

Diagnóstico molecular de mutaciones beta talasémicas, genotipos complejos

Liliana C. Rossetti, Karen G. Scheps, Amanda Binaghi,
María S. Abreu, Mariana T. Mansilla, Viviana Varela

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y
Bioquímica Universidad de Buenos Aires.

Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Junín 956 – 1113 – Buenos Aires, Argentina. TEL/FAX: 54-11-4964-8296.

Correspondencia: Dra. Viviana Varela. Cátedra de Genética y Biología Molecular.

Facultad de Farmacia y Bioquímica – Universidad de Buenos Aires.

Junín 956 – 1113 – Buenos Aires, Argentina. E-mail: vvarela@ffyba.uba.ar



ARTÍCULO
ORIGINAL

Trabajo presentado en Presentación Plenaria del
Congreso Argentino del 2009 de Hematología

Fecha de recepción: 7/10/09

Fecha de aprobación: 29/10/09

HEMATOLOGIA, Vol. 14 N° 2: 41-47

Mayo-Agosto, 2010

RESUMEN

La β -talasemia es una anemia hereditaria de origen genético frecuente en nuestra población. En pacientes con fenotipos hematológicos no clásicos se observan asociaciones con otras alteraciones en genes de α o β -globinas.

Objetivos: actualizar la distribución de mutaciones en el gen de β -globina caracterizadas en nuestro laboratorio e informar asociaciones con otras alteraciones genéticas.

Materiales y métodos: se analizó el ADN de 381 familias (483 pacientes) con diagnóstico de talasemia menor, $\delta\beta$ -talasemia, mayor o intermedia por PCR y técnicas complementarias.

Resultados: se caracterizaron 14 mutaciones β -talasémicas en familias portadoras, las más frecuentemente encontradas fueron: CD 39(C>T): 42,2%, IVS-I-110(G>A): 22,5%, IVS-I-1(G>A): 9,4%, e IVS-I-6(T>C): 7,9%. En los pacientes con talasemia mayor se identificó el 96,7% de los alelos responsables, sólo se observaron genotipos homocigotas con las 2 mutaciones más frecuentes. El 70% de las familias con fenotipo $\delta\beta$ -talasemia presentó la variante $\delta\beta$ -Siciliana. En el grupo con talasemia intermedia, 2 familias resultaron homocigotas para IVS-I-6(T>C), 3 presentaron un alelo $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ heterocigota asociado a una mutación β -talasémica. Diez pacientes del grupo de portadores talasémicos presentaron asociaciones de mutaciones β -talasémicas con Hb S, Hb C, $\delta\beta$ -talasemia y con la delección $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$.

Conclusiones: el diagnóstico molecular de mutaciones en el gen de β -globina completa el diagnóstico hematológico y permite un asesoramiento genético adecuado.

Palabras clave: Beta-talasemia, mutaciones genéticas, biología molecular, genotipos complejos.

INTRODUCCIÓN

La β -talasemia es una anemia hemolítica intracorpuscular de origen genético, frecuente en Argentina, que se caracteriza por la incapacidad para sintetizar una cantidad adecuada de cadenas de β -globina debido a la presencia de mutaciones en el cluster de β -globina.

Estudios hematológicos previos mostraron una incidencia de 0,8% de portadores talasémicos entre 4.000 donantes de sangre del Gran Buenos Aires¹.

La herencia de un alelo β -talasémico determina un individuo portador (genotipo heterocigota) con *talasemia menor*. La herencia de los 2 alelos mutados (genotipo homocigota mutado o doble heterocigota) produce una *talasemia mayor*; un tercer grupo, corresponde a la *talasemia intermedia*, con manifestaciones clínicas y hematológicas intermedias, con respecto a los 2 primeros grupos, en general debidas a genotipos complejos de asociación de distintas mutaciones. Algunos pacientes no encuadran perfectamente en estos 3 grupos, presentan fenotipos hematológicos no clásicos, por asociación con alteraciones genéticas en otros genes involucrados en la síntesis de cadenas de α o β -globinas.

