1988). Aunque cada enzima detecta un número limitado de polimorfismos, el gran número de endonucleasas de restricción disponibles y el alto grado de heterogeneidad genética permiten detectar un número casi ilimitado de RFLP. (Ver figura 18 en la página siguiente).

c) Electroforesis en geles de Agarosa. La electroforesis en geles de agarosa permite separar las moléculas de ADN de acuerdo con su tamaño existiendo una serie de parámetros: el gradiente de voltaje aplicado, la dimensión de los poros del gel, la conformación del ácido nucleico y su tamaño, la concentración de sal en el tampón, etc. que condicionan los resultados de la electroforesis.

La corriente aplicada a los extremos de un gel de agarosa genera un campo eléctrico con una fuerza que está definida por la longitud del gel y la diferencia de potencial en ambos extremos (V/cm).

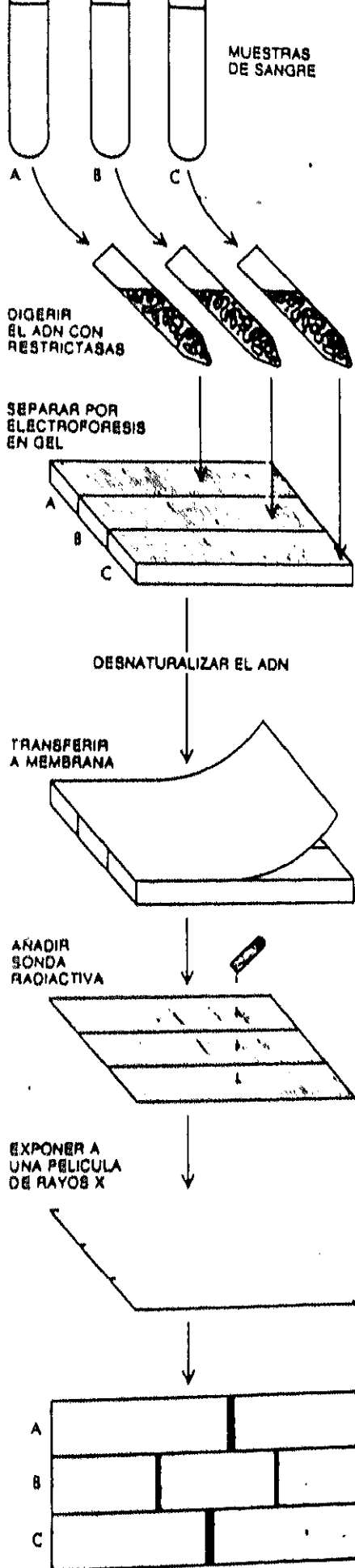


Fig. 18 Análisis de PRLP

Las moléculas de ADN expuestas a este campo eléctrico migran hacia el ánodo debido a la carga eléctrica negativa de los fosfatos presentes en la doble hélice, estando limitada la velocidad de migración por la fricción del ADN con la matriz del gel. En general las moléculas de ADN migran a través del gel a una velocidad proporcional a la intensidad de la corriente aplicada.

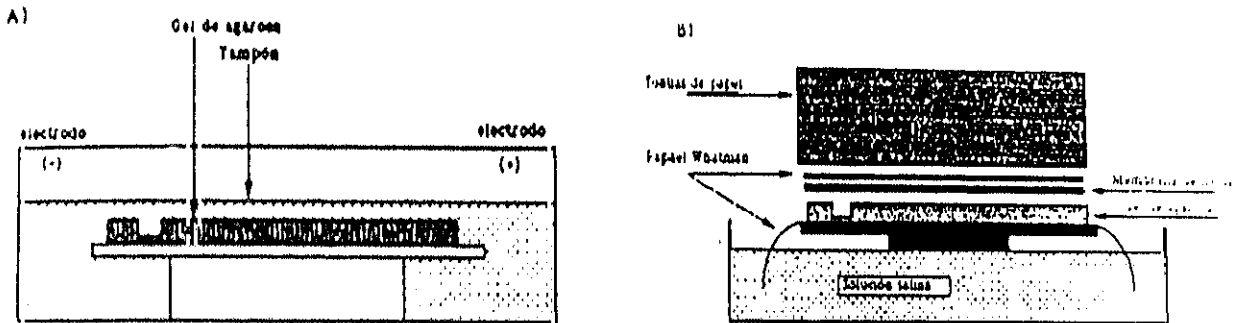


Fig. 19 A) Representación de una cubeta de electroforesis con un gel de agarosa. El ADN migra desde el polo negativo al positivo debido a la carga negativa de los grupos fosfato; B) Transferencia del ADN mediante el método descrito por Southern. El paso de la solución salina a través del gel de agarosa arrastra al ADN que queda fijado a la membrana de nylon.

El grado de separación de las moléculas de ADN depende del tamaño de los poros del gel, que es proporcional a la concentración de agarosa en el mismo. Cuanto mayor es el tamaño de los poros (menor concentración de agarosa), mejor se separan los fragmentos de mayor peso molecular; mientras que al existir menor tamaño de los poros (mayor concentración de agarosa) se separan mejor los fragmentos de bajo peso molecular.

En general, concentraciones de agarosa entre 0,5% y 1% permiten separar fragmentos entre 0,5 y 30 Kb (Jordan, 1989). El tamaño de los fragmentos generados puede determinarse comparando su movilidad con la de un control de tamaño conocido, generalmente el fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III.

d) Transferencia de ADN. El estudio del ADN genómico de los eucariotas sufrió un espectacular avance con la posibilidad de transferir el ADN a soportes sólidos como son las membranas de nitrocelulosa y nylon. Previamente a la transferencia, es necesario desnaturalizar el ADN (convertirlo en ADN monocatenario) sumergiendo el gel en una solución alcalina que rompe los enlaces de hidrógeno que unen las dos hélices de ADN. Una vez neutralizada la acción del alcali, el ADN se puede transferir.

La transferencia se realiza pasando una solución con elevada concentración salina a través del gel. La rapidez de transferencia depende del tamaño de los fragmentos y de la porosidad del gel. En geles de agarosa al 0,8%, los fragmentos inferiores a 1 Kb se transfieren en una hora, mientras que los mayores de 15 Kb necesitan una noche. Una vez transferido, el ADN se fija de manera irreversible a la membrana calentándola a 80°C. o fijándola con luz ultravioleta.

e) Marcaje radiactivo. La posibilidad de encontrar una secuencia específica de ADN en una población de fragmentos es extremadamente compleja dependiendo de la disponibilidad de sondas complementarias al ADN de interés que puedan ser marcadas.

Los dos métodos más frecuentemente utilizados para marcar las sondas de ADN son: 1) el método de marcaje en cremallera o "Nick translation" en el que la secuencia de nucleótidos del ADN se renueva totalmente pero no existe síntesis de nuevo ADN y 2) el método del marcaje aleatorio o "Random Primed" en el que se incuba el ADN a marcar con una mezcla de todos los hexanucleótidos posibles. En esta reacción, el ADN inicial sólo sirve como molde para la síntesis del ADN marcado (ver figura 20).

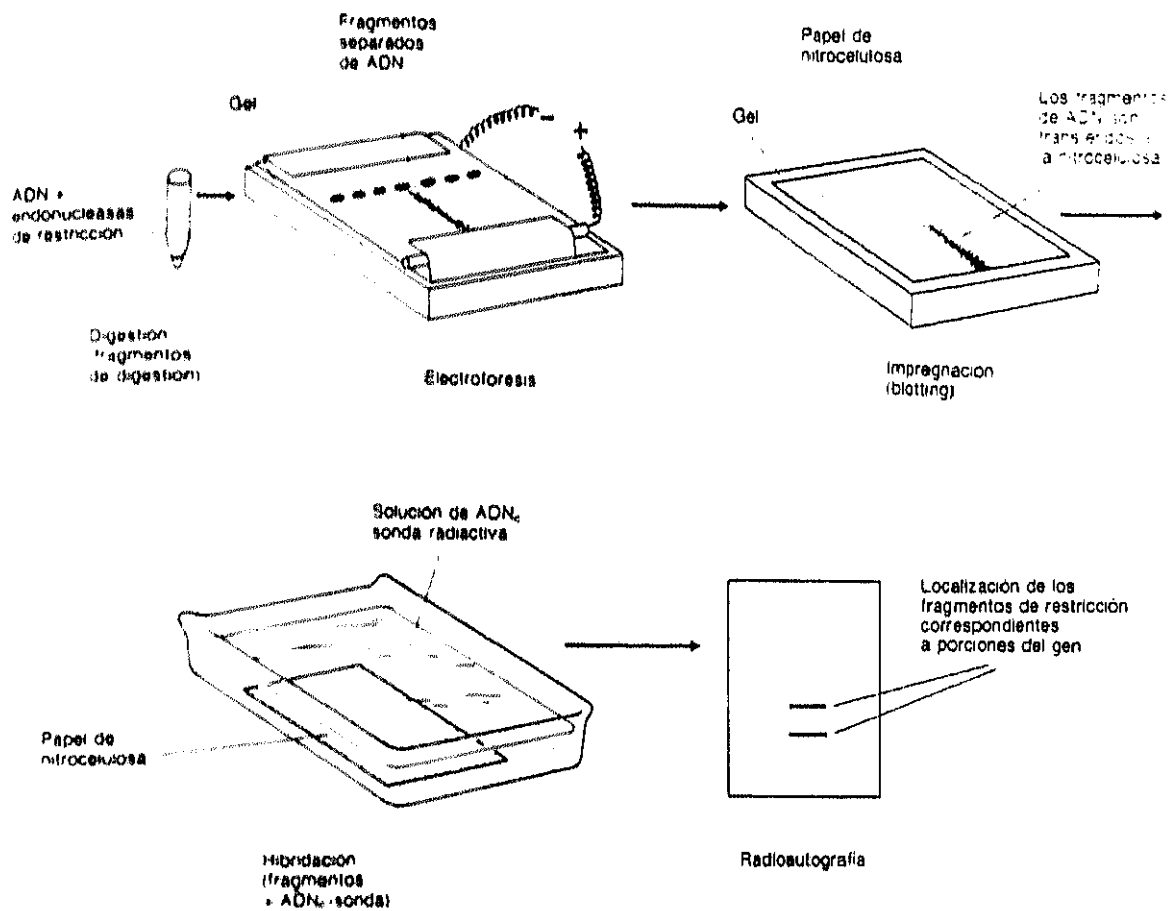


Fig. 20 Esquema de la técnica de Southern-Blotting o análisis de ADN mediante endonucleasas de restricción e hibridación con ADN sonda compatible

f) Prehibridación e hibridación. Una vez marcada la sonda a utilizar, se debe favorecer la unión de la misma a las secuencias del ADN genómico que reconoce. Para ello se utiliza una solución denominada de prehibridación que acondiciona a la membrana y otra llamada de hibridación, que contiene la sonda y favorece su unión específica a las secuencias complementarias. Para obtener resultados interpretables es importante prevenir la unión inespecífica de la sonda a la membrana, ya que, de otra manera, aparecerán áreas que oscureceran la autoradiografía e impedirán ver las bandas de interés. Para evitarlo, se humedecen las membranas con una solución que contenga la Solución de Denhardt's (compuesto por BSA, PVP y Ficoll) y SDS (dodecil sulfato sódico), encargados de bloquear la unión inespecífica del ADN a la membrana.

Tras la hibridación, la sonda no hibridada específicamente es retirada mediante lavados de la membrana con soluciones con elevada concentración de sal.

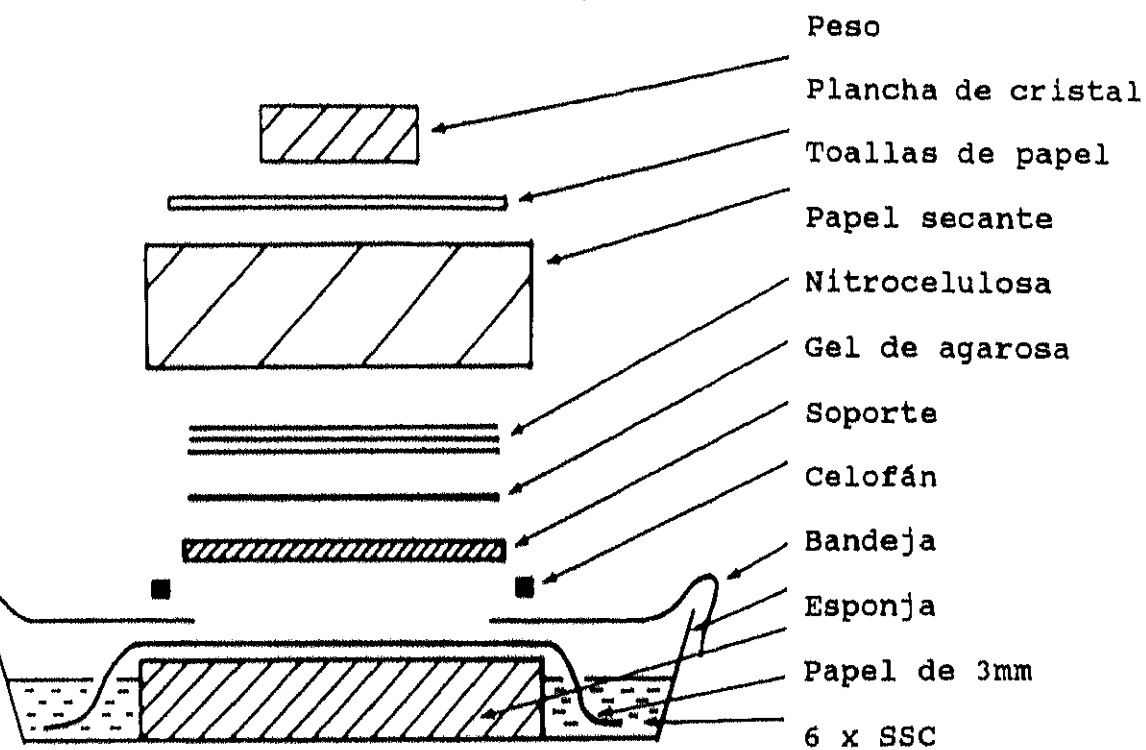


Fig. 21 Esquema de Southern-Blotting



## REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Básicamente la PCR es un método sencillo para el clonaje "in vitro" de cualquier segmento de ADN permitiendo disponer, de forma rápida y eficaz, de cantidades suficientes del mismo para su posterior estudio molecular.

Esta técnica creada por Mullis (Mullis,1990), se basa en la repetición cíclica de tres reacciones similares modificando exclusivamente la temperatura a la que se lleva a cabo. Las tres reacciones se realizan en el mismo tubo y además del ADN se necesitan oligonucleótidos que reconozcan los extremos del fragmento a amplificar y actúen como CEBADORES o PRIMERS de la reacción y una mezcla de desoxinucleótidos que permiten generar las nuevas cadenas de ADN. Esta amplificación es posible gracias a la enzima Taq polimerasa del microorganismo *Thermus Aquaticus*, que permite la síntesis de ADN a temperaturas por encima de 70°C y resiste perfectamente 94-95°C necesarios para separar las dos hebras del ADN (Jefferys y cols.,1988).

El primer paso de la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 94°C y tiene como finalidad la transformación del ADN bicatenario en monocatenario mediante desnaturalización por calor. En una segunda etapa los oligonucleótidos se unen a las secuencias complementarias de ADN (esta reacción se suele llevar a cabo a una temperatura de 65°C).

Finalmente, en una última etapa, la enzima Taq polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN monocatenario a partir de los oligonucleótidos. Una característica fundamental de la PCR es que el ADN así sintetizado sirve como sustrato para la siguiente reacción, la amplificación se consigue al realizar una serie de 20 a 30 ciclos con lo que la capacidad de sintetizar nuevo ADN monocatenario se incrementa exponencialmente.