Actualmente, hay descriptas 239 variantes β -talasémicas en el gen que codifica para β -globina, reportadas en la base de datos de mutaciones "*Hb Var database*"², estas determinan la disminución parcial

de la síntesis de β -globina (mutaciones β^+) y o su supresión (mutaciones β^0).

La mayoría son mutaciones puntuales³; existen también deleciones de gran tamaño, donde el defecto molecular involucra la pérdida de los genes que codifican para δ y β -globina (alelos $\delta\beta$ -talasémicos)⁴.

El espectro de mutaciones difiere entre los grupos étnicos de cada población, existiendo un número reducido de mutaciones productoras de la mayoría de los alelos β -talasémicos y un número variable de mutaciones esporádicas^{5,6}.

Esta alteración es frecuente en países de la Cuenca del Mediterráneo. En Argentina, la colonización española fue la principal responsable de la introducción de los genes β -talasémicos. Además, las sucesivas olas de inmigración durante los siglos XIX y XX de la cuenca del Mediterráneo, particularmente de Italia y España, también contribuyeron de manera importante⁷.

En nuestro país, las mutaciones β -talasémicas más frecuentes se ubican en las posiciones 1, 6 y 110 en el primer intrón (IVS-I-1 (G>A), IVS-I-6 (T>C) e IVS-I-110 (G>A)) y en el codón 39 del segundo exón CD 39 (C>T)⁸, distribución similar a la observada en la Cuenca del Mediterráneo.

Los objetivos planteados en el trabajo fueron presentar una actualización de las mutaciones caracterizadas en nuestro laboratorio que afectan el gen de β -globina (HBB) por técnicas de biología molecular y reportar asociaciones con otras alteraciones genéticas en pacientes con fenotipos hematológicos no clásicos, esperando que estos trabajos permitan simplificar el diagnóstico y sirvan como herramienta para el consejo genético y futura planificación familiar.

Considerando que los pacientes fueron elegidos al azar y no estaban relacionados, se espera que esta distribución refleje de manera objetiva la frecuencia de las mutaciones β -talasémicas en la población argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó el ADN genómico de 483 pacientes correspondientes a 381 familias, genéticamente no relacionadas, con diagnóstico de: talasemia menor 422 (329 familias), $\delta\beta$ -talasemia 20 (13 familias), talasemia mayor 30 (30 familias) y talasemia intermedia 11 (9 familias). Los pacientes provinieron en su mayoría de la Capital Federal y Gran Buenos Aires, y en menor proporción del interior del país, y fueron evaluados previamente por reconocidos especialistas en hematología de nuestro medio.

Desde 1994, se comenzó la tipificación molecular de alelos β -talasémicos en nuestro laboratorio; la estrategia de diagnóstico fue cambiando a lo largo del

tiempo en función del desarrollo y disponibilidad de nuevas metodologías.

En este trabajo, se analizaron la presencia de alelos β -talasémicos, $\delta\beta$ -talasémicos, hemoglobinopatías estructurales y la presencia de deleciones e inserciones en el cluster de α -globina.

La detección de mutaciones puntuales en el gen de β -globina se basó en la amplificación por PCR del ADN genómico (obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica) y *primers* descriptos previamente⁹ o diseñados posteriormente mediante el uso de herramientas bioinformáticas (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/Default.aspx>) con el fin de optimizar las regiones analizadas (HBB1-F: 5'-CTAAGCCAGTGCCAGAAGAG-3'; HBB1-R: 5'-CCATCACTAAAGGCACCGAG-3'; HBB2-F: 5'-CCTGATGCTGTTATGGGCAA-3'; HBB2-R: 5'-ACGATCCTGAGACTTCCACA-3'; HBB3-F: 5'-GCCTCTTGCACCATTCT-3'; HBB3-R: 5'-CCCAAGGTTTGAAGTAGC-3'). Existen al menos 10 variantes descriptas asociadas a fenotipos de $\delta\beta$ -talasemia, se investigó la presencia de la variante Siciliana, por estar reportada en la literatura como la forma más frecuente en la Cuenca del Mediterráneo⁴. En el cluster de α -globina, se estudió la presencia de la deleción $-\alpha^{3,7}$ y el alelo $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ en busca de dilucidar la base molecular de talasemias intermedias o fenotipos no clásicos.

Las mutaciones tipificadas se resolvieron por distintos sistemas diagnósticos y la detección de algunas mutaciones se validó por más de una técnica (Tabla I).

La información sobre las mutaciones estudiadas se obtuvo a partir de la base de datos presente en <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html> y la secuencia obtenida de GenBank HBB: NC_000011.9 se usó como referencia de secuencia normal.

RESULTADOS

Se estudiaron 422 muestras de ADN genómico de pacientes con diagnóstico de talasemia menor (genotipo heterocigota); la distribución de frecuencias de alelos β -talasémicos se confeccionó a partir de un subgrupo de 329 individuos genéticamente no relacionados (Tabla II). Las 2 mutaciones más frecuentes fueron IVS-I-110 (G>A) y CD 39 (C>T), el resto de las mutaciones presentó frecuencias inferiores al 10%.

Las mutaciones CD 8/9 (+G), CD 30 (G>C), IVS-I-5 (G>C) y CD 44 (-C), se identificaron a partir de la digestión enzimática de productos de PCR, SSCP y secuenciación de los productos que presentaron movilidad electroforética anómala; las mutaciones -56 (G>C) e IVS-I-2 (T>A), descriptas por primera vez en Argentina, se identificaron por amplificación por

TABLA I.- Mutaciones informadas en el trabajo y estrategias de detección utilizadas en la tipificación.

Hb Var ID: número de identificación de la variante en base de datos; HGVS: nomenclatura recomendada por la *Human Genome Variation Society*; Hb V: hemoglobinopatía estructural. (*): fenotipo asociado, no determinado (β^0 o β^+). PCR-RFLP: amplificación por PCR y digestión enzimática; PCR-ASO: amplificación por PCR e hibridación con sondas de oligonucleótidos alelo-específicas marcadas con (γ - ^{32}P)-ATP; SSCP: (*Single Strand Conformation Polymorphism*), secuenciación: manual (fmol® DNA Sequencing System) y/o automática.

MUTACIÓN	Nomenclatura HGVS	Tipo	HbVar ID	Estrategia de diagnóstico
-87 (C>G)	HBB:c.-137C>G	β^+	758	PCR-RFLP
-56 (G>C)	HBB:c.-137C>G	(*)	2601	PCR-secuenciación
CD 6 (-A)	HBB:c.20delA	β^0	784	PCR-RFLP
CD 8/9 (+G)	HBB:c.27_28insG	β^0	786	PCR-SSCP-RFLP > secuenciación
CD 30 (G>C)	HBB:c.92G>C	β^0	290	PCR-SSCP-RFLP > secuenciación
IVS-I-1 (G>A)	HBB:c.92+1G>A	β^0	818	PCR-ASO / secuenciación
IVS-I-2 (T>A)	HBB:c.92+2T>A	β^0	819	PCR-secuenciación
IVS-I-5 (G>C)	HBB:c.92+5G>C	β^+	824	PCR-SSCP-RFLP > secuenciación
IVS-I-6 (T>C)	HBB:c.92+6T>C	β^+	826	PCR-ASO
IVS-I-110 (G>A)	HBB:c.93-21G>A	β^+	827	PCR-ASO / secuenciación
CD 39 (C>T)	HBB:c.118C>T	β^0	845	PCR-ASO / secuenciación
CD 44 (-C)	HBB:c.135delC	β^0	854	PCR-SSCP-RFLP > secuenciación
IVS-II-1 (G>A)	HBB:c.315+1G>A	β^0	884	PCR-ASO / PCR-RFLP
IVS-II-745 (C>G)	HBB:c.316-106C>G	β^+	891	PCR-ASO / PCR-RFLP
$\delta\beta$ -talasemia v. S.	NG_000007.3:g.64336_77738del13403	$\delta\beta^0$	1035	PCR-GAP
Hb S	HBB:c.20A>T	Hb V	226	PCR-ASO / PCR-RFLP
Hb C	HBB:c.19G>A	Hb V	227	PCR-ASO
deleción - $\alpha^{3,7}$	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	α^+	1076	Southern Blot / PCR-GAP
$\alpha\alpha^{\text{anti3,7}}$		-	-	Southern Blot / PCR-GAP