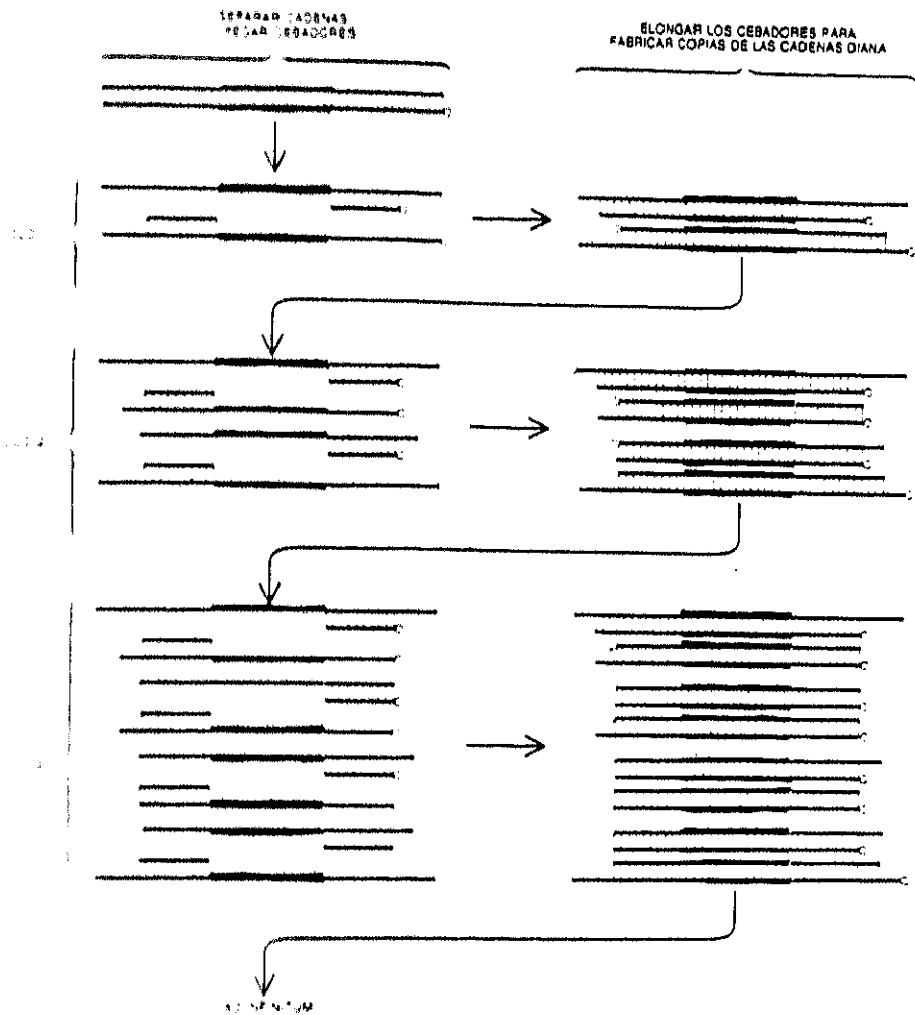


Fig. 22 Esquema de la PCR

Luego en términos generales, la PCR se basa en la capacidad de una enzima ADN polimerasa termoestable para ir añadiendo bases complementarias a una determinada secuencia de ADN acotada en extremos 5' y 3' por dos pequeños fragmentos de ADN complementarios que actúan como iniciadores de la reacción (Saiki y cols., 1988).

Uno de los principales problemas de la PCR es la posibilidad de contaminación con material genético extraño, la rigurosidad en los diversos procedimientos del laboratorio consigue disminuir la posibilidad de contaminación de la PCR (Erlich, 1989).

Los productos obtenidos en la amplificación pueden analizarse mediante una amplia variedad de técnicas que incluyen la hibridación mediante Dot-Blot (figura 23), la simple visualización del producto en geles de agarosa o poliacrilamida (figura 24), el análisis con enzimas de restricción (figura 25) o la secuenciación directa del ADN amplificado.

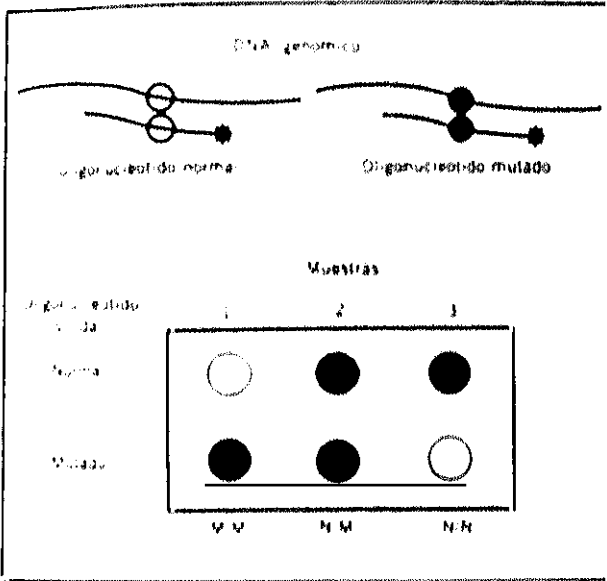


FIGURA 23

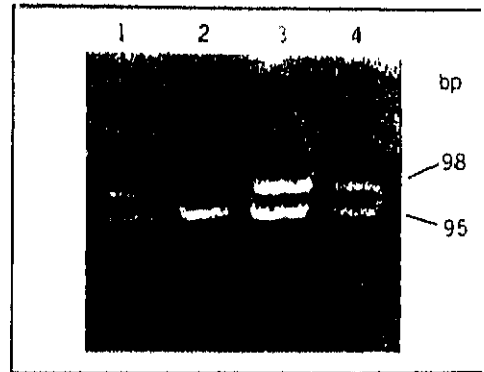


FIGURA 24

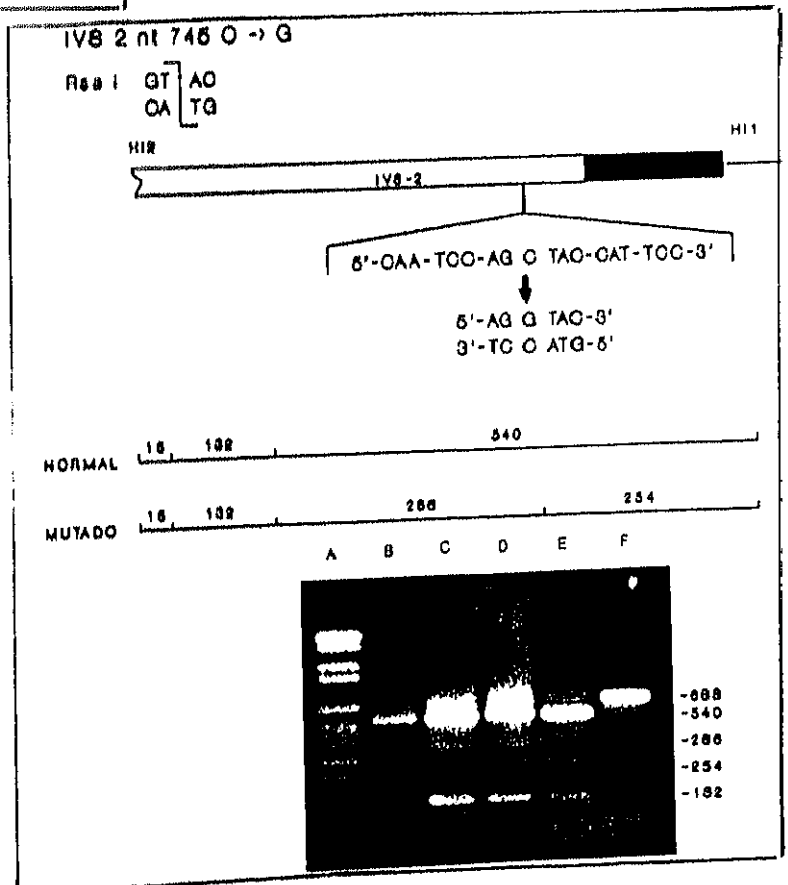


FIGURA 25

Las posibilidades de actuación para detectar una mutación previamente conocida más corrientemente utilizadas en los laboratorios de investigación son:

1) Detección directa de una mutación usando oligonucleótidos radiomarcados; un oligonucleótido es una pequeña secuencia de DNA (aproximadamente de 20 bases de extensión), que ha sido sintetizada incorporando en su centro la base complementaria con la mutación siendo el resto de la secuencia, en dirección 5'3', complementaria con la secuencia del ADN en torno a la mutación.

La eventual hibridación, caso de estar presente la mutación buscada se pondrá de manifiesto incorporando al oligonucleótido fósforo radiactivo como trazador.

2) Detección directa de una mutación usando endonucleasas de restricción, son capaces estas enzimas de digerir ADN a la altura de determinadas secuencias de reconocimiento específico para cada enzima. Una mutación en la secuencia del ADN puede modificar la secuencia de reconocimiento de la enzima, en el sentido de abolir ese punto de digestión o en el sentido de hacer reaparecer un punto de digestión previamente irreconocible para la enzima, en ambos casos, el resultado es una modificación en los tamaños de los fragmentos de ADN amplificado obtenidos cuando éste se somete a la acción de la enzima, objetivables mediante simple electroforesis en gel de agarosa.

Esta técnica tiene una ventaja obvia, que es poder prescindir del uso de oligonucleótidos radiomarcados y de la delicada metodología que conlleva. El inconveniente es que no todas las mutaciones tienen una enzima que las reconozca, por lo que su uso está restringido a aquellas mutaciones reconocibles mediante enzimas de restricción.

La automatización del proceso de la PCR supone la posibilidad de analizar un considerable número de muestras sin demasiado esfuerzo. Sin embargo, es preciso que se desarrollen métodos que permitan automatizar los pasos previos y posteriores a la amplificación, tales como la preparación de las muestras o el análisis de las mismas.

La PCR ha simplificado y aumentado las posibilidades diagnósticas del ADN en medicina. La nueva tecnología permite el diagnóstico preciso de la patología hereditaria, que incluye tanto los procesos en los que el defecto molecular es conocido en detalle, como aquellos para los que solo ha sido posible la localización cromosómica del defecto en cuestión.

Por otra parte, ha revolucionado la tecnología del ADN recombinante en el campo de la investigación genética y molecular. Las aplicaciones médicas de la PCR son abundantes, antes de 1987 el diagnóstico prenatal de enfermedades como la anemia de células falciformes, beta-talasemia y hemofilia se realizaban mediante la tecnología de Southern y se tardaban varias semanas en la obtención de resultados (Orkin, 1982).

Desde finales de 1987, el diagnóstico de estos procesos puede realizarse en menos de una semana mediante la PCR (Saiki y cols., 1988).

Las aplicaciones de la PCR van desde la fibrosis quística (Kerem y cols., 1989), carcinomas (Bos y cols., 1987; Shibata y cols., 1988), leucemias (Dobrovic y cols., 1988), en medicina legal y forense (Li y cols., 1988), en patología infecciosa (Saag y cols., 1988; Thiers y cols., 1988) etc.

## A.R.M.S. (Amplification Refractory Mutation System)

Una modificación de la técnica de la PCR ha sido utilizada en nuestro trabajo, originariamente descrita como ARMS o PCR con oligonucleótidos mutados (Newton y cols., 1989) para la detección directa y diagnóstico prenatal de las mutaciones de  $\beta$ -talasemia (Old, 1990). El procedimiento tiene la ventaja de no ser radiactivo y requiere menos de 5 horas para su realización.

Esta técnica se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN acotado por dos oligonucleótidos iniciadores o "primers", que hibridan cada uno de ellos a secuencias complementarias de la doble hélice de ADN; estos oligonucleótidos se orientan de tal modo que sus extremos 3' quedan enfrentados.

Los oligonucleótidos ARMS fueron diseñados para detectar un ADN normal y otro mutante. El nucleótido 3' del iniciador mutante es complementario de la secuencia mutante y el iniciador normal es complementario de la secuencia de ADN normal.

Para que un iniciador sirva de modelo a la enzima DNA polimerasa, el nucleótido 3' terminal tiene que estar perfectamente unido a la secuencia del ADN modelo. Bajo condiciones cuidadosamente controladas un iniciador con su nucleótido 3' terminal desemparejado puede no funcionar correctamente y no ocurrir la amplificación.

Se incluye también para la realización de esta técnica dos iniciadores control A y B, los cuales amplifican la región del ADN a corta distancia de la amplificada por los iniciadores de ARMS originando un fragmento de un tamaño distinguible del producido por los iniciadores de ARMS.

La utilización de esta técnica será explicada ampliamente en el capítulo de material y métodos en su apartado correspondiente a técnicas empleadas.

### III-MATERIAL Y METODOS

# SUJETOS ESTUDIADOS



## 1.- SUJETOS ESTUDIADOS

Se ha realizado el estudio de un total de 42 muestras de sangre pertenecientes a enfermos portadores de  $\beta$ -Talasemia; 34 de ellos con  $\beta$ -Talasemia heterocigótica y 7 homocigótica y 1 con  $\beta$ -Talasemia intermedia, cuya elección se realizó en los Servicios de Hematología y Pediatría del Hospital Clínico de San Carlos.

Los enfermos con  $\beta$ -Talasemia mayor homocigota pertenecen a 5 familias, en cada una de estas familias se analiza el haplotipo de ambos padres heterocigotos para la  $\beta$ -Talasemia y su hijo homocigoto, una de estas familias presenta dos hijos con  $\beta$ -Talasemia mayor.

El criterio de inclusión de dichos enfermos para este estudio se realizó en función de la sintomatología clínica y de los parámetros hemocitométricos, de la presencia de normoblastos, microcitosia e hipocromía en la extensión de sangre periférica así como de la dosificación de hemoglobina F.

## 2.- TECNICAS UTILIZADAS

### 1. TECNICAS DE DESCRIPCION CONVENCIONAL

ESTUDIOS HEMOCITOMETRICOS

ESTUDIOS DE HEMOGLOBINAS

### 2. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

ESTUDIO DEL HAPLOTIPO

EXTRACCION DEL ADN

AMPLIFICACION POR ARMS

#### 2.1. TECNICAS DE DESCRIPCION CONVENCIONAL

La recogida, manejo y conservación de las muestras se realizó siguiendo las directrices publicadas por el "International Committee for Standardization in Haematology" (ICSH).

\*\* Los ESTUDIOS HEMOCITOMETRICOS se realizaron en un STKR Counter (Coulter Electronics, Ltd USA), determinandose:

- Recuento de hematias (RBC) expresados en hematias X  $10^{12}/L$
- Tasa de hemoglobina (HB) en g/dl
- Hematocrito (HTO) expresado en %
- Volumen corpuscular medio (VCM) en femtolitros ( $10^{-15}l$ )
- Hemoglobina corpuscular media (HCM) expresada en picogramos ( $10^{-12}g$ )
- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

\*\* La ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS se realizó en acetato de celulosa en solución alcalina (pH 8,6), siguiendo las normas de la ICSH (ICSH,1978). En la Figura 27 se muestra el patrón de bandas obtenidas por electroforesis.

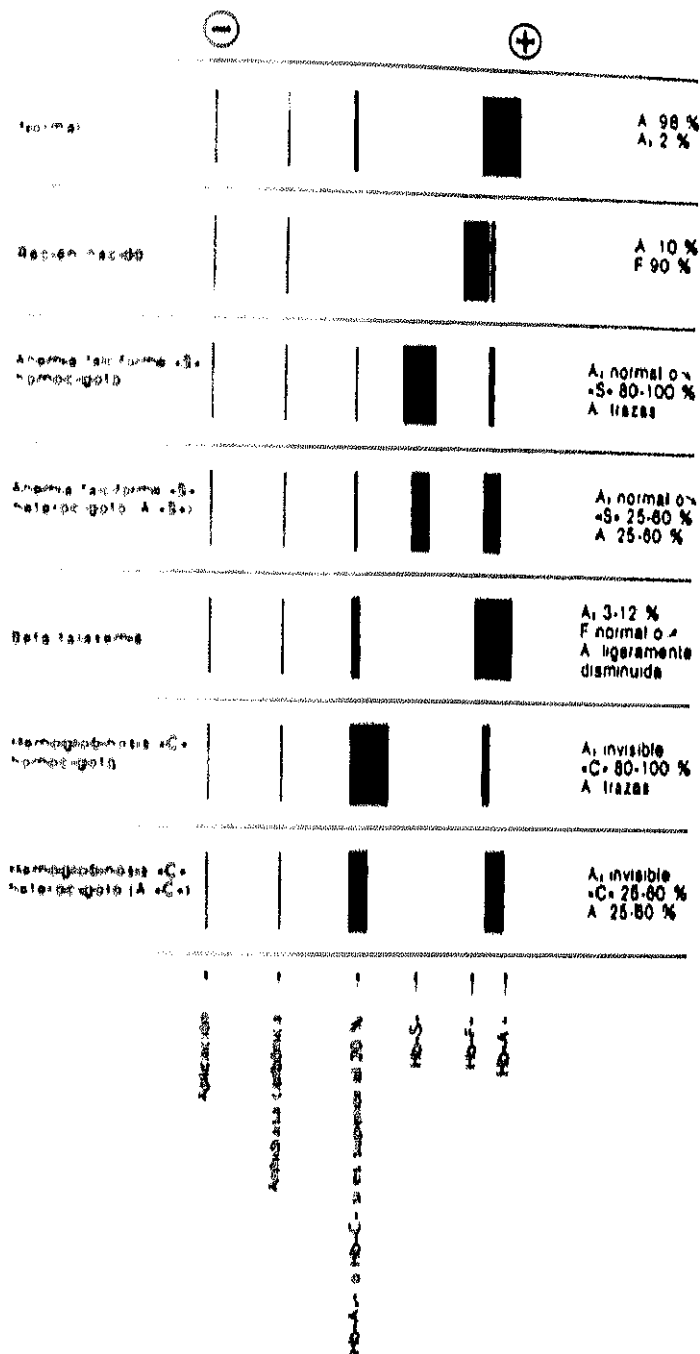


FIG 27 ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS

\*\* La cuantificación de la HEMOGLOBINA A<sub>2</sub> se llevó a cabo por cromatografía en columna de intercambio aniónico. La Hb A<sub>2</sub> se eluye de forma específica bajo estrictas condiciones de pH y fuerza iónica, cuantificándose por lectura fotométrica a 415 nm.

\*\* Los niveles de HEMOGLOBINA F se cuantificaron por el método de desnaturalización alcalina descrito por Betke (Betke y cols., 1959; Villegas y cols., 1983).

\*\* Para el estudio de reticulocitos se ha empleado el método de Dacie mediante la tinción con Azul Brillante de Cresil (Dacie y cols., 1984).

## 2.2. TECNICAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

### EXTRACCION DEL ADN

- 1\*\* Centrifugar de 10 a 20 ml de sangre venosa recogida en EDTA centrifugando a 3000 rpm durante 20 min a 4°C
- 2\*\* El plasma es cuidadosamente eliminado y el leucocrito o "buffy coat" es separado con pipeta Pasteur
- 3\*\* Conservar a -70°C en un eppendorf en caso de no realizar la prueba inmediatamente
- 4\*\* Descongelar la muestra y adicionar 10 ml de solución NP-40 al 0,1% en reticulocite salino y depositado en un tubo Falcon
- 5\*\* Mezclar y agitar a 3000 rpm, 20 minutos a 4°C
- 6\*\* Eliminar el sobrenadante y adicionar 10 ml de tampón de lisis al precipitado. Mezclar y adicionar 0,5 ml de solución de SDS al 10%
- 7\*\* Añadir 0,5 mg de Proteinasa K. Mezclar e incubar a 37°C un mínimo de 4 horas (puede quedar toda la noche en incubación)
- 8\*\* Adicionar 1/5 del volumen de tampón 5 X ANAE
- 9\*\* Adicionar 1/2 del volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1,v/v) y 1/2 del volumen de fenol previamente saturado con tris-ClH 1M, pH 8
- 10\*\* Mezclar y centrifugar a 3000 rpm 20 minutos a 4°C
- 11\*\* Con cuidado transferir la capa superior acuosa a un tubo nuevo utilizando una pipeta de boca ancha para tomar la viscosa solución de ADN
- 12\*\* Repetir una segunda extracción con fenol, y repetir los pasos (9), (10) y (11)
- 13\*\* Adicionar 1/2 del volumen de cloroformo alcohol-isoamílico, mezclar y centrifugar a 3000 rpm, 20 minutos a 4°C
- 14\*\* Transferir la capa acuosa, como en (11), y realizar una nueva extracción con cloroformo, repitiendo (12) y (13)

15\*\* Precipitar el ADN adicionando 1/10 del volumen con ClNa 4M

16\*\* Si el ADN precipita como una masa gelatinosa, es recogido por centrifugación a 3000 rpm 20 min a 4°C. Si no se observa precipitado, la solución se sitúa a -20°C, al menos una hora antes de centrifugar. El precipitado entonces, es redisoluto en un mililitro de agua destilada y el ADN es de nuevo precipitado como en (15)

17\*\* Se elimina el líquido sobrenadante por inversión y al precipitado de ADN se le adiciona 1 ml de agua destilada

18\*\* La concentración de ADN es medida por observación de la densidad óptica de una alícuota llevándola a 1 ml con agua destilada, leyendo la absorbancia a 260 nm (una lectura de 20 corresponde a 1 mg ADN/ml) frente a agua destilada en un espectrofotómetro Bau Sch & Lomb Spectronic.

#### TAMPONES Y SOLUCIONES UTILIZADAS

##### -RETICULOCITE SALINO:

0,13 M ClNa

5 mM ClK

7,4 mM Cl<sub>2</sub>Mg.6H<sub>2</sub>O

##### -SOLUCION NP-40 AL 0,1%

1 ml/l H<sub>2</sub>O destilada

##### -SOLUCION DE LISIS

10 mM ClNa

10 mM EDTA

10 mM Tris-ClH, pH 8

-SOLUCION 5 X ANAE

0,1 M ClNa

0,01 M Acetato Na. 3H<sub>2</sub>O

1 mM EDTA

0,5% SDS

-SOLUCION 10% SDS

10 g Lauril Sulfato Sódico/100 ml H<sub>2</sub>O

-SOLUCION 1M TRIS pH 8

Tris..... 60,5 g

ClH..... 30 ml

H<sub>2</sub>O cnp ..... 500 ml

-SOLUCION 4M ClNa

23,4 g ClNa/100 ml H<sub>2</sub>O

-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO (1/24, v/v)

100 ml alcohol isoamilico

2,5 l cloroformo

## ESTUDIO DEL HARLOTIPO

Se estudian 5 familias con  $\beta$ -Talasemia. En cada familia se analiza el haplotipo de ambos padres heterocigotos para la  $\beta$ -Talasemia, y su hijo homocigoto, una de estas familias presenta dos hijos homocigotos con  $\beta$ -Talasemia mayor.

El ADN se aisló según el método de Poncz (Poncz y cols., 1982). 5  $\mu$ g de ADN se digirieron con las siguientes enzimas: Hind II, Xmn I, Hind III, Ava II, Hpa I o Bam HI.

Los fragmentos de ADN después de realizar electroforesis en gel de agarosa se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. Dichos fragmentos se hibridaron con sondas específicas: epsilon ( $\xi$ ), gamma ( $\gamma$ ), pseudobeta ( $\psi\beta$ ) y beta ( $\beta$ ), según técnicas previamente descritas (Gilman y cols., 1983).



## AMPLIFICACION POR ARMS

### CONDICIONES DE AMPLIFICACION

El ADN fué aislado de sangre periférica según la técnica descrita anteriormente. La PCR se realizó en una mezcla que contenía (para 4 ml):

Tampón 10 X Cetus .....	500 $\mu$ l
Agua esterilizada .....	2700 $\mu$ l
1,25mM NTP .....	800 $\mu$ l
Espermidina 1M .....	4 $\mu$ l

Estando constituido el tampón 10 X Cetus (para 5 ml) por:

2M ClK .....	1,25 ml
1M Tris pH 8,4 .....	0,50 ml
1M Cl,Mg .....	75 $\mu$ l
gelatina .....	5 mg
H <sub>2</sub> O esterilizada .....	3,2 ml

En un Eppendorf situamos de 0,5 a 1  $\mu$ g de ADN, siendo adicionado a 20  $\mu$ l de la mezcla de PCR hasta un volumen total de 25  $\mu$ l, conteniendo 1  $\mu$ l de cada uno de los cuatro iniciadores (dos comunes, un control y el ARMS normal o mutante), y de 0,5 a 1  $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa (Cetus. Perkin-Elmer). A esta mezcla le adicionamos 25  $\mu$ l de parafina (Sigma) para evitar la evaporación y se introdujo en el ciclador.

## CICLO TERMICO

El Eppendorf se introdujo en un ciclador térmico (DNA Thermal Cycler. Perkin-Elmer) y sometido a 29 ciclos según el programa:

93°C	.....	1 minuto	
55°C	.....	1 minuto	28 ciclos
72°C	.....	1,5 minutos	

y un ciclo final con una extensión de 72°C durante 3 minutos.

El proceso total de amplificación dura aproximadamente unas 4 horas.

## REVELADO

20 µl de la muestra de ADN amplificado se mezclaron con 5 µl de una mezcla de ficoll al 15% y azul de bromofenol al 0,05% para posteriormente ser introducidos en un gel compuesto por agarosa al 1,5% y agarosa "nusieve" al 1,5% en 1 X AGB.

Se realiza la electroforésis a 100 voltios durante 30 minutos, siendo posteriormente teñido durante 10 min. en una solución de bromuro de etidio, y situado en un transiluminador (Chromato-VUE. Mod.TM-20) y fotografiado (Procesador Mitsubishi).

## SOLUCIONES

### -FICOLL-BROMOFENOL

ficoll 400	.....	15 g
azul bromofenol	.....	0,05 g
1 X AGB csp	.....	100 ml

### -BROMURO DE ETIDIO

1 mg bromuro de etidio/1 1 X AGB

### -SOLUCION DE 50 X AGB

2M Tris	.....	242,28 g
1M Acetato Sódico.3H <sub>2</sub> O	.....	136,08 g
10mM EDTA	.....	3,72 g

Adicionar 75ml de ácido acético glacial hasta pH 8,3

## DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS MUTADOS

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Genset (París) y distribuidos por Izasa, habiendo sufrido un proceso de purificación por cromatografía de alta presión (HPLC). Un par de iniciadores control (A y B con 861 pb) fueron incluidos en cada ensayo, así como un iniciador común (C). Los INICIADORES DE ARMS utilizados fueron:

IVSI nt 110 .....	390 pb (n y m)
codon 39 .....	436 pb (n y m)
IVSI NT 1 .....	281 pb (n y m)
IVSI NT 6 .....	286 pb (n y m)
IVSII nt 1 .....	634 pb (n y m)
IVSII nt 745 .....	738 pb (n y m)
codon 6 .....	207 pb (m)
	208 pb (n)

Como marcadores hemos utilizado Ø X174 RF digerido con Hae III (*Haemophilus Aegyptus*), que corta al ADN por:

GG CC

CC GG

obteniendo 11 fragmentos de un tamaño que vá de 1353 pb a 72 pb. Del mismo modo hemos utilizado el Marcador VI de Boehringer, que proporciona 12 fragmentos con un tamaño que vá de 2176 pb a 154 pb.

## **IV-RESULTADOS**

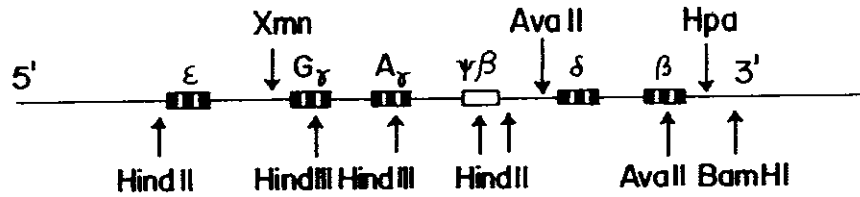
# 1-RESULTADOS HEMOCITOMETRICOS

	EDAD (años)	RBC ( $10^{12}/l$ )	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	RETIS. (%)	A <sub>2</sub> (%)	F (%)
<b>FAMILIA 1</b>										
D.B.	22 meses	4,34	7,5	24,1	56,0	17,0	31,0	114	1,0	68
Padre	38	6,07	13,2	40,5	66,8	21,7	32,6	13	4,8	2
Madre	35	5,46	11,4	34,6	63,4	20,9	32,9	64	3,6	1
<b>FAMILIA 2</b>										
E.R.	2	3,20	6,5	19,0	59,0	20,0	32,0	112	2,5	32
Padre	30	5,40	11,5	34,5	63,9	21,3	33,3	13	4,5	1,2
Madre	28	4,89	11,0	33,8	69,1	22,5	32,6	22	3,9	1,5
<b>FAMILIA 3</b>										
A.I*.	14	4,80	13,8	40,0	83	28,7	34,5	58	2,1	2,4
Padre	42	6,40	14,6	42,5	66	22,8	34,3	18	5,5	0,8
Madre	40	5,60	11,1	33,9	60	19,8	32,7	22	4,8	1,2
<b>FAMILIA 4</b>										
A.T*.	14	4,70	14,3	45,2	96	30,4	31,6	2	2,4	3,0
Padre	37	6,60	14,5	42,9	65	21,9	33,7	25	5,1	0,6
Madre	36	5,10	12,8	38,1	75	25,0	33,5	30	3,9	0,6
<b>FAMILIA 5</b>										
F.J*.	9	4,80	13,9	39,9	83	28,9	34,8	114	3,1	2,6
S.J*.	5	4,10	12,4	34,1	83	30,2	36,3	80	3,1	1,5
Padre	36	5,40	12,9	38,3	71	23,8	33,6	28	4,0	1,2
Madre	33	5,70	12,7	36,5	64	22,2	34,7	4	4,3	1,6

\*Politransfundidos

Tabla V

**2-RESULTADOS DEL HAPLOTIPO**



FAMILIA	Individuo	HindII	XmnI	HindIII	HindIII	HindII	AvaII	HpaI	BamHI	H	C	Mutación
FAMILIA 1	A I	+	-	-	-	-	+	+	-	V/V	β/β	IVSInt1/IVSInt1
	PADRE	+	-	-	-	-	+	+	-	V/V	β/A	
	MADRE	+	-	-	-	-	+	+	-	V/V	β/A	
FAMILIA 2	AT	+	-	+	+	-	+	+	+	V/V	β/β	IVSInt1/IVSInt6
	PADRE	+	-	-	-	-	+	+	+	V/I	β/A	
	MADRE	+	+	+	-	+	+	+	+	IV/I	β/A	
FAMILIA 3	FJ	-	-	+	+	-	-	+	+	VI/VI	β/β	IVSInt6/IVSInt6
	SJ	-	-	+	+	-	-	+	+	VI/VI	β/β	IVSInt6 IVSInt6
	PADRE	-	-	+	+	-	+	+	+	VI/?	β/A	
	MADRE	+	-	+	+	-	-	+	+	VI/V	β/A	
FAMILIA 4	ER	+	-	-	-	-	-	+	+	I/I	β/β	codon 39/IVSInt 110
	PADRE	+	-	-	-	-	-	+	+	I/V	β/A	
	MADRE	+	-	-	-	-	-	+	+	I/I	β/A	
FAMILIA 5	DB	+	-	-	-	-	-	+	+	I/I	β/β	codon 39/IVSInt 1
	PADRE	+	-	-	-	-	-	+	+	I/V	β/A	
	MADRE	+	-	-	-	-	-	+	+	I/I	β/A	

### 3-RESULTADOS DE AMPLIFICACION POR ARMS

La aplicación por nuestra parte de la metodología correspondiente a la técnica de amplificación con nucleótidos mutados o ARMS, nos ha permitido establecer unos resultados correspondientes al análisis molecular de las mutaciones  $\beta$ -Talasémicas estudiadas en el Hospital Universitario San Carlos de Madrid, que detallamos a continuación.

---

Nº de pacientes estudiados ..... 42

con  $\beta$ -Talasemia heterocigota .. 34

con  $\beta$ -Talasemia homocigota .... 7

con  $\beta$ -Talasemia intermedia .... 1

Nº de cromosomas estudiados ..... 37

Tipo de lesión:

Mutación sin sentido codon 39 ..... 10

IVS-1 nt 6 ..... 8

IVS-1 nt 1 ..... 11

IVS-1 nt 110 ..... 3

2 nt codon 8 ..... 2

Mutación desconocida\*..... 3

---

\* En uno se ha realizado su secuenciación demostrándose en el codon 11 delección de un nucleótido (- T).

Tabla VII

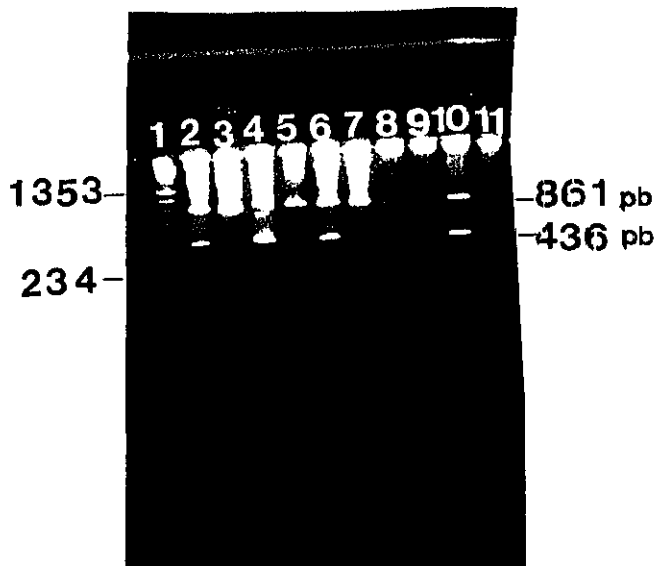


Figura 28

Análisis de ADN con el iniciador normal (ARMS normal) para la mutación del codon 39 en las columnas 2,4,6,8 y 10; las columnas 3,5,7,9 y 11 corresponden respectivamente a los pacientes 2,4,6,8 y 10 con el iniciador mutado (ARMS mutado) para la mutación del codon 39.

Se observó la presencia de hibridación en las columnas donde hemos depositado los iniciadores normales y carecen de ella los mutados, lo que indica ausencia de mutación del codon 39 en los 5 pacientes estudiados. Pudiendo suceder que éstos pacientes presenten  $\beta$ -Talasemia heterocigótica debida a otra mutación diferente del codon 39 ensayada. En la columna 1 marcador de longitud Phix174 digerido con Hae III.



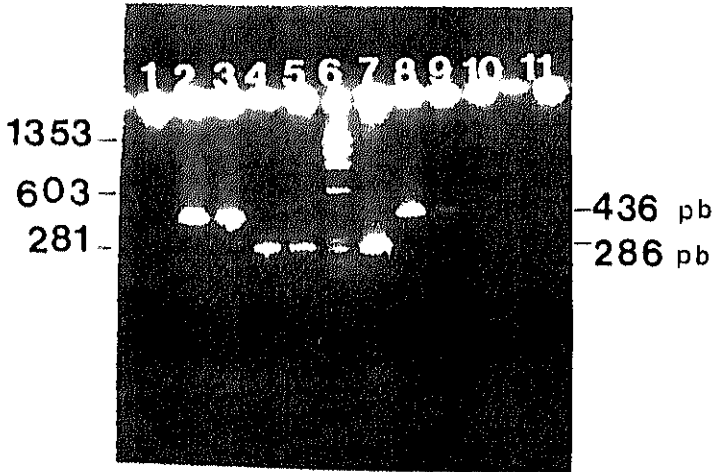


Figura 29

En las columnas 1, 4 y 5 se ha realizado el análisis del ADN con el iniciador normal para la deleción nt 6 del IVS-1; en las columnas 2 y 3 con el iniciador normal para la mutación del codon 39. Las columnas 7, 10 y 11 corresponden respectivamente a los pacientes 1, 4 y 5 con el iniciador mutado para la deleción nt 6 del IVS-1. Las columnas 8 y 9 pacientes números 2 y 3 estudiados, con el iniciador mutado para la lesión del codon 39. El paciente 1 (7) con  $\beta$ -Talasemia homocigota, es homocigoto para la mutación nt 6 del IVS-1, los pacientes 2 (8) y 3 (9), son heterocigóticos para la mutación del codon 39. Los pacientes 4 (10) y 5 (11) con  $\beta$ -Talasemia heterocigótica no presentan la mutación nt 6 IVS-1. La columna 6 contiene el marcador de longitud Phi x 174 digerido con Hae III.