TABLA II.- Distribución de frecuencias en portadores genéticamente no relacionados. Posición: en HBB; (*): Hb Monroe.

MUTACIÓN	posición	Nº pac.	Nº flías.	(%) flías.
-87 (C>G)	reg. promotora	3	3	0,9
-56 (G>C)	reg. promotora	1	1	0,3
CD 6 (-A)	ex.1	6	6	1,8
CD 8/9 (+G)	ex.1	2	1	0,3
CD 30 (G>C)*	ex.1	2	2	0,6
IVS-I-1 (G>A)	int. 1	40	31	9,4
IVS-I-2 (T>A)	int. 1	1	1	0,3
IVS-I-5 (G>C)	int. 1	2	2	0,6
IVS-I-6 (T>C)	int. 1	31	26	7,9
IVS-I-110 (G>A)	int. 1	97	74	22,5
CD 39 (C>T)	ex.2	186	139	42,2
CD 44 (-C)	ex.2	2	1	0,3
IVS-II-1 (G>A)	int.2	17	11	3,3
IVS-II-745 (C>G)	int.2	12	12	3,6
indeterminados	-	20	19	5,8
total	-	422	329	100,0

PCR y secuenciación directa, a partir de los nuevos *primers* diseñados.

El cambio G>C en la posición -56 de la región promotora del gen HBB, está descrito en la base de datos de mutaciones (Hb Var ID: 2601), donde consta que no puede ser clasificado claramente como β^0 o β^+ . Debido a su posición en el gen, el cambio afecta la transcripción del gen HBB, por lo que se puede asumir que es β^+ .

La mutación CD 30 (G>C), también denominada IVS-I (-1) o Hb Monroe (beta 30(B12) Arg>Thr), es una hemoglobinopatía talasémica; el cambio en la última base del primer exón, determina un cambio de sentido del codón 30 (arginina por treonina) pero esta posición está implicada en el *splicing* del intrón 1, por lo que predomina el efecto cuantitativo de menor síntesis de cadena de β -globina sobre el de la variante estructural anómala.

Los genotipos y distribución de frecuencias de mutaciones del grupo de los pacientes con talasemia mayor se informa en la Tabla III; se identificaron 58 de los 60 alelos posiblemente implicados (96,7%), sólo las 2 mutaciones más frecuentes, IVS-I-110 (G>A) y CD

TABLA III.- Distribución de genotipos y frecuencias de mutaciones en 30 pacientes con talasemia mayor, genéticamente no relacionados. Los cambios de base de cada mutación están descriptos en la Tabla I. En una de las muestras no se pudo determinar la segunda mutación por falta de muestra.