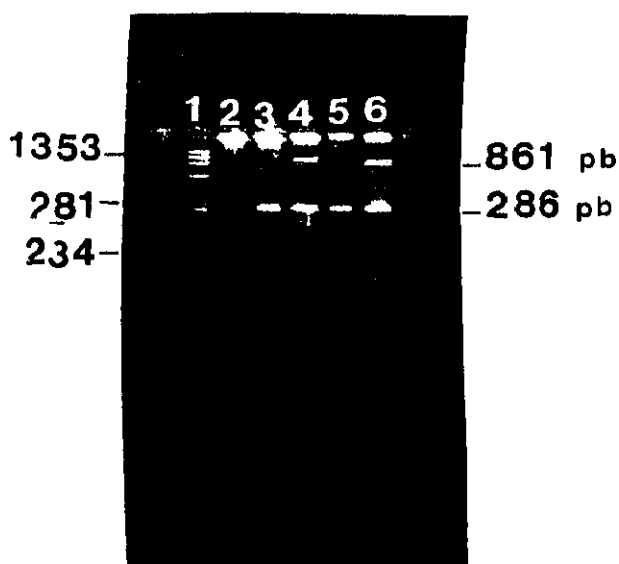


Figura 30

Iniciador normal y mutante para la mutación del nucleótido 6 en el IVS-1. En este caso las columnas 2 y 3 corresponden a un paciente homocigótico para la mutación del nt 6, en la columna 2 se situó el iniciador de ARMS normal y en la 3 el ARMS mutante para esa mutación. Las columnas 4, 5 y 6 corresponden a tres pacientes heterocigóticos estudiados con ARMS mutante para la mutación nt 6 del IVS-1. En la columna 1 se situó el marcador de longitud Phix174 digerido con Hae III.

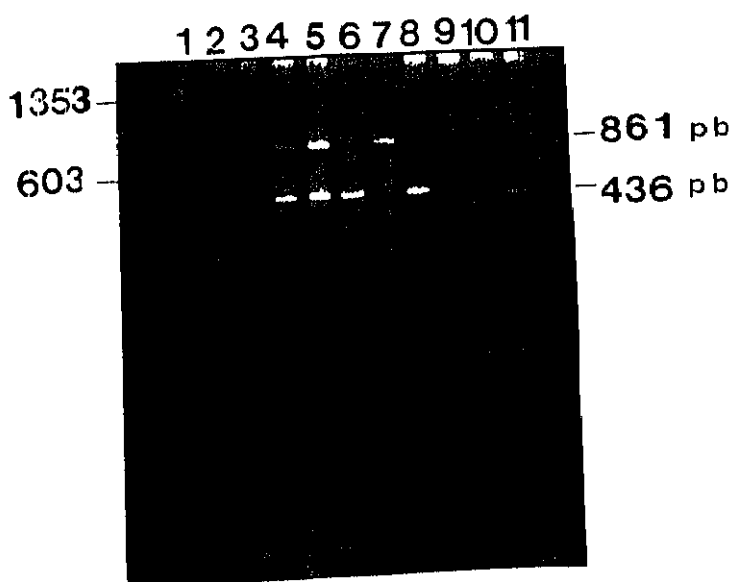


Figura 31

Las columnas 2 y 3 corresponden a un paciente homocigótico para la mutación nt 6 del IVS-1, situándose en la columna 2 el iniciador ARMS mutado y en la columna 3 el ARMS normal. En el resto de las columnas se han estudiado una serie de pacientes para la mutación del codon 39, incluyéndose en las columnas 4,6,8 y 10 los iniciadores de ARMS normales y en las columnas 5,7,9 y 11 los iniciadores de ARMS mutados para la mutación del codon 39.

Los pacientes 4(5) y 6(7) son heterocigóticos para la mutación del codon 39. En las columnas 8 y 9 paciente normal que carece de la mutación buscada. En las columnas 10 y 11 paciente con  $\beta$ -Talasemia mayor doble heterocigótico presentando mutación del codon 39 y otra mutación diferente. Columna 1 marcador de longitud VI de Boehringer.

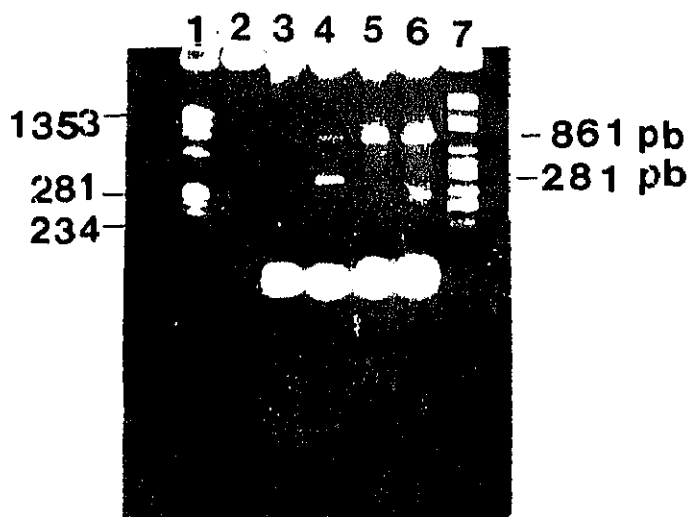


Figura 32

Análisis de ADN con el iniciador normal (ARMS normal) para la mutación nt 1 del IVS-1 en la columna 3 y ARMS mutante para la misma mutación en la columna 4. Resultando un paciente homocigótico para dicha mutación. En las columnas 5 y 6 hemos situado el ARMS mutante en dos pacientes diferentes para la mutación nt 1 del IVS-1; resultando dos pacientes normales, pudiendo ser heterocigóticos para otra mutación distinta a la ensayada. En la columna 1 el marcador de longitud Phix174 digerido con Hae III, y en la columna 7 el marcador de longitud VI de Boehringer.

# V-DISCUSSION

## 1. COMENTARIOS A LOS RESULTADOS DEL HAPLOTIPO

La introducción en los últimos años de las técnicas de biología molecular ha contribuido decisivamente a precisar la base molecular de las talasemias. En el período que va de 1980 a 1986 el estudio de la  $\beta$ -talasemia consistió básicamente en el estudio del haplotipo, seguido de la clonación y secuenciación de los fragmentos de ADN que forman los genes.

La búsqueda de polimorfismos con enzimas de restricción permite definir los diferentes haplotipos. Se denomina haplotipo, a la combinación de una serie de puntos positivos, si el lugar para la enzima está presente, o de puntos negativos, si el lugar para la enzima está ausente. En el primer caso aparecen bandas de menor longitud, por la acción específica de la enzima sobre la secuencia de la cadena. En el segundo caso los fragmentos son de mayor longitud (Old y cols., 1984).

En el año 1982 Orkin y colaboradores (Orkin y cols., 1982), identificaron nueve haplotipos en la familia de genes de la globina  $\beta$ , figura 32.

HAPLOTIPOS	Hind II (ε)	Hind II (Gγ)	Hind II (Aγ)	Hind II (Bγ)	Aval I (β)	Bam HI (β)
I	+	-	-	--	+	+
II	-	+	+	-+	+	+
III	-	+	-	++	+	-
IV	-	+	-	++	-	+
V	+	-	-	--	+	-
VI	-	+	+	--	-	+
VII	+	-	-	--	-	+
VIII	-	+	-	+-	+	-
IX	-	+	-	++	+	+

Figura 32

Se observa como dichos haplotipos se corresponden generalmente con una determinada mutación de  $\beta$ -Talasemia. Por ejemplo, en la población mediterránea, el haplotipo I se asocia con la forma común de talasemia producida por mutación G--A en el intrón 1 (IVS-1) situado en la posición 110 de la cadena  $\beta$ . Esta asociación entre haplotipo y mutación ha sido utilizada con éxito para caracterizar nuevas mutaciones, facilitando la clonación y secuenciación posterior de las mismas.

Determinamos el haplotipo, mediante el empleo de enzimas de restricción, de 10 puntos polimórficos en la familia del gen de globina  $\beta$ . Estudiando 16 enfermos con  $\beta$ -Talasemia pertenecientes a 5 familias, 6 de ellos presentan  $\beta$ -Talasemia mayor.

Los puntos polimórficos estudiados han sido los siete descritos por Orkin, a los que se añade el punto polimórfico para la enzima de restricción Ava II, gen pseudobeta (-Wainscoat y cols., 1984), el punto 3' del gen beta, para la enzima Hpa I (Kan y Dozy, 1978) y el punto situado 5' respecto al gen gamma, para la enzima Xmn I (Gilman y Huisman, 1985).

En la población mediterránea el haplotipo más común es el I (+----++) y se asocia generalmente con la mutación causada por la sustitución G--A en la región del primer intrón  $\beta$ , posición 110 (IVS-1, 110  $\beta^+$ ) (Kazazian y cols., 1984).

Conociendo los haplotipos de un paciente con  $\beta$ -Talasemia se puede predecir con bastante seguridad la mutación específica de  $\beta$ -Talasemia que presenta dicho individuo. Ahora bien, el mismo haplotipo puede, asimismo, estar ligado a cromosomas normales no talasémicos o a otras diferentes mutaciones que producen talasemia.

El haplotipo I además de estar ligado a la mutación del primer intrón, posición 110, puede observarse en la mutación C--T en el codon 39 de la cadena  $\beta$ , ( $\beta^{39}$ ), en la mutación CAG--G-G en el codon 6, ( $\beta^6$ ), en la sustitución de la base T--G en la posición 116 del intrón 1, ( $\beta^{116}$ ) y en la sustitución en el codon 27 GCC--TCC, produciendo la hemoglobina de Knosos (Weatheral, 1986).

En nuestros casos, los 20 cromosomas estudiados pertenecen a 10 enfermos con  $\beta$ -Talasemia heterocigota y por tanto de sus hijos enfermos con  $\beta$ -Talasemia mayor.

Se observa en 8 de ellos el haplotipo V (3  $\beta^{ml}$  y 5  $\beta^A$ ); en 8 el haplotipo I (4  $\beta^{ml}$  y 4  $\beta^A$ ); en 2 el haplotipo VI ( $\beta^{ml}$ ), y en 1 el haplotipo IV ( $\beta^{ml}$ ). Todos los cromosomas pertenecen a los previamente descritos por Orkin, excepto uno ( $\beta^A$ ; haplotipo ----++).

Los cromosomas  $\beta$ -Talasémicos corresponden a los haplotipos V (3 cromosomas), VI (2 cromosomas), I (4 cromosomas) y IV (1 cromosoma). Aunque no es posible hablar de frecuencia con tan escaso número de pacientes, si podemos decir que estos resultados difieren parcialmente del único estudio realizado en la población española, en la que se estudian 21 pacientes con  $\beta$ -Talasemia mayor. En este trabajo los haplotipos talasémicos más frecuentemente hallados son el II en 22 cromosomas, el I en 11 cromosomas y el IV en 6 cromosomas (Estivill y cols., 1986).

El punto polimórfico para la enzima Ava II, en el  $\beta$  está presente en todos los cromosomas estudiados. Este punto polimórfico está ausente generalmente en los cromosomas de  $\beta$ -Talasemia con el haplotipo I y la mutación G--A, en la posición 110 del primer intrón  $\beta$ . Sin embargo, está casi siempre presente en los cromosomas normales o en los cromosomas talasémicos con otro tipo de talasemia (Thein y cols., 1985).



Los fragmentos polimórficos del ADN pueden utilizarse como marcadores genéticos para el diagnóstico prenatal de la  $\beta$ -Talasemia.

Los puntos polimórficos más útiles son aquellos que raramente se encuentran en los cromosomas normales. El diagnóstico prenatal basándose en los puntos polimórficos, utilizando enzimas de restricción, pueden realizarse en otras enfermedades congénitas como: Hemofilia A, Fenilcetonuria, Enfermedad poliquística renal, Corea de Huntington y Distrofia muscular de Duchenne (Old, 1986).

El diagnóstico prenatal de  $\beta$ -Talasemia no hubiera sido posible establecerlo con la enzima Ava II, en ninguna de las familias estudiadas. Tampoco hubiera sido posible en la primera familia con ninguna de las enzimas de restricción empleadas, ya que tanto los cromosomas normales como los  $\beta$ -Talasémicos poseen un mismo haplotipo V (+----+). Sin embargo, este diagnóstico es fácil de obtener en la segunda familia, ya que los genes  $\beta$ -Talasémicos corresponden a los haplotipos IV y V, siendo en ambos progenitores el haplotipo I el que corresponde al cromosoma normal.

En la tercera familia, el diagnóstico prenatal también es posible, ya que el lugar polimórfico para la enzima Hind III está presente (++) en el gen  $\beta$ -Talasémico en los dos hermanos homocigotos, mientras que ambos lugares están ausentes (--) en el cromosoma normal ( $\beta^A$ ) de ambos padres.

## 2. COMENTARIOS A LA TÉCNICA DE AMPLIFICACION POR ARMS (PCR CON OLIGONUCLEOTIDOS MUTADOS)

A partir de 1987 la posibilidad de poder amplificar fragmentos de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado el mundo de la biología molecular y el estudio de la  $\beta$ -Talasemia, entre otras enfermedades (Saiki y cols., 1987).

Una modificación de la PCR denominada "Amplification Refractory Mutation System" o PCR con oligonucleótidos mutados, ha sido desarrollado por nosotros en este trabajo.

Esta técnica se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN acotado por dos oligonucleótidos iniciadores o "primers", que hibridan cada uno de ellos a secuencias complementarias de la doble hélice de ADN; estos oligonucleótidos se orientan de tal modo que sus extremos 3' quedan enfrentados.

Para diagnosticar una mutación específica, la técnica requiere dos oligonucleótidos iniciadores de igual secuencia excepto en el nucleótido 3' terminal, uno de los cuales es complementario de la secuencia de ADN normal y el otro cambiado un nucleótido en el ADN mutante.

Para que un iniciador sirva de modelo para la ADN polimerasa, el nucleótido 3' terminal ha de estar perfectamente unido a la secuencia del ADN diana.

Bajo condiciones cuidadosamente controladas, un nucleótido con su 3' terminal desemparejado puede no funcionar correctamente y no producirse la amplificación.

La amplificación de la secuencia diana resulta de sucesivos ciclos de desnaturalización, alineamiento y polimerización enzimática por extensión de iniciadores.

Los oligonucleótidos de ARMS fueron diseñados para detectar un ADN normal y mutante. El nucleótido 3' del iniciador mutante es complementario de la secuencia mutante, y el iniciador normal es complementario de la secuencia de ADN normal, INICIADOR COMUN C, emparejado a cualquiera de los iniciadores de ARMS normal o mutante, facilitando la detección de la mutación o la ausencia de ella.

Las muestras de ADN fueron estudiadas para estas mutaciones usando diferentes reacciones, cada una conteniendo los dos INICIADORES CONTROL A y B (amplifican la región del ADN a corta distancia de la amplificada por los oligonucleótidos de ARMS y deben producir un fragmento de un tamaño distinguible del producido por los iniciadores de ARMS), ambos A y B amplifican un fragmento de 861 pb del 3' final del gen de  $\beta$  globina; y uno de los INICIADORES NORMAL o MUTANTE de ARMS para cada una de las mutaciones.

Después de la amplificación y la electroforésis, la presencia de una banda amplificada además de la control a 861 pb, en una de las reacciones significa una mutación particular de  $\beta$ -Talasemia. Si solo aparece la banda control en las reacciones, se puede decir que ninguna de las mutaciones comunes está presente, y la muestra de ADN se debe ensayar con las mutaciones menos frecuentes.

A continuación pasamos a exponer los problemas derivados del montaje de esta técnica, puesto que para la realización de esta técnica las condiciones de trabajo han de estar perfectamente controladas en lo que se refiere: En primer lugar, al laboratorio, dentro del cual se debe evitar la manipulación de otras muestras de ADN pues con facilidad se podrían originar resultados erróneos por contaminación con dicho material.

Muy recientemente se ha puesto a punto un sistema biológico para suprimir las contaminaciones. Consiste en utilizar, para la producción de las copias a partir de la molécula inicial, un elemento que normalmente no entra en la composición del ADN, el uracilo. El ADN amplificado contiene por tanto, uracilo (en vez de timidinas), lo que, en la mayor parte de los análisis, no tiene importancia alguna.

Este ingenioso procedimiento permite, a continuación y antes de una nueva amplificación, liberar los fragmentos de ADN producidos. Para ello basta tratar las muestras de material genético con un enzima bacteriano que destruye las moléculas de ADN que contienen uracilos. De este modo, cualquier ADN contaminante procedente de una amplificación anterior queda destruido. Como el enzima es sensible al calor, queda inactivado en la PCR siguiente, por lo que no ataca el ADN que se desea amplificar.

En segundo lugar, se han de cuidar al máximo las condiciones de trabajo puesto que al utilizar tan pequeñas cantidades de muestra (0,5 a 1  $\mu$ l) y reactivos, cualquier pequeño error en la manipulación sería reflejado en los resultados.

En este sentido, aunque la técnica ARMS tiene la ventaja de ser simple, rápida y no radiactiva, hay que mantener un control exhaustivo en todos y cada uno de los pasos, que comprenden desde la extracción del ADN, evitándo la degradación del mismo en el momento de su utilización, hasta la adición de una concentración exactamente controlada al eppendorf donde vamos a realizar la amplificación.

Los problemas de ésta técnica no sólo son los inherentes al ADN, también nos vamos a encontrar con los correspondientes a los reactivos utilizados, así, todos los

iniciadores -"primers"- han de ser adicionados en idéntica concentración (picomoles), necesitando alguno de ellos una previa dilución y otros tal y como son servidos por las casas comerciales; adicionando el iniciador exacto que corresponda con la mutación buscada, así como la adición de un iniciador control evitando con ello la amplificación de otro fragmento distinto. Sin olvidar la introducción de un marcador de longitud, ya que cada mutación se corresponde con una banda a una determinada longitud.

De igual modo, los desoxinucleótidos trifosfatados, mezcla PCR y los iniciadores adicionados han de estar conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y para su utilización conviene que sean previamente separados en alícuotas evitando su alteración con constantes ciclos de congelación y descongelación, lo que supone al mismo tiempo una nueva posibilidad de contaminación.

A estos problemas propios de lo que podemos denominar "sustancia de trabajo", hay que añadir los correspondientes al utillaje empleado, lo que comprende la utilización de pipetas exclusivamente para esta técnica, programación adecuada del ciclador y la exposición final al transiluminador, la cual ha de ser controlada con el fin de evitar la desaparición de bandas amplificadas a causa del elevado tiempo de exposición.

No se deben pasar por alto, los enormes problemas que pueden surgir en el resultado final del trabajo por causas absolutamente incontroladas como puede ser un fallo en la luz o un cambio en la tensión de la misma, que originaría una desprogramación en el ciclador térmico con las consiguientes variaciones de las temperaturas seleccionadas.

Debido a todos y cada uno de los factores anteriormente mencionados, con facilidad pueden observarse mutaciones inespecíficas apareciendo una o varias bandas que no se corresponden con ninguna mutación buscada.

### 3-MUTACIONES DE $\beta$ -TALASEMIA ENCONTRADAS

Las mutaciones  $\beta$ -Talasémicas más frecuentes halladas por nosotros en este trabajo comprenden el cambio G - A en el nucleótido 1 del IVS-1 y la mutación sin sentido del codon 39.

Ambas mutaciones constituyen aproximadamente el 62 % de las mutaciones  $\beta$ -Talasémicas encontradas y junto con la mutación por cambio T - C en el nucleótido 6 del IVS-1 (23,5 %) completan el 85,5 % del total de lesiones.

Valores que difieren a los encontrados por Amsellem y colaboradores (Amsellem y cols., 1988) referidos a las mutaciones talasémicas halladas en otros sujetos homocigóticos españoles, donde un 64% del total corresponden a la mutación sin sentido del codon 39 seguida de un 16 % de la mutación en el nucleótido 6 del IVS-1 y únicamente un 3 % del total de las mutaciones corresponde a la mutación del nucleótido 1 del IVS-1.

De las mutaciones encontradas, algunas corresponden a  $\beta^0$ -Talasemia como las que ocasiona la pérdida de dos nucleótidos (AA) en el codon 8 y que altera el marco de la lectura del código genético; la mutación sin sentido del código genético del codon 39 (C - T) o el cambio de G - A en el intrón 1 que modifica los lugares de empalme y origina un ARN inestable. Estas talasemias en el estado homocigótico producen cuadros talasémicos severos, transfusión dependientes.

Por el contrario, las lesiones en el interior de los intrones IVS-1 110 y IVS-2 745 producen un cuadro de  $\beta^+$ -Talasemia con cantidades variables en la producción de cadena beta.

Mención aparte merece la mutación del nucleótido 6 en la posición 1 (IVS-1). Esta lesión se describió (Orkin y cols., 1982), en sujetos de la cuenca mediterránea y se vió asociada al haplotipo VI de Orkin. Parece que el estado homocigótico se asocia a un tipo más benigno de  $\beta$ -Talasemia que en ocasiones se ha interpretado como  $\beta$ -Talasemia silente intermedia.

En dos de éstos niños con  $\beta$ -Talasemia homocigota (F.J. y S.J.), el estudio fué realizado a la edad de 12 y 13 años cuando llevaban ya diagnosticados varios años y en régimen hipertransfusional. Pensando que podrían tener una mejor calidad de vida, sin los riesgos que conlleva el régimen transfusional y la aplicación de quelatos de hierro (Desferroxiamina), se les suprimieron las transfusiones y se mantuvieron en observación médica. La hemoglobina y el valor del hematocrito fueron paulatinamente descendiendo, siendo nuevamente reevaluados a las 16 semanas y presentaron unos valores de hemoglobina de 6,7 - 6,8 g/dl, siendo de nuevo transfundidos, encontrándose en la actualidad con régimen hipertransfusional.

De estos resultados observamos que el curso clínico de la enfermedad, es más grave en estos pacientes siendo transfusión dependiente a diferencia de otros casos descritos en la literatura que presentan un curso más benigno.

Otros dos pacientes, uno con  $\beta$ -Talasemia mayor y otro con  $\beta$ -Talasemia intermedia, no pudieron ser catalogados tras ser estudiados con 24 nucleótidos mutados diferentes. Recientemente en uno de los casos se ha realizado la secuenciación de la cadena beta, demostrándose que tanto el paciente con  $\beta$ -Talasemia intermedia como su madre con  $\beta$ -Talasemia menor, se produce una mutación en el codon 11 por delección de un nucleótido (-T), originando una alteración en el marco de la lectura del código genético.

Esta lesión había sido previamente descrita en un paciente mestizo mejicano, comentando en el trabajo original su etiología en la etnia indígena, no obstante, nosotros creemos que al ser tanto la madre como el hijo descendientes de españoles oriundos de Cáceres, es posible que la lesión se origine en España y ha sido llevada a América en tiempos del descubrimiento.

En nuestros resultados, la aparición o no de bandas nos informará si el paciente presenta una determinada mutación  $\beta$ -Talasémica, así como de su caracter homocigótico o heterocigótico del mismo, según el siguiente esquema:

<u>HIBRIDACION</u>		MUTACION
ARMS normal	ARMS mutante	
+	-	Normal.Heterocigoto para otra mutación
+	+	Heterocigoto para la mutacion estudiada
-	+	Homocigoto para la mutacion estudiada
-	-	Homocigoto para otra mutacion. Doblemente heterocigótico para otras dos mutaciones



#### 4. MUTACIONES DE LA $\beta$ -TALASEMIA EN LA LITERATURA

Las variaciones en el ADN son múltiples y ocurren de diferentes formas, incluyendo sustitución de nucleótidos (Kan y Dozy, 1978), inserción o delección de un grupo repetido de secuencias cortas (Nakamura y cols., 1987), variación en el número de GT repetidos en un "locus" (Weber y May, 1989) y variación de la longitud en el 3' terminal de secuencias Alu (Economou y cols., 1989).

Muchas de estas variaciones suceden en las secuencias entre genes e intrones y solo una pequeña fracción de las variaciones induce una mutación productora de enfermedad.

En contraste con los genes de  $\alpha$ -globina, un simple gen de  $\beta$  globina está presente por genoma haploide en humanos.

La  $\beta$ -Talasemia ha sido considerada como una variación fenotípica dependiente de muchos factores, incluida la naturaleza de la mutación involucrada; existiendo dos estados de  $\beta$ -Talasemia, rasgo y enfermedad, en comparación con los cuatro estados de  $\alpha$ -Talasemia (portador silencioso con 3 genes funcionales; rasgo  $\alpha$ -Talasémico con 2 genes funcionales; Enfermedad de Hb H, 1 gen funcional y la Hidropesía de Barts, sin genes  $\alpha$  funcionales).

La  $\beta$ -Talasemia está generalmente causada por mutaciones puntuales, éstas fueron ampliamente estudiadas desde 1980 a 1986, normalmente por análisis de haplotipo del grupo de genes de  $\beta$  globina, seguido de la clonación y secuenciación del gen mutado. Alrededor de 40 mutaciones puntuales productoras de  $\beta$ -Talasemia se descubrieron hasta mediados de 1987 (Treisman y cols., 1983); en este año fue posible amplificar regiones del gen de  $\beta$  globina, inicialmente con ADN de leucocitos (Saiki y cols., 1985; Mullis y Faloona, 1987) y secuenciación directa de los productos amplificados (Engelke y cols., 1988; Wong y cols., 1987).

Utilizando esta aproximación en individuos seleccionados, conociendo el fallo de alelos comunes del grupo étnico representado por el paciente sujeto a estudio, alrededor de 50 alelos más han sido caracterizados en menos de dos años (Kazazian y cols., 1990).

En marzo de 1990 el número total de mutaciones que producen  $\beta$ -Talasemia conocidas, son 91, las cuales son recogidas en la tabla VIII y figura 34 según Kazazian.

Los genes de  $\beta$ -Talasemia alcanzan una frecuencia significativa en muchas partes del mundo incluyendo la cuenca Mediterránea, SE Asia, India, África e Indonesia.

Las regiones con menor frecuencia incluyen Norte de Europa, Corea, Norte de China y Japón.

El espectro de alelos de  $\beta$ -Talasemia han sido determinados en una amplia variedad de grupos de población, incluyendo la raza negra Americana (Antonarakis y cols., 1984; Angastiniotis y cols., 1981); Indios asiáticos (Kazazian y cols., 1984; Thein y cols., 1988); Italianos y Griegos (Kazazian y cols., 1984); Españoles (Amselem y cols., 1988); Turcos (Díaz-Chico y cols., 1988); judíos Kurdos (Rund y cols., 1989); Chinos (Zhang y cols., 1988); Japoneses (Hattori y cols., 1991) y Tailandeses (Fucharoen y cols., 1989) entre otros.

En la mayor parte de las poblaciones afectadas, tales como los pueblos mediterráneos, Chinos, SE Asiático, Indios Asiáticos y raza negra originaria de África, un conjunto de alelos específicos de grupos étnicos explican aproximadamente del 90 al 93% de los genes de  $\beta$ -Talasemia. Por ejemplo, entre los chinos de la provincia de Kuontung, cuatro alelos explican el 90% de los genes de  $\beta$ -Talasemia (Kazazian y cols., 1986). Por otra parte, un gran número de alelos raros se han observado en cada grupo étnico.

Tabla VIII. Mutaciones puntuales de la  $\beta$ -Talasemia

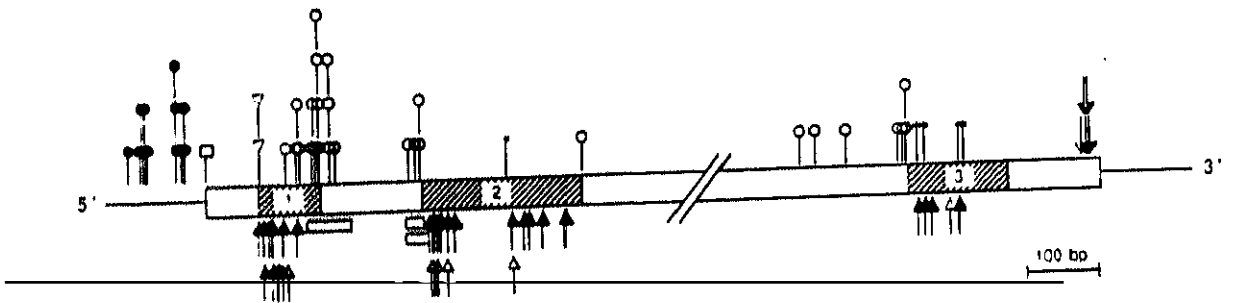
Mutant Class	Type		Origin	Reference
	10	J <sup>1</sup> - = J 1		
<b>I Nonfunctional mRNA</b>				
<b>a Nonsense mutants</b>				
1) codon 17 (A-T)	0		Chinese	21
2) codon 39 (C-T)	0		Mediterranean, European	128, 25
3) codon 15 (G-A)	0		Asian Indian	76
4) codon 121 (A-T)	0		Polish, Swiss	77, 48
5) codon 37 (G-A)	0		Saudi Arabian	14
6) codon 43 (G-T)	0		Chinese	7
7) codon 61 (A-T)	0		Black	54
8) codon 35 (C-A)	0		Thai	49
<b>b Frameshift mutants:</b>				
9) -1 codon 1 (-G)	0		Mediterranean	*
10) -2 codon 5 (-CT)	0		Mediterranean	83
11) -1 codon 6 (-A)	0		Mediterranean	75, 20b
12) -2 codon 8 (-AA)	0		Turkish	100
13) -1 codons 8/9 (+G)	0		Asian Indian	76
14) -1 codon 11 (-T)	0		Mexican	†
15) +1 codon 14/15 (+G)	0		Chinese	20
16) -1 codon 16 (-C)	0		Asian Indian	78
17) +1 codon 27-28 (+C)	0		Chinese	‡
18) -1 codon 36 (-C)	0		Indonesian	140
19) -1 codon 36-37 (-T)	0		Iranian	115
20) -1 codon 37 (-G)	0		Kurdish	115
21) -7 codon 37-39	0		Turkish	121
22) -4 codons 41/42 (-CTTT)	0		Asian Indian, Chinese	76, 80
23) -1 codon 44 (-C)	0		Kurdish	81
24) +1 codon 47 (+A)	0		Surinamese Black	§
25) -1 codon 64 (-G)	0		Swiss	26
26) +1 codon 71 (+T)	0		Chinese	20a
27) +1 codons 71/72 (+A)	0		Chinese	27
28) -1 codon 76 (-C)	0		Italian	38
29) -1 codon 82/83 (-G)	0		Azerbaijani	†
30) +2 codon 94 (+TQ)	0		Italian	114
31) +1 codons 106/107 (+G)	0		American Black	138
32) -1 codon 109 (-G)	+		Lithuanian	†
33) -2, +1 codon 114 (-CT, +G)	+		French	12
34) -1 codon 126 (-T)	+		Italian	¶
35) -4 codons 128-129, -11 codons 132-135, -5 codon 129	+		Irish	126a
<b>c Initiator codon mutants</b>				
36) ATG-AGG	0		Chinese	†
37) ATG-ACC	0		Yugoslavian	69a
<b>II RNA Processing mutants</b>				
<b>a Splice junction changes:</b>				
1) IVS-1 position 1 (G-A)	0		Mediterranean	102
2) IVS-1 position 1 (G-T)	0		Asian Indian, Chinese	76
3) IVS-2 position 1 (G-A)	0		Med, Tunisian, Am Black	129, 28, 137
4) IVS-1 position 2 (T-G)	0		Tunisian	28
5) IVS-1 position 2 (T-C)	0		Black	55
6) IVS-1 3'-end -17 bp	0		Kuwaiti	73
7) IVS-1 3'-end -25 bp	0		Asian Indian	105
8) IVS-1 3'-end (G-C)	0		Italian	†
9) IVS-2 3'-end (A-G)	0		American Black	6, 8
10) IVS-2 3'-end (A-C)	0		American Black	107
11) IVS-1 5'-end -44 bp	0		Mediterranean	73
12) IVS-1 3'-end (G-A)	0		Egyptian	33a

Tabla VIII. Mutaciones puntuales de  $\beta$ -Talasemia (cont.)

Mutante Class	Type (0 = J' - = J')	Origin	Reference
<b>b. Consensus changes</b>			
13) IVS-1 position 5 (G-C)	+	Asian Indian, Chinese, Melanesian	27, 63, 76
14) IVS-1 position 5 (G-T)	+	Mediterranean, Black	9, 54
15) IVS-1 position 5 (G-A)	+	Algerian	84
16) IVS-1 position 5 (T-C)	+	Mediterranean	102
17) IVS-1 position -1 (G-C) (codon 30)	?	Tunisian, Black	28, 54
18) IVS-1 position -1 (G-A) (codon 30)	?	Bulgarian	70a
19) IVS-1 position -3 (C-T) (codon 29)	?	Lebanese	24
20) IVS-2 3'-end CAG-AAG	+	Iranian, Egyptian, Black	54, 139
21) IVS-1 3' end TAG-GAG	+	Saudi Arabian	139
22) IVS-2 3' end -8 (T-G)	+	Algerian	11
<b>c. Internal IVS changes</b>			
23) IVS-1 position 110 (G-A)	+	Mediterranean	124, 136
24) IVS-1 position 116 (T-G)	0	Mediterranean	89
25) IVS-1 position 705 (T-G)	+	Mediterranean	39
26) IVS-2 position 745 (C-G)	+	Mediterranean	102
27) IVS-2 position 654 (C-T)	0	Chinese	27
<b>d. Coding regions substitutions affecting processing:</b>			
28) codon 25 (G-A)	E	S.E. Asian, European	101, 103
29) codon 24 (T-A)	+	American Black	98
30) codon 27 (G-T)	Knossos	Mediterranean	52
31) codon 19 (A-G)	Malay	Malaysian	140
<b>iii. Transcriptional mutants</b>			
1) -101 C-T	+	Turkish	57
2) -92 C-T	+	Mediterranean	†
3) -88 C-T	+	Am. Black, As. Indian	97
4) -88 C-A	+	Kurdish	115
5) -87 C-G	+	Mediterranean	102
6) -86 C-G	+	Lebanese	†
7) -31 A-G	+	Japanese	126
8) -30 T-A	+	Turkish	45
9) -30 T-C	+	Chinese	18
10) -29 A-G	+	American Black, Chinese	6, 89
11) -28 A-C	+	Kurdish	112
12) -28 A-G	+	Chinese	104
<b>IV. RNA cleavage + polyadenylation mutants</b>			
1) AATAAA - AACAAA	+	American Black	99
2) AATAAA - AATAAG	+	Kurdish	115
3) AATAA - A (-AATAA)	+	Arab	†
4) AATAAA - AATGAA	+	Mediterranean	69a
5) AATAAA - AATAGA	+	Malaysian	69a
<b>V. Cap site mutants</b>			
1) +1 A-C	+	Asian Indian	137

Tabla VIII. Mutaciones puntuales de  $\beta$ -Talasemia (cont.)