Genotipos	N° flías.	Mutación	N° alelos	%
IVS-I-110 / IVS-I-110	4	- 87	2	3,3
CD 39 / CD39	5	CD 6	1	1,7
(-87) (C>G) / CD 39	1	IVS-I-1	7	11,7
IVS-I-1 / IVS-I-6	3	IVS-I-5	2	3,3
IVS-I-1 / IVS-I-110	1	IVS-I-6	5	8,3
IVS-I-1 / CD 39	3	IVS-I-110	16	26,7
IVS-I-5 / IVS-I-6	1	CD 39	22	36,7
IVS-I-6 / CD 39	1	IVS-II-1	2	3,3
IVS-I-110 / CD 39	4	IVS-II-745	1	1,7
IVS-I-110 / IVS-II-1	1	indeterminado	2	3,3
CD 39 / IVS-II-1	1	TOTAL	60	100,0
(-87) (C>G) / IVS-I-110	1			
IVS-I-110 / indeterminado	1			
IVS-I-5 / IVS-II-745	1			
CD 39 / indeterminado	1			
CD 6 (-A) / CD 39	1			
TOTAL	30			

39 (C>T), se observaron en genotipos homocigotas, los restantes fueron dobles heterocigota, según es lógico esperar para mutaciones menos frecuentes en patologías polialélicas como ésta.

En 20 pacientes pertenecientes a 13 familias, el 70% (9 familias) con fenotipo $\delta\beta$ -talasemia presentó la variante Siciliana en estado heterocigota, por lo que, esta variante es la más frecuente en nuestro medio.

En el grupo con talasemia intermedia 2 familias resultaron homocigotas para IVS-I-6 (T>C), en 3 familias se observó la presencia de un alelo $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ en estado heterocigota asociado a una mutación β -talasémica. Los datos encontrados se resumen en la Tabla IV.

En 3 familias donde se había identificado la mutación CD 39 en estado heterocigota y no se evidenciaron alteraciones en el cluster de α -globina, se secuenció la región promotora, desde la posición -148, la región 5'-UTR, exón 1, intrón 1 y parte del exón 2, del gen HBB en busca de la presencia de alguna mutación de tipo β^+ que pudiera justificar el cuadro de talasemia intermedia, pero no se encontraron cambios respecto a la secuencia de referencia.

Diez pacientes del grupo de portadores talasémicos (genotipos heterocigotas) presentaban fenotipos no clásicos, el diagnóstico molecular permitió detectar asociaciones de mutaciones β -talasémicas con Hb S heterocigota (6 casos) y, Hb C heterocigota (2 casos); $\delta\beta$ -talasemia variante Siciliana (1 caso) y asociación con la delección $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ (1 caso). En la Tabla V se muestran los genotipos observados.

TABLA IV.- Familias con fenotipo de talasemia intermedia. Los cambios de base de cada mutación están descriptos en la Tabla I. n=: número de pacientes tipificados en la familia; +/-: genotipo heterocigota, 8 mut neg: corresponden a las mutaciones más frecuentes analizadas por diagnóstico directo. (*) Familias en las que secuenció desde la posición -148 de la región promotora hasta el exón 2 de HBB, sin encontrar cambios.

Flías.	n	1° alelo HBB	2° alelo HBB	cluster alfa
1	1	IVS-I-6	IVS-I-6	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
2	2	IVS-I-6	IVS-I-6	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
3	1	IVS-II-745 +/-	-	$\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}/\alpha\alpha$
4	1	IVS-II-745 +/-	-	$\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}/\alpha\alpha$
5	1	8 mut neg	-	$\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}/\alpha\alpha$
6	2	CD 39 +/-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
7	1	CD 39 +/-	(*)	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
8	1	CD 39 +/-	(*)	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
9	1	CD 39 +/-	(*)	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

Los desórdenes hereditarios de la hemoglobina, son las enfermedades genéticas más comunes y una de las mayores causas de problemas de salud en muchas partes del mundo. El diagnóstico molecular de las mutaciones causales permite llegar a determinar el defecto primario.

TABLA V.- Pacientes con genotipos complejos.
n=: número de pacientes tipificados en la familia.