Mutant Class	Type (O = J <sup>0</sup> , - = J <sup>1</sup> )	Origin	Reference
VI. Unstable globins			
1) J <sup>0</sup> (European)	+	European	1
codon 112 Cys-Arg)			
2) J <sup>1</sup> (Japanese)	+	Japanese	82
(codon 110 Leu-Pro)			
3) J <sup>0</sup> (British)	+	British	73a
(codon 127 Gln-Pro)			
4) codons 127-128 (- AGG Gln Ala-Pro)	+	Japanese	62
5) codon 60 (Val-Glu)	+	Italian	111



● Transcripción

○ Empalme ARN

□ Lugar de cabeza

↓ Aclaramiento ARN

∩ Codon iniciador

↑ Frameshift

↑ Codon sin sentido

\* Globina inestable

□ Pequeña Delección

Figura 34. Mutaciones puntuales productoras de  $\beta$ -Talasemia

En el amplio grupo de pueblos mediterráneos, es importante reseñar que alguno de los 31 alelos observados en diversas regiones de esta cuenca Mediterránea, la frecuencia de los alelos varía mucho de un pueblo a otro y debido a que muchos de éstos son propios de cada región, un gran número de individuos con  $\beta$ -Talasemia mayor, portan dos alelos diferentes y son llamados dobles heterocigóticos para la lesión molecular. Verdaderos homocigotos que portan dos copias del mismo alelo son una minoría.

Es digno de tener en cuenta que la alta frecuencia de alelos de  $\beta$ -Talasemia claramente confirma la divergencia de las razas humanas; cada grupo étnico y/o racial tiene su específica batería de alelos. Cuando la misma mutación aparece en dos grupos étnicos o raciales en diferentes cromosomas chequeados probablemente la explicación se debe en este caso a dos orígenes independientes.

## MUTACIONES DE LA $\beta$ -TALASEMIA EN ESPAÑA

España es un área geográfica cuyas características raciales han sido fruto de la emigración de numerosos pueblos que a lo largo de los siglos han colonizado la península ibérica. Unos provenían de Europa y otros de Oriente a través del mediterráneo o de la costa norteafricana.

Todos estos cambios étnicos han propiciado el desarrollo de una gran heterogeneidad de patologías y de lesiones moleculares de la hemoglobina, con la aparición de casos de talasemias en poblaciones supuestamente carentes de ellas antes de la emigración territorial (Martin G., 1989).

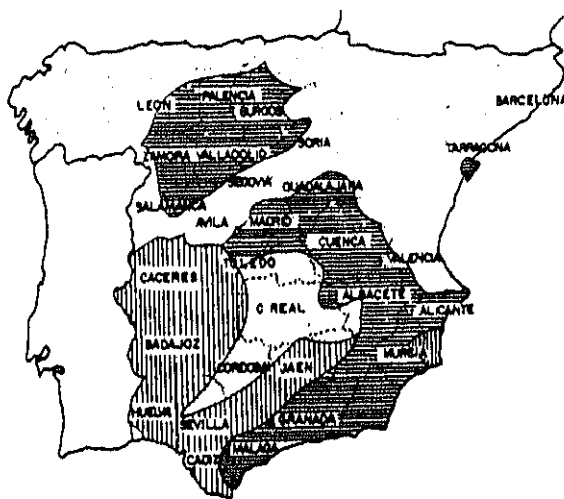
La incidencia de la  $\beta$ -Talasemia heterocigota es alta en España y pudiendo incluso alcanzar cifras del 7% en algunas regiones (Baiget M., 1986; Muñoz y cols., 1983; Oliva E., 1991). El estudio más completo sobre  $\beta$ -Talasemia realizado en España fue llevado a cabo por Calero y colaboradores (Calero y cols., 1990) sobre 825 casos de  $\beta$ -Talasemia en Madrid, procedentes de todas las regiones de España; encontrándose una significativa correlación entre el origen de los pacientes y la incidencia de la malaria en el pasado (la malaria fue oficialmente erradicada de España en 1964).

La mayoría de los pacientes con  $\beta$ -Talasemia heterocigota procedían de zonas de pasado endémico o intensa malaria (Badajoz, Cáceres, Toledo, Ciudad Real etc.).

En la figura 35 se recoge el mapa de España mostrando la distribución geográfica de la malaria en 1933.

El intento de relacionar la incidencia de la talasemia con la existencia de la malaria ha proporcionado resultados conflictivos. Por una parte, en áreas tales como Sardinia y Milanesia esta relación ha sido mostrada (Flint y cols., 1986; Siniscalco y cols., 1966).

Se cree que la  $\beta$ -Talasemia tiene una distribución geográfica particular porque individuos portadores del rasgo talasémico tienen menos mortalidad cuando infectados por el parásito de la malaria que los individuos normales que carecen de dicho rasgo talasémico. A causa de la distribución de alelos de  $\beta$ -Talasemia y su incidencia, es razonable creer que alguna mutación que origina deficiencia de  $\beta$  globina en individuos que residen en una región infectada de malaria está sujeta a una selección positiva.







-  Regiones con malaria endémica
-  Regiones con malaria severa
-  Regiones con malaria menor
-  Regiones libres de malaria

Figura 35



No obstante, en otras áreas tales como Grecia y Chipre, la talasemia se produce igualmente en áreas con o sin malaria (Plato y cols., 1964; Stamatoyannopoulos y cols., 1964), cuya prevalencia fué superior al % encontrado en España.

Dentro de un mismo marco etnico, el tipo de mutación se repite homogéneamente en el 90-94% de los casos, es decir, cada grupo de población posee unas mutaciones que le son propias, con un predominio de 4 o 5 de estos alelos mutados.

En la cuenca Mediterránea se han descrito algo más de 30 mutaciones, lo cual supone el que con relativa frecuencia en la  $\beta$ -Talasemia homocigota se produzcan cuadros heterogéneos por la asociación de dos de estas mutaciones.

Completando los datos actualmente disponibles sobre la heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -Talasemia en la cuenca Mediterránea, en la tabla IX tomado de Kattamis y colaboradores (Kattamis y cols., 1990), se presenta una recopilación de las mutaciones de  $\beta$ -Talasemia y sus porcentajes halladas en diferentes países.

	Nº cromosomas	IVS1-110	CD-39	IVS1-1	IVS1-6	IVS2-745
Grecia	348	42,5	16,9	13,2	7,2	6,9
Grecia/Italia	158	33,5	27,8	9,5	10,8	5,7
Italia	113	31	27,5	8	16,8	6,2
Sardinia	494	0,4	95,4	0	0	0,4
Sicilia	97	26,8	36,1	3,1	28,9	3,1
Turquia	192	36,4	3,9	5,7	11,6	4,2
Chipre	196	69,9	1,5	11,7	8,7	5,2
Libano	50	62,0	4,0	0	8,0	4,0
Yugoeslavia	130	33,0	5,3	13,0	24,0	2,7
Túnez	68	7,5	19,0	1,5	10,5	7,5
Francia	105	25,7	41,9	10,5	8,6	2,8

Tabla IX

En función de los datos obtenidos, podemos comentar que los estudios moleculares realizados en diversos puntos de España, demuestran que aproximadamente el 93% de las mutaciones corresponden a 5 tipos diferentes de mutaciones:

Mutación sin sentido codon 39 C - T (45,4%); cambio de T - C en el nucleótido 6 del IVS-1 (16%); cambio de G - A en el nucleótido 1 del IVS-1 (14,3%); cambio en el nucleótido 110 del IVS-1 (9,3%) y cambio C - G en la posición 745 del IVS-2 (7,5%). Estos datos quedan reflejados en la siguiente tabla X.

	Barcelona	Andalucía	Madrid	Total	%
<b>Nº CROMOSOMAS</b>					
ESTUDIADOS	57	25	37	119	100
<b>TIPO DE LESION:</b>					
Sin sentido C 39	37	7	10	54	45,4
IVS-1 nt 6	9	2	8	19	16
IVS-1 nt 1	2	4	11	17	14,3
IVS-1 nt 110	5	3	3	11	9,3
IVS-2 nt 745	-	9	-	9	7,5
1nt codon 6	3	-	-	3	2,5
2nt codon 8	1	-	2	3	2,5
Mutación desconocida	-	-	3	3	2,5

Tabla X

## 5. DIAGNOSTICO PRENATAL DE LA $\beta$ -TALASEMIA

Debido a la falta de una terapéutica eficaz ante estas enfermedades hereditarias, como son las  $\beta$ -Talasemias, durante los últimos años se viene realizando un esfuerzo gigantesco para establecer el diagnóstico precoz prenatal de los fetos afectados (Orkin, 1982).

El material fetal puede obtenerse mediante amniocentesis, por punción de sangre fetal o merced a la biopsia de las vellosidades coriónicas (Alter, 1988).

En la actualidad el método más ampliamente utilizado es la biopsia de las vellosidades coriónicas, ya que reúne dos ventajas fundamentales: Puede realizarse durante el primer trimestre de gestación, con lo que reduce el angustioso tiempo de espera y por otra parte, evita la contaminación materna al realizarse la selección del material fetal tras el análisis microscópico de la biopsia de las vellosidades coriónicas (Old, 1986). El riesgo para el feto es sin embargo más elevado (2-4%) con la biopsia coriónica que con amniocentesis (0,3%) (Cao y cols.; 1986).

La aplicación de las técnicas de biología molecular y del ARN recombinante han desplazado actualmente a otros métodos diagnósticos permitiendo diagnosticar la enfermedad a nivel molecular.

Para establecer un correcto diagnóstico siempre será necesario estudiar previamente a los padres y hermanos del feto propósitos. El análisis del ADN permitirá elegir el tipo de técnicas moleculares diagnósticas.

Existen dos diferentes métodos de estudio: La detección directa y el análisis indirecto basado en el estudio de los fragmentos de restricción polimórfica o diagnóstico por ligamento ("linkage").

Cuando la mutación no puede detectarse directamente con una enzima de restricción o con una sonda de oligonucleótidos sintéticos, el diagnóstico prenatal de las enfermedades hereditarias monogénicas ha de realizarse mediante el estudio de los fragmentos de restricción polimórfica (FRLP).

Un panel de enzimas y sondas específicas de ADN se requieren para determinar que combinación (haplotipo) va ligada al rasgo patológico de una determinada familia.

Un requisito previo, indispensable para establecer el diagnóstico, es el que los padres presenten un haplotipo diferente, así como el estudio previo al menos de otro hermano normal u homocigótico para la enfermedad.

A pesar de su complejidad, en relación con los métodos directos, siguen conservando un notable valor en el diagnóstico prenatal, ya que éste puede realizarse a pesar de no conocerse el defecto molecular exacto que lo produce. Fué hasta el año 1986, el método de diagnóstico prenatal de la  $\beta$ -Talasemia.

En la actualidad, utilizando ADN amplificado por PCR bien directamente mediante técnica de ARMS o bien seguido de hibridación y/o digestión con endonucleasas de restricción del producto amplificado, el diagnóstico prenatal es casi siempre viable de tres a siete días del muestreo fetal, habiendo disminuído considerablemente el error diagnóstico (Alter ;1988).

Esta técnica de ARMS permite el análisis directo de algún lugar -"locus"- de interés, siendo aplicable a cualquier enfermedad heredada de la que se conozca la lesión previa mediante secuenciación incluso puede ser aplicada al diagnóstico prenatal, estudiando el material fetal.

## VI-CONCLUSIONES

- 1- El método seleccionado para la amplificación del ADN, reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos mutados, tiene las ventajas de ser rápido, simple, perfectamente reproducible y no radiactivo.
- 2- En once pacientes con  $\beta$ -Talasemia heterocigótica, se encontró la mutación conocida por el cambio de guanina por adenina (G  $\rightarrow$  A) en el nucleótido 1 del intrón 1 (IVS-1, nt 1), lo que supone un 29,7% del total de las mutaciones estudiadas.
- 3- En diez enfermos se encontró la mutación sin sentido del codon 39 debida al cambio de citosina por timina (C  $\rightarrow$  T), lo cual supone un 27% del total de las mutaciones.
- 4- En ocho enfermos se halló el cambio de timina por citosina (T  $\rightarrow$  C) en el nucleótido 6 del intrón 1 (IVS-1, nt 6). La frecuencia fué del 21,6%
- 5- Tres enfermos presentaban la mutación del nucleótido 110 del intrón 1 (IVS-1, nt 110) producido por el cambio del nucleótido guanina por adenina (G  $\rightarrow$  A). Supone el 1,8% de las mutaciones encontradas.
- 6- En tres enfermos no pudo ponerse de manifiesto la lesión molecular pese a que el estudio fué realizado con 24 nucleótidos diferentes normales y mutados. En uno de ellos la secuenciación posterior del ADN  $\beta$  amplificado puso de manifiesto la delección de un nucleótido (-T) en el codon 11. Se trata de la 2ª delección de este tipo descrita en la literatura mundial.

- 7- El 85% de los enfermos, tal y como sucede en otros países de la cuenca mediterránea, corresponden a las mutaciones IVS-1, nt 1; IVS-1, nt 6 y mutación sin sentido del codon 39.
  
- 8- No se ha confirmado, en dos pacientes homocigóticos con la mutación IVS-1, nt 6, el carácter benigno, no transfusión dependiente de la enfermedad.
  
- 9- Finalmente, el estudio del haplotipo en 7 pacientes homocigóticos con  $\beta$ -Talasemia (2 hermanos) mostró que 4 cromosomas corresponden al haplotipo I, 3 al V, 2 al VI y 1 al IV. Se confirmó la asociación entre el haplotipo VI de Orkin y la mutación IVS-1, nt 6.



## VII-BIBLIOGRAFIA

ADAMS J.G., COLEMAN M.B., HAYES J., MORRISON T., STEINBERG M.H. Modulation of fetal hemoglobin synthesis by iron deficiency. N. Engl. J. Med. (1985); 313: 1402-1405.

ALTER B.P. Prenatal diagnosis: General introduction, methodology and review. Hemoglobin. (1988); 12:763-772.

ANFENSEN C.B. Principles that govern the folding of protein chains. Science (1973); 81: 223.

ANGASTINIOTIS M., HADJININAS M.G. Prevention of thalassaemia in Cyprus. Lancet. (1981); 1: 369-371.

ANSELEM S., NUNES V., VIDAUD M., ESTIUILL X., WONG C., D'AURIOL L. Determination of the spectrum of  $\beta$ -thalassaemia genes in Spain by use of the dot-blot analysis of amplified  $\beta$ -globin DNA. Am. J. Hum. Genet. (1988); 43: 95-100.

ANTONARAKIS S.E. Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. N. Engl. J. Med. (1989); 320: 153-163.

ANTONARAKIS S.E., BOEHM C.D., GIARDINA P.J.V. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the  $\beta$ -globin gene cluster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1982); 79: 137-141.

ANTONARAKIS S.E., KAZAZIAN H.H.Jr., ORKIN S.H. Polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. Hum. Genet. (1985); 69: 1-14.

ANTONARAKIS S.E., ORKIN S.H., CHENG T.C.  $\beta$ -thalassaemia in american blacks: Novel mutations in the TATA box and IVS-2 acceptor splice site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1984); 81: 1154-1158.

AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., STRUHL K., IVERSON P.W., BONITZ S.G. Ed. John Wiley & Sons, Nueva York. (1989).

BAGLIONI C., COLOMBO B., JACOBS-LORENA M. Chain termination: A test for a posible explanation of thalassaemia. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1969); 165: 212.

BAIGET M. Grupo de estudio de hemoglobinopatías y talasemias (GEBTHA). Los síndromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. Sangre. (1986); 31: 609-613.

BALTIMORE D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature (1970); 226: 1209-1211.

BANK A., BRAVERMAN S., O'DONELL J.V., MARKS P.A. Absolute rates of globin chain syntesis in thalassaemia. Blood (1968); 31: 226.

BANK A., MARKS P.A. *Excess  $\alpha$  chain synthesis relative to  $\beta$  chain synthesis in thalassaemia major and minor.* Nature (1966); 212: 1198.

BEALE D., LEHMANN H. *Abnormal haemoglobins and the genetic code.* Nature. (1965); 207: 259.

BENZ E.J., PRITCHARD J., HILLMAN D., GLASS J., FORGET B.G.  *$\beta$ -globin messenger RNA content of bone marrow erythroblasts in heterozygous  $\beta$ -thalassemia.* Am. J. Haematol. (1984); 16: 33.

BERNARDS R., FLAVELL R.A. *Physical mapping of the globin gene deletion in hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH).* Nucleic Acids (1980); 8: 1521.

BERNARDS R., KOTTER J.M., FLAVELL R.A. *Physical mapping of the globin gene deletion in ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup>-thalassemia.* Gene (1979); 6: 265.

BETKE K., MARTI H.R., SCHLICH L. *Estimation of small percentages of foetal haemoglobin.* Nature (1959); 184: 1877-1878.

BOEHM C.D., ANTONARAKIS S.E., PHILLIPS J.A. *Prenatal diagnosis using polymorphic DNA restriction sites: Report on 95 pregnancies at risk for sickle cell disease or  $\beta$ -thalassemia.* N. Engl. J. Med. (1983); 308: 1054-1058.

BOS J.L., FEARON E.R., HAMILTON S.R. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature (1987); 327: 293-297.

BOTSEIN D., WHITE R., SKOLNICK M., DAVIS R. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. (1980); 32: 314-331.

BRAVERMAN A.S., LESTER D. Evidence for increased proteolysis in intact  $\beta$ -thalassemia erythroid cells. Hemoglobin (1981); 5: 549.

BUNN H.F. Subunit assembly of hemoglobin: An important determinant of hematologic phenotype. Blood (1987); 69: 1-6.

BUNN H.F. *Hemoglobins: normal and abnormal*. En Nathan DG, OSKI FA. Ed. Hematology on infancy and childhood. WB Saunders. Philadelphia (1987): 613-640.

BUNN H.F., FORGET B.G. *Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects*. W B Saunders; Philadelphia (1986).

BUNN H.F., FORGET B.G., RANNEY H.M. *Human hemoglobins*. WB Saunders Company. Philadelphia. (1977).

CAI S.P., CHANG C.A., ZHANG J.Z. Rapid prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia using DNA amplification and nonradiative probes. Blood (1989); 73: 372-374.

CALERO F., VILLEGAS A., PORRES A., VALVERDE F., DEL POTRO E., LUQUE J.M. Hematologic data in 825 cases of  $\beta$ -thalassaemia trait of Spain. Nouv. Rev. Fr. Hematol. (1990); 32: 265-270.

CAO A., PINTUS L., LECCA U. Control of homozygous  $\beta$ -thalassaemia by carrier screening and antenatal diagnosis in Sardinians. Clin. Genet. (1984); 26: 12-22.

CAO A., PIRASTU M., ROSATELLI C. The prenatal diagnosis of thalassaemia. Annotation. Br. J. Haematol. (1986); 63:215-220.

CASALS T., BAIGET M., HERNANDEZ J.L. Doble heterocigocia  $\beta$ -Talasemia/Hb Punjab: Estudio del primer caso descrito en España. Sangre. (1986); 31:250.

CLEGG J.B., NAUGHTON M.A., WEATHERALL D.J. An improved method for the characterization of human hemoglobin mutants: Identification of  $\alpha_2\beta_2$  95 Glu hemoglobin N (Baltimore). Nature. (1965); 207:945.

CLEGG J.B., WEATHERALL D.J. Hemoglobin sintesis in  $\delta$ -Talassemia (Hemoglobin H disease). Nature. 215:1241.

COMI P., GIGLIONI B., BARBARANO L., OTTOLENGHI S., WILLIAMSON R. Transcriptional and post-transcriptional defects in  $\beta^0$ -thalassaemia. Eur. J. Biochem. (1977); 79: 617.

CONNER B.J.A., REYES A., MORIN C., ITAKURA K., TEPLITZ R.L., WALLACE R.B. *Detection of sickle cell  $\beta^s$ -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1983); 30:278-282.

CHANG J.C., KAN Y.W.  *$\beta^0$ -thalassaemia, a nonsense mutation in man.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979); 76: 2886.

CHEBLOUNE Y., TRABUCHET G., PONCET D., COHENSOLAL M., FAURE C., VERDIER G., NIGON V. *A new method for detection of small modifications in genomic DNA, applied to the human  $\delta$ - $\beta$  globin gene cluster.* Eur. J. Biochem. (1984); 142: 473.

DACIE J. *The haemolytic anaemias.* 3<sup>th</sup> Ed. Vol 2 Churchill Livingstone. New York (1988).

DE LAS NIEVES M.A., DE PABLOS J.M., LOPEZ NEVOT M.A., GARRIDO F. *Alteraciones moleculares de la  $\beta$ -talasemia en la zona sur de España.* Sangre. (1991); 36: 132-135.

DEISSEROTH A., NIENHUIS A., LAWRENCE J., GILES R., TURNER P., RUDDLE F.H. *Chromosomal localization of human beta gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1978); 75: 1456-1460.

DEISSEROTH A., VELEZ R., NIENHUIS A.W. *Hemoglobin syntesis in somatic cell hybrids: Independent segregation of the human alpha and beta globin genes.* Science (1976); 191: 1262-1267.

- DIAZ-CHICO J.C., YANG K.G., STOMING T.A. *Mild and severe  $\beta$ -thalassemia among homozygotes from Turkey: Identification of types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes.* Blood (1988); 71: 248-251.
- DIERKS P., OUYEN A.W., COCHRAN M.D. *Three regions upstream of the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit  $\beta$ -globin gene in mouse 3T3 cells.* Cell (1983); 32: 695-706.
- DOBROVIC A., TRAINOR K.J., MORLEY A.A. *Detection of the abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction.* Blood (1988); 72: 2063-2065.
- EATON W.A. *The relationship between coding sequences and function in haemoglobin.* Nature. (1980); 284: 183.
- ECONOMOU E.P., BERGEN A.W., ANTONARAKIS S.E. *Novel DNA polymorphic system: Variable poly A tract 3' to Alu I repetitive elements.* Am. J. Hum. Genet. (1989); 45: A 138.
- EDSALL J.T. *Blood and hemoglobin: The evolution of knowledge of functional adaptation in a biochemical system.* J. Hist. Biol. (1972); 5: 205.
- ENGELKE D.R., HOENER P.A., COLLINS F.S. *Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1988); 85: 544-548.



ERLICH H. A. *Basic Methodology*. Ed. PCR Technology. Nueva York, Stockton Press (1989): 1-5.

ESTIVILL X., NUNES V., DEL RIO E., BAIGET M. *Heterogeneidad molecular de la  $\beta$ -talasemia en la población española*. Sangre. (1986); 31 (2): 247.

FAIRBANKS V.F. *Hemoglobinopathies and thalasseмии*. Brian C. Decker. New York (1980).

FLINT J., GIL A.V.S., BOWDEN D.K., OPPENHEIMER S.J., SILL P.R., SERJEANTSON S.W., BANA-KOIRI J., BHATIA K., ALPERS M.P., BOYCE A.J., WEATHERALL D.J., CLEGG J.B. *High frequencies of thalasseμία are the result of natural selection by malaria*. Nature. (1986); 321: 744-750.

FORGET B.G., BENZ E.J., SKOULTCHI A., BAGLIONI C., HOUSMAN D. *Absence of messenger RNA for  $\beta$ -globin chain in  $\beta^0$ -thalassaemia*. Nature (1974); 247: 279.

FRIEDMAN K.D., ROSEN N.L., NEWMAN P.J., MONTGOMERY R.R. *Enzymatic amplification of specific cDNA inserts from lambda gt 11 libraires*. Nucleic Acids Res. (1988); 16: 8718-8720.

FUCHAROEN S., FUCHAROEN G., FUCHAROEN P. *A novel ochre mutation in the  $\beta$ -thalasseμία gene of a thai*. J. Biol. Chem. (1989); 264: 7780-7783.

GALLIANO P., GIRODON E., GHANEM N., FONT L.L., DEL RIO E., MARTIN J. *High prevalence of the  $\beta$ -thalassemia nonsense 37 mutation in catalonians from the Ebro delta.* Br. J. Haematol. (1992); 81: 126-127.

GIDARI A.S., LEVERE R.D. *Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis.* Semin. Hematol. (1977); 14: 145.

GILL F., ATWATER J., SCHWARTZ E. *Hemoglobin Lepore trait: Globin synthesis in bone marrow and peripheal blood.* Science. (1972); 178:623.

GILMAN J.G., HUISMAN T.H.J. *DNA sequence variation associated with elevated fetal G-gamma globin production.* Blood (1985); 66: 783.

GILMAN J.G., HUISMAN T.H.R., ABELS J. *Dutch  $\beta^0$  thalassaemia: a 10 kilobase DNA deletion associated with significant gamma-chain production.* Br. J. Haematol. (1984); 56: 339.

GONZALEZ-REDONDO J.H., STOMING T.A., KUTLAR F. *AC→T substitution at nt-101 in a conserved DNA sequence of the promoter region of the  $\beta$ -globin gene is associated with "silent"  $\beta$ -thalassemia.* Blood (1989); 73: 1705-1711.

GONZALEZ-REDONDO J.H., STOMING T.A., LANCLOS K.D. *Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous  $\beta$ -thalassaemia from the southeastern United States.* Blood (1988); 72: 1007-1014.

GONZALEZ-REDONDO J.M., DIEZ-CHICO J.C., MALCORRA-AZPIAZU J.J., BALDA-AGUIRRE M.I., HUISMAN T.H.J. *Characterization of a newly discovered alfa-thalassaemia-1 in two spanish patients with Hb H disiaese.* Br. J. Haematol. (1988); 70: 459-463.

GONZALEZ-REDONDO J.M., VILLEGAS A., HUISMAN T.H.J. *Estudio del haplotipo en tres pacientes homozigóticos para la beta-talasemia.* Sangre. (1987); 32: 453-459.

GROSWELD G.C., KOSTER A., FLAVELL R.A. *A transcription map of the  $\beta$ -globin gene.* Cell (1981); 23: 573.

GUSELLA J.F., WEXLER N.S., CONNEALLY P.M. *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease.* Nature . (1983); 306: 234-238.

HATTORI Y., YAMANE A., YAMASHIRO Y. *Gene analysis of  $\beta$ -thalassemia among Japanese.* Hemoglobin. (1991).

HIGH K.A., BENZ E.J. *The ABCs of molecular genetics: A haematologist's introduction. In recent advances in haematology.* Ed. A.V. Hoffbrand. Churchill Livingstone. Edinburgh. (1985).

HUEHNS E.R., FLYNN F.V., BUTLER E.A., BEAVEN G.H. *Two new hemoglobin variants in the very young human embryo.* (1961); 189: 496-497.

ICSH. *International Committed for Standarization in Hematology: Simple electrophoretic system for presumptive identification of abnormal hemoglobins blood.* (1978); 52: 1058-1064.

IHIC. *International Hemoglobin Information Center. Hemoglobin.* (1988); 12:283-309.

INGRAM W.M. *Abnormal humain haemoglobin III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins.* Biochem Biophys Acta (1959): 36: 402-411.

JEFFREYS A.J. *DNA sequence variants in the G $\theta$ -, A $\theta$ -,  $\delta$  and  $\beta$ -globin genes of man.* Cell (1979); 18: 1-10.

JEFFREYS A.J., WILSON V., NEUMAN R., KEYTE J. *Amplification of human minisatellites by the polimerase chain reaction: towards DNA fingerpringting of single cells.* Nucleic. Acids Res. (1988); 16: 10953-10971.

JELINEK W.R., SCHMID C.W. *Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression.* Ann. Rev. Biochem. (1982); 51: 813.

JORDAN B. Los mapas del genoma humano. Mundo Científico (1989); 10: 200-208.

KAMUZORRA H., JONES R.T., LEHMANN H. The  $\zeta$  chain, an  $\alpha$ -like of human embryonic haemoglobin. FEBS. Lett. (1974); 46: 195-196.

KAN Y.W., DOZY A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human  $\beta$ -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1978); 75: 5631-5635.

KAN Y.W., DOZY A.H., WARMUS H.E., TAYLOR J.M. Deletion of  $\alpha$  globin genes in haemoglobin H disease demonstrate multiple  $\alpha$  globin structural loci. Nature (1975): 255.

KAN Y.W., LEE K.Y., FURBETTA M. Polymorphism in DNA sequences in the  $\beta$ -globin gene region: Application to prenatal diagnosis in  $\beta^0$ -thalassemia in Sardinia. N. Eng. J. Med. (1980); 302: 185-188.

KANTOR J.A., TURNER P.H., NIENHUIS A.W.  $\beta$ -thalassemia: Mutations which affect processing of the  $\beta$ -globin mRNA precursor. Cell (1980); 21: 149.

KATTANIS C., CENG G., HU H., REESE A.L., GONZALEZ-REDONDO J.M., KUTLAR A., KUTLAR F., HUISMAN T.H.J. Molecular characterization of the  $\beta$ -thalassemia in 174 patients with *thalassaemia mayor*. Br. J. Haematol. (1990); 74: 342-346.

KAWASAKI E.S., WANG A.M. *Detection of gene expression*.  
ERLICH A.H., Ed. PCR TECHNOLOGY. Nueva York: M. Stockton  
Press. (1989).

KAZAZIAN H.H. *Seminars in haematology*. MIESCHER P.A., JAFFE  
E.R. Ed. W. B. Saunders Company. Vol 27, nº 3 (1990).

KAZAZIAN H.H. Jr. *Molecular pathology of the  $\beta$ -globin gene  
cluster. Perspectives on disease*. Elsevier Science Publis-  
hers. Amsterdam. (1985).

KAZAZIAN H.H. Jr., BOEHM C.D. *Molecular basis and prenatal  
diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia*. Blood (1988); 72: 1107-1116.

KAZAZIAN H.H. Jr., DOWLING C.E., WABER P.G. *The spectrum of  
 $\beta$ -thalassemia genes in China and southeast Asia*. Blood  
(1986); 68: 964-966.

KAZAZIAN H.H. Jr., ORKIN S.H., ANTONARAKIS S.E. *Molecular  
characterization of seven  $\beta$ -thalassemia mutations in Asian  
Indians*. EMBO J. (1984); 3: 593-596.

KAZAZIAN H.H. Jr., ORKIN S.H., MARKHAM A.F. *Quantification  
of the close association between DNA haplotypes and  
specific  $\beta$ -thalassemia mutations in mediterraneans*. Nature  
. (1984); 310: 152-154.

KEREM B.S., ROMMENS J.M., BUCHANAN J.A. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. Science (1989); 245: 1073-1080.

KIRSCHMANN C., LUPOVITZ Z., STEINHERZ M., ZAIZOV R. Globin chain synthesis in Hb H disease: The activity of red cell precursors and their mRNA. Isr. J. Med. Sci. (1978); 14: 1102.

LAWN R.M., EFSTRATIADIS A., O'CONNELL C., MANIATIS T. The nucleotide sequence of the human  $\beta$ -globin gene. Cell (1980); 21: 647.

LEBO R.V., CARRANO A.V., KAN Y.W. Assignment of human  $\beta$ - $\gamma$  and  $\delta$ -globin genes to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and DNA restriction enzyme analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. (1979); 76: 5804.

LEHMANN H., HUNTSMAN R.G. Introducción a la estructura y función de la hemoglobina. Hemoglobinas anormales. Clínica Hematológica. Vol 2/2. Ed. Salvat. Barcelona (1976)

LI H., GYLLENSTEN U.B., CUI X., SAIKI R.K., ERLICH H.A., ARNHEIM N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature (1988); 355: 414-417.

MARCO F., MERINO J. La  $\beta$  y  $\delta\beta$  talasemias heterocigotas en la provincia de Alicante. Sangre. (1988); 33: 479-482.

MARTIN NUÑEZ G. *Incidencia de las hemoglobinas estructurales en la alta Extremadura. Estudio neonatal.* (1989). Madrid. Tesis doctoral.

MERCOLA K.E., CLINE M.J. *The potentials of inserting new genetic information.* N.Engl.J.Med. (1980); 303:1277.

MICHELSON A.M., ORKIN S.H. *Boundaries of gene conversion within the duplicated human  $\alpha$ -globin genes: Concerted evolution by segmental recombination.* J. Biol. Chem. (1983); 258: 12545.

MOORE M.R. *The biochemistry of the porphyrins.* Clin. Hematol. (1980); 9: 227-252.

MULLIS K.B. *Reacción en cadena de la polimerasa.* Nature (1990); 165: 30-37.

MULLIS K.B., FALOONA F. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzym. (1987); 155: 335-350.

MULLIS K.B., FALOONA F., SCHARF S.J., SAIKI R.K., HORN G.T., ERLICH H.A. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.* Cold. Spring Symp. Quant. Biol. (1988); 51: 263-273.



MUÑOZ J.A., RISUEÑO C.E., GIL J.L., MARTIN V., RUBIO A. *Escrutinio de microcitosis en la búsqueda de portadores del gen betatalasémico II. Incedencia de la  $\beta$ -talasemia en la bahía de Cádiz.* Sangre. (1983); 28: 311-317.

MYERS R.M., LUMELSKY N., LERMAN L.S., MANIATIS T. *Detection of single base substitutions in total genomic DNA.* Nature. (1985); 313:495.

NAKAMURA Y., LEPPERT M., O'CONNELL P. *Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping.* Science (1987); 235: 1616-1622.

NATHAN D.G. *Thalassemia.* N. Engl. J. Med. (1972); 286: 586.