Nº flías.	n	Mutación β -talasémica	2º Mutación
1	1	CD 44 (-C)	Hb S
2	3	IVS-I-110 (G>A)	Hb S
3	1	IVS-I-6 (T>C)	Hb S
4	1	IVS-I-1 (G>A)	Hb C
5	1	CD 39 (C>T)	Hb C
6	1	$\delta\beta$ -tal. variante Siciliana	Hb S
7	1	IVS-I-6 (T>C)	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$

Esta patología es frecuente en países de la Cuenca del Mediterráneo y su existencia en América precolumbina no fue documentada. La población β -talasémica argentina, presenta ciertas particularidades que la separan de la mayor parte de Latinoamérica. En la Argentina ocurrieron eventos importantes de inmigración durante cinco décadas, desde el final del siglo XIX y el comienzo del XX hasta el final de la Segunda Guerra Mundial. La mayoría de los inmigrantes vinieron de Europa, en particular de Italia y España y, en menor medida de los países árabes⁷. En los casos en que se estableció el origen étnico de los pacientes, la ascendencia italiana presentó la mayor prevalencia, seguida de la española y en tercer lugar, por ascendencia de los países árabes, principalmente de Líbano y Siria⁹.

Al presente hay descritas 239 mutaciones en el gen β -globina, asociadas a fenotipos β -talasémicos, la mayoría de tipo puntual. En base a esta información, en el comienzo del trabajo se desarrollaron métodos de tipificación directa de las mutaciones más frecuentes en países del Mediterráneo¹⁰. Posteriormente se implementaron técnicas de *screening* molecular por SSCP y posterior secuenciación de los productos de PCR que presentaban movilidad electroforética anómala; recientemente, se diseñaron nuevos *primers* a fin de poder realizar la identificación de mutaciones por amplificación por PCR y secuenciación directa de los productos obtenidos.

Los objetivos planteados en el trabajo fueron presentar una actualización de las mutaciones caracterizadas en nuestro laboratorio en el gen de β -globina por técnicas de biología molecular e informar asociaciones con otras alteraciones genéticas en pacientes con fenotipos hematológicos no clásicos, esperando que estos trabajos permitan simplificar el diagnóstico y sirvan como herramienta para el consejo genético y futura planificación familiar.

Se analizó el ADN genómico de 483 pacientes correspondientes a 381 familias con diagnóstico de: talasemia menor 422 (329 familias), $\delta\beta$ -talasemia 20

(13 familias), mayor 30 (30 familias) o intermedia 11 (9 familias).

En el grupo de portadores, la caracterización de 310 de las 329 (94,2%) mutaciones talasémicas en las familias genéticamente no relacionadas, confirmó que la CD 39 (C>T) (42,2%) y IVS-I-110 (G>A) (22,5%) son las que presentan mayor recurrencia, como fue informado en trabajos previos de nuestro laboratorio¹¹; el resto de las mutaciones presentaron frecuencias inferiores al 10%. Las mutaciones en la región promotora y región 3' del gen, son poco frecuentes. Cuatro de las mutaciones más frecuentes en nuestro estudio (CD 39 (C>T), IVS-I-110 (G>A), IVS-I-1 (G>A) e IVS-I-6 (T>C)) corresponden al 82% de los alelos. Estos datos coinciden con los descriptos para los países de la Cuenca del Mediterráneo que presentan frecuencias del 77 al 96%¹². Las frecuencias de CD 6 (-A) e IVS-II-745 (C>G) varían en los distintos grupos poblacionales.

Estrategias de *screening* por SSCP y secuenciación, o PCR y secuenciación, permitieron tipificar seis mutaciones puntuales, descriptas por primera vez en Argentina: -56 (G>C), IVS-I-2 (T>A) y CD 44 (-C) -1 portador cada una-, CD 30 (G>C) (Hb Monroe) -2 portadores-, IVS-I-5 (G>C) -en 2 pacientes con talasemia mayor y uno de sus padres-, y CD 8/9 (+G) -en 1 portador y su padre-.

En el grupo de talasemia mayor la distribución de frecuencias de alelos fue similar, nuevamente las mutaciones, CD 39 (C>T) (36,7%) y IVS-I-110 (G>A) (26,7%), fueron las únicas mutaciones que se observaron como genotipos homocigotas, el 70% de los pacientes presentó genotipo doble heterocigota, según lo esperado para patologías polialélicas.