NEWTON C.R., GRAHAM A., HEPTINSTALL L.E., POWELL S.J., SUMMERS C., KALSHEKER N., SMITH J.C., MARCKHAM A.F. *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS).* Nucleic Acids Res. (1989); 17: 2503-2516.

NIENHUIS A.W., ANAGNOW N.P., LEY T.J. *Advances in thalassaemia research.* Blood (1984); 63: 738-758.

NIENHUIS A.W., WOLFE L.C. *The thalassaemias.* En Nathan E. G., OSKI FA. Ed. *Hematology of infancy and childhood.* W B Saunders Company. Filadelfia (1987): 699-678.

NUNES V., BAIGET M., ESTIVILL X., FELEZ J. *Estudio del patrón de segregación de los genes responsables de la hemofilia A.* Med. Clin. (Barc.) (1986); 86: 743-747.

OLD J., LONGLEY J., WOOD W.G., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J. *Molecular basis for acquired haemoglobin H disease.* Nature (1977); 269: 524.

OLD J.M. *Fetal DNA analysis.* En "human genetic diseases. A practical approach". Ed. K E Davis. IRL Press Oxford. (1986).

OLD J.M., VARAWALLA N.Y., WEATHERALL D.J. *Rapid detection and prenatal diagnosis of  $\beta$ -Thalassaemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the U.K.* The lancet (1990); 336: 834-837.

OLD J.M., WARD R.T.H., KARAGOZLU F., PETROU M., MODELL B., WEATHERAL D.J. *First-trimester fetal diagnosis for haemoglobinopathies : Three cases.* Lancet. (1982); 2:1413.

OLIVA E. *Análisis de un programa de detección de talasemias en Menorca.* Sangre. (1991); 36: 129-131.

ORKIN S.H. *Genetic diagnosis of the fetus.* Nature. (1982); 296:202-203.

ORKIN S.H., ALTER B.P., ALTAY C. *Deletion of the  $\gamma$ -globin gene in  $\gamma$ - $\delta$  $\beta$ -thalassemia.* J. Clin. Invest. (1979); 64: 886.

ORKIN S.H., ANTONARAKIS S.E., LOUKOPOULOS D. *Abnormal processing of beta Knossos RNA.* Blood (1984); 64: 311-315.

ORKIN S.H., GOFF S.C., HECHTMAN R.L. *Mutation in an intervening sequence splice junction in man.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981); 78: 5041.

ORKIN S.H., KAZAZIAN H.H. *The mutation and polymorphism of the human beta-globin gene and its surrounding DNA.* Annu. Rev. Genet. (1984); 18: 131-139.

ORKIN S.H., KAZAZIAN H.H. Jr, ANTONARAKIS S.E. *Linkage of  $\beta$ -thalassaemic mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphism with DNA polymorphism in the human  $\beta$ -globin gene cluster.* Nature (1982); 296: 627-631.

ORKIN S.H., LITTLE P.F.R., KAZAZIAN H.H., BOEHM C.D. *Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis: Application to prenatal diagnosis.* N. Engl. J. Med. (1982); 32: 314-331.

OTTOLENGHI S., COMI P., GIGLIONI B., TOLSTOSHEV P., LANYON W.G.  *$\delta$   $\beta$ -thalassaemia is due to a gene deletion.* Cell (1976); 9: 71.

OTTOLENGHI S., GIGLIONI B., COMI P., GIANNI A. Globin gene deletion in HPFH  $\delta^{\circ}\beta^{\circ}$  thalassemia and Hb Lepore disease. Nature (1979); 278: 654.

PATARYAS H.A., STAMAYANNOPOULOS G. Hemoglobins in humans fetuses: Evidence for adult hemoglobin production after the 11th gestational week. Blood (1972); 39: 688-696.

PAULING L., ITANO H.A., SINGER S.J., WELLS C. Sickle cell anemia, a molecular disease. Science (1949); 110: 543-548.

PERUTZ, M.F. La estructura de la hemoglobina y el transporte respiratorio. Scientific American, pg. 43. (Febrero 1979).

PERUTZ M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Nature. (1970); 228: 726.

PIRASTU M., KAN Y.W., GALANELLO R., CAO A. Multiple mutations produce  $\delta \beta^{\circ}$  thalassemia in Sardinia. Science (1984); 223: 929.

PIRASTU N., SAGLIO G., CHANG J.C., CAO A. Initiation codon mutation as a cause of thalassaemia. J. Biol. Chem. (1984); 259: 12315.

PLATO C.C., RUCKNAGEL D.L., GERSHOWITZ H. *Studies on the distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, thalassemia and other genetic traits in the coastal and mountain villages of Cyprus.* Am. J. Hum. Genet. (1964); 16: 267-283.

PONZ M, SOLOWIEJZYC D., HARPEL B., MORY Y., SCHWARTZ E., SURREY S. *Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood. Analysis of beta-like globin genes.* Hemoglobin. (1982); 6: 27.

PROUDFOOT N.J., SHANDER M.H.M., MANLEY J.L., GEFTER M.L., MANIATIS T. *Structure and vitro transcription of human globin genes.* Science (1980); 209: 1329.

RAMIREZ F., MEARS J.G., NUDEL U. *Defects in DNA and globin mRNA in homozygotes for hemoglobin Lepore.* J. Clin. Invest. (1979); 63:736.

RAMOT B., BEN-BASSAT I., MOZEL M., SHACKED N. *Globin synthesis in  $\alpha$  and  $\beta$ -Thalassemia.* Isr. J. Med. Sci. (1973); 9:1469.

RIEDER R.F., JAMES G.W. *Imbalance in  $\alpha$  and  $\beta$  globin synthesis associated with a hemoglobinopathy.* J. Clin. Invest. (1974); 54: 948.

RUND D., FILON D., RACHMILEWITZ E.A. *Molecular analysis of  $\beta$ -thalassemia in kurdish jews: Novel mutations and expression studies.* Blood (1989); 74: 821 A.

SAAG M.S., HAHN H.H., GIBBONS J. *Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 in vivo.* Nature (1988); 334: 440-444.

SAIKI R.K., CHANG C.A., LEVENSON C.H. *Diagnosis of sickle cell and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes.* N. Engl. J. Med. (1988); 319: 537-541.

SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORNG G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermoestable DNA polimerase.* Science (1988); 239: 487-491.

SAIKI R.K., SCHARF S., FAALONA F. *Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science (1985); 230: 1350-1354.

SAIKI R.K., WALSH P.S., LEVENSON C.H. *Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligonucleotide probes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1989); 86: 6230-6234.

SALLEE D., KAZAZIAN H.H. Jr. Multiplex analysis of  $\beta$ -globin restriction site polymorphisms by PCR: A method for rapid haplotyping and identity exclusion. Am. J. Hum. Genet. (1989); 45: 216 A.

SANS-SABRAFEN J. *Hematologia clinica*. Ed. Doyma. (1988).

SCHWARTZ E. Heterozygous  $\beta$ -thalassemia: Balanced globin synthesis in bone marrow cells. Science. (1970); 167: 1513.

SHIBATA D., ARNHEIM N., MARTIN J. Detection of human papilloma virus in parafilm-embedded tissue using the polymerase chain reaction. J. Exp. Med. (1988); 167: 225-230.

SINISCALCO M., BERNINI L., FILIPPI G., LATTE B., KHAN M., PIOMELLI P., RATAZZI M. Population genetics of haemoglobin variants, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with particular reference to the malaria hypothesis. Bull. WHO (1966); 34: 379-393.

SOUTHERN E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. (1975); 21: 639-649.

SPRITZ R.A., DE RIEL J.K., FORGET B.G., WEISSMAN S.M. Complete nucleotide sequence of the human  $\delta$ -globin gene. Cell (1980); 21: 638.

STAMATOYANNOPOULOS G., FESSAS P. *Thalassemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, sickling and malarian endemicity in Greece.* Br. Med. J. (1964); 1: 875-879.

SUKUMARAN P.K., NAKATSUJI T., GARDINER M.B., REESE A.L., GILMAN J.C., HUISMAN T.H.J. *Gamma thalassaemia resulting from the selection of a gamma-globin gene.* Nucl. Acids Res. (1983); 11: 4635).

TATE V.E., WOOD W.G., WEATEHRALL D.J. *The british form of hereditary persistence of fetal hemoglobin results from a single base mutation adjacent to an S1 hypersensitive site 5' to the gamma A globin gene.* Blood (1986); 68: 1389.

TEMIN H., MIZUTANIS K. *RNA dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus.* Nature (1970); 226: 1211-1215.

TENHUNEN R. *The enzymatic degradation of heme.* Semin. Hematol. (1972); 9: 19.

TESTA U., HINARD N., BEUZARD Y., TSAPIS A. *Excess  $\alpha$  chains are lost from  $\beta$ -thalassemic reticulocytes by proteolysis.* J. Lab. Clin. Med. (1981); 98: 352.

THEIN S.L., AL-HAKIM I., HOFFBRAND A.V. *Thalassaemia intermedia: a new molecular basis.* Br. J. Haematol. (1984); 56: 333.



THEIN S.L., HESKETH C., WEATHERALL D.J. *The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in UK asian indians: Applications to prenatal diagnosis.* Br. J. Haematol. (1988); 70: 225-231.

THEIN S.L., WAINSCOT J.S., OLD J.M., WALLACE R.B., WEATHERALL D.J. *The Ava II polymorphism is linked to the common mediterranean  $\beta^+$  thalassaemia mutation.* Br. J. Haematol. (1985); 61: 747.

THIERS V., NAKAJIMA E., KREMSDORF D. *Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects.* Lancet (1988); 2: 1273-1276.

TRECARTIN R.F., LIEBHABER S.A., CHANG J.C., LEE K.Y., KAN Y.W., FURBETTA M., ANGIUS A., CAO A.  *$\beta$ -thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation.* J. Clin. Invest. (1981); 68: 1012.

TREISMAN T., ORKIN S.H., MANIATIS T. *Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned  $\beta$ -thalassaemia genes.* Nature (1983); 302: 591-596.

VAYA A., CARRATALA A., MARTINEZ C., AZNAR J. *Haematological and clinical data in 200 cases of thalassemia trait in eastern Spain.* Nov. Rev. Fr. Hematol. (1983); 25: 369-373.

VILLEGAS A. *Análisis de un programa de microcitosis familiares atípicas.* Sangre (1990); 35: 102-113.

VILLEGAS A., CALERO F. *Síndromes talasémicos y hemoglobino-patías estructurales.* Medicine (1988); 16: 716-728.

VILLEGAS A., CALERO F., VICKERS M.A., AYYUB H., HIGGS D.R.  *$\alpha$ -thalassemia in two spanish families.* Eur. J. Haematol. (1990); 44: 109-114.

VILLEGAS A., GONZALEZ A., SAL DEL RIO E., PORRES J., SANCHEZ J., LOPEZ RUBIO M., MARTINEZ R. *Síndromes talasémicos en España: Estudios moleculares.*

VILLEGAS A., PEREZ CLAUSEL J., SANCHEZ J., SAL DEL RIO, E. *A new case of thalassemia intermedia: Interaction of a triplicated  $\alpha$ -globin locus and  $\beta$ -thalassemia trait.* Hemoglobin (1992); 16: 99-101.

VILLEGAS A., SAL DEL RIO E., MARTIN C., PEREZ CLAUSEL J., BARBOT J. *Interacción de triplicación de genes  $\alpha$  con  $\beta^0$  talasemia heterocigótica. Análisis de tres familias.* Sangre (1991); 36: supl. 2; 42 (R-119).

VILLEGAS A., SANCHEZ J., PORRES A., CALERO F. *Estudio epidemiológico y datos hemocitométricos y moleculares de la  $\alpha$ -talasemia.* Sangre (1991); 36: 139-143.

VILLEGAS A., SANCHEZ J., SAL DEL RIO E. *Alpha-talasemia in a Spanish population.* Hemoglobin (1992): 5.

VILLEGAS A., WILSON J.B., CHEN S.S., CALERO F., REINARES L., HUISMAN T.H.J., ESPINOS D. Haemoglobin Presbyterian [ $\beta$  108 (G 10) Asn-lys] in a spanish family. Acta Haematol. (1986); 76: 161-163.

WAINSCOT J.S., OLD J.M., THEIN S.L., WEATHERALL D.J. A new DNA polymorphism for prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia in mediterranean populations. Lancet II (1984): 1299.

WASI P., NA-NAKORN S., POOTRAKUL S. The  $\delta$  thalassaemias. Clin. Haematol. (1973); 24: 267.

WATSON J.D., TOOZE J., KRUTZ D. ADN recombinante. *Introducción a la ingeniería genética*. Ed. W.H. Freeman and Company. New York (1983). Ed. Labor. Barcelona (1986).

WEATHERALL D.J. *The thalassaemias: Molecular pathogenesis*. En "Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects". Ed. HF Bunn y BG Forget. WB Saunders Company. Philadelphia (1986): 224.

WEATHERALL D.J., CLEGG J.B. *The thalassaemia syndromes*. Blackwell Sc. Publications. Oxford (1981).

WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., WONG H.B. The hemoglobin constitution of infants with the hemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome. Br. J. Haematol. (1970); 18: 357.

WEBER J.L., MAY P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Hum. Genet. (1989); 44: 388-396.

WHITE R., LALLOVEL J.M. Cartografía cromosómica con marcadores de ADN. Investigación y Ciencia (1988).

WHITE J.M., LANG A., LORKIN P.A., LEHMANN H. Synthesis of haemoglobin Lepore. Nature (1972); 235: 208.

WISE P. The alpha thalassemia genes. J. Med. Assoc. Thai. (1970); 53: 677.

WINTER W.P., CASTRO O. Hemoglobinopathies and thalassemias. En Fairbanks V.F. Current Hematology and Oncology. Massachusetts. Year Book Medical Publishers Inc. (1986): 231-311.

WONG C., DOWLING C.E., SAIKI R.K. Characterization of  $\beta$ -thalassaemic mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature (1987); 330: 384-386.

WOOD W.G., OLDD J.M., ROBERTS A.V.S., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J. Human globin gene expression: Control of  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\delta\beta$  chain production. Cell (1978); 15: 437.

WRISCHNIK L.A., HIGUCHI R.G., STONEKING M., ERLICH H.A.,  
ARNHEIM N., WILSON A.C. *Length mutations in human mitochon-  
drial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified  
DNA.* Nucleic Acids Res. (1987); 15: 529-542.

YANKOVIC L., EFREMOV G.D., PETROV G. *Three novel mutations  
leading to  $\beta$ -thalassemia.* Blood (1989); 226a.

ZHANG J.Z., CAI S.P., HE X. *Molecular basis of  $\beta$ -thalasse-  
mia in South China: Strategy for DNA analysis.* Hum. Genet.  
(1988); 78: 37-40.

# VIII-INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Página	16	Subunidad de hemoglobina
Figura 2	Página	18	Estructura primaria de la cadena alfa
Figura 3	Página	20	Diagrama de la estructura terciaria de la cadena beta
Figura 4	Página	22	Reestructuración de las subunidades de hemoglobina
Figura 5	Página	23	Molécula completa de hemoglobina
Figura 6	Página	24	Hemoglobinas
Figura 7	Página	30	Estructura del ADN
Figura 8	Página	31	Código genético
Figura 9	Página	35	Mapeo cromosómico
Figura 10	Página	35	Localización cromosómica de los genes que codifican globinas
Figura 11	Página	38	Anatomía funcional del gen de globina beta
Figura 12	Página	39	Estructura de los genes alfa y beta
Figura 13	Página	41	Cómo se fabrica la hemoglobina
Figura 14	Página	42	Síntesis de globina

Figura 15	Página	43	Eliminación de intrones del ARNm de la beta globina
Figura 16	Página	44	Elongación
Figura 17	Página	47	Esquema de la biosíntesis del hemo
Figura 18	Página	78	Análisis de FLRP
Figura 19	Página	79	Representación de una cubeta de electroforesis
Figura 20	Página	81	Esquema de la técnica de Souther-Blotting
Figura 21	Página	82	Souther-Blotting
Figura 22	Página	84	Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa
Figura 23	Página	85	Esquema de Dot-Blot
Figura 24	Página	85	Visualización en geles de agarosa
Figura 25	Página	85	Análisis con enzimas de restricción
Figura 26	Página	89	Polimerización en cadena del ADN
Figura 27	Página	92	Electroforésis de hemoglobinas
Figura 28	Página	105	Amplificación por ARMS
Figura 29	Página	106	Amplificación por ARMS
Figura 30	Página	107	Amplificación por ARMS





## INDICE DE TABLAS

Tabla I	Página 56	Base molecular de la $\beta$ -Talasemia
Tabla II	Página 56	Base molecular de la $\alpha$ -Talasemia
Tabla III	Página 60	Clasificación de las formas mas frecuentes de $\beta$ -Talasemia
Tabla IV	Página 72	Clasificación clínica de hemoglobino- patías estructurales
Tabla V	Página 102	Resultados hemocitométricos
Tabla VI	Página 103	Resultados del Haplotipo
Tabla VII	Página 104	Resultados de amplificación por ARMS
Tabla VIII	Página 124	Mutaciones puntuales de $\beta$ -Talasemia
Tabla IX	Página 130	Mutaciones mediterraneas mas frecuen- tes en distintos países
Tabla X	Página 131	Mutaciones en diversos puntos de España