Las talasemias intermedias se caracterizan por presentar un fenotipo más severo que el de un portador, pero más leve que una talasemia mayor, debido a un mayor desbalance entre la cantidad de cadenas de α y β -globinas respecto a un portador. Entre las causas descriptas¹³, está la asociación de 2 mutaciones β^+ leves, como ejemplo, el genotipo IVS-I-6 homocigota, que se observó en 3 pacientes (2 familias) del grupo en estudio. Es interesante destacar que un genotipo IVS-I-5 / IVS-I-6 está asociado a una talasemia mayor, mientras que un genotipo IVS-I-6 / IVS-I-6 se asocia a talasemia intermedia, esto se explica por la mayor participación de la base de la posición 5 del intrón en la formación del *spliceosoma*, durante el proceso de maduración del transcripto primario.

Otra causa es la asociación de una mutación β^0 con un alelo $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$; este alelo se origina en el mismo evento de *crossing-over* desigual que la delección $-\alpha^{3,7}$, la presencia de 5 copias de genes α (genotipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) incrementa el desbalance de cadenas α/β . En el grupo analizado hasta el momento sólo se rastreó

la existencia de las mutaciones más frecuentes. En tres pacientes con genotipos heterocigotas para la mutación CD 39 (C>T), no se observó la asociación con alelos $\alpha\alpha^{\text{anti3,7}}$, ni la coexistencia de mutaciones β^+ desde la región promotora hasta el exón 2 del gen HBB. Recientemente se informaron casos de talasemia intermedia donde el defecto molecular es la asociación de la mutación CD 39 (C>T) heterocigota con una duplicación completa del cluster de α -globina, incluido el elemento HS-40 de la región regulatoria, que pudieron detectarse mediante estudios de cuantificación génica^{14, 15}.

Se han descrito también alteraciones moleculares que explican por qué pueden observarse diferencias en la severidad, en el fenotipo de talasemia intermedia o mayor. Por ejemplo, la herencia conjunta de α -talasemia, o la persistencia de Hb F (Hb Fetal), disminuye el desbalance α/β ; recientemente se ha observado que el alelo C del SNP (*single nucleotide polymorphism*) rs-11886868 del gen BCL11A y el alelo G del SNP rs9389268 en el gen HBS1L-MYB fueron significativamente más frecuentes en pacientes con talasemia intermedia, ambos genes implicados en la regulación de la expresión de la Hb F¹⁶.

En la población estudiada también se observaron 10 pacientes que mostraron genotipos complejos por asociación de mutaciones β -talasémicas con hemoglobinopatías estructurales o con mutaciones α -talasémicas, las asociaciones en fenotipos no clásicos, están también documentadas en la bibliografía¹⁷.

Los datos presentados aquí, actualizan la frecuencia de las diversas alteraciones moleculares presentes en los diferentes fenotipos β -talasémicos analizados en nuestro país, y permiten concluir que el diagnóstico molecular es una herramienta válida para identificar el defecto primario, y así poder realizar un asesoramiento genético adecuado, diagnóstico de portadores y posterior diagnóstico prenatal o preimplantatorio, que ya se está realizando con éxito en nuestro medio. Además, la versatilidad de estas técnicas, permiten adaptar el diagnóstico al número de muestras o complejidad de cada laboratorio¹⁸. También el diagnóstico molecular es una herramienta ideal para resolver fenotipos no clásicos frente a los cuales se deben analizar la presencia de otras alteraciones en otros genes presentes tanto en el cluster de β o de α -globina.

A pesar de haber transcurrido más de 85 años luego de la primer descripción, las enfermedades que afectan la síntesis normal de la hemoglobina, representan una de las alteraciones más importantes en cuanto a su morbilidad y mortalidad asociada con alteraciones genéticas, por eso puede considerarse este trabajo, como un aporte importante para nuestro medio, ya que al menos en un futuro previsible cer-

cano, continuará siendo el único intento realista de reducir la incidencia de estas enfermedades.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó, en parte, con el financiamiento de proyectos de investigación de la Universidad de Buenos Aires. Agradecemos la confianza que los profesionales hematólogos depositaron en nuestro grupo de trabajo, con cuya participación este proyecto pudo desarrollarse.

ABSTRACT

Molecular diagnosis of beta thalassemic mutations, complex genotypes

β -thalassemia is a common hereditary disorder in Argentina. Non-classic hematologic phenotype is observed in some patients due to association with different alterations in the α and β -globin genes.

Objectives: The aim of this study was to update the frequency of β -thalassemic mutations by using molecular biology techniques and to characterize association with other alterations in our laboratory.

Materials and methods: A total of 381 families (483 subjects) with β -thalassemia mutations, including minor, major, $\delta\beta$ and intermediate thalassemia diagnosis were studied by PCR and complementary techniques.

Results: A total of 14 different mutations were characterized. The most frequently encountered mutations were: CD 39(C>T): 42.2%, IVS-I-110(G>A): 22.5%, IVS-I-1(G>A): 9.4%, e IVS-I-6(T>C): 7.9%. In patients with thalassemia major 96.7% of the alleles were identified, homozygous genotype was found only with the 2 more frequent mutations. Sicilian $\delta\beta$ -thalassemia was observed in 70% of the $\delta\beta$ -thalassemia phenotype patients.

In the intermediate thalassemia group 2 families resulted homozygous for IVS-I-6(T>C), 3 presented a heterozygous allele $\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3,7}}$ associated with a β -thalassemic mutation. In the carriers thalassemic group, 10 patients presented β -thalassemic mutations associated with Hb S, Hb C, $\delta\beta$ -thalassemia, and $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ deletion.

Conclusions: the molecular biology diagnostic of mutations in the β -globin gene allows a complete hematologic characterization and a correct genetic counseling.

Key words: Beta-thalassemia, gene mutations, molecular biology, complex genotypes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu de Miani MS, Peñalver JA. Incidencia de portadores β -talasémicos y de pacientes de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6FD) en el área del Gran Buenos Aires. **Sangre** 1983; 28: 537-541.
2. Patrinos GP, Giardine B, Riemer C y col. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. **Nucl Acids Res** 2004; 32 Database issue: D537-541. <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>
3. Kazazian HHJr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Semin Hematol** 1990; 27: 209-228.
4. Viniou N, Georgiou J, Loutradi A y col. Molecular basis and haplotype analysis of delta, beta-thalassemic chromosomes in Greece. **Acta Haematol** 1994; 92 (2): 83-87.

5. Kazazian HHJr, and Bohem CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of β thalassaemia. **Blood** 1988; 72: 1107-16.
6. Varela V, Rossetti LC, Targovnik HM. Genética Molecular de Hemoglobinopatías y Talasemias: PROAMI Ed. Médica Panamericana, 1999; Cuarto Ciclo, fascículo 2: 11-26.
7. Abreu MS. 1994. El gen β -talasémico en nuestro país. *La β -talasemia en nuestro medio. Su análisis a través de la experiencia reunida en el Servicio de hematología del Hospital de Niños de Buenos Aires*, Tesis de doctorado en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
8. Rossetti LC, Targovnik HM, Varela V. The molecular basis of β -thalassemia in Argentina. Influence of the immigration pattern from the Mediterranean Basin. **Haematologica** 2004; 89 (6): 746-747.
9. Rossetti LC. 2002. Genética Molecular de las Hemoglobinopatías y Talasemias en Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
10. Varela V, Abreu S, Rossetti LC y col. Mutaciones β -talasémicas más frecuentes en la población argentina. **Sangre** 1996; 41 (2): 137-140.
11. Varela V, Rossetti LC, Binaghi A y col. Genética molecular de las talasemias en Argentina. **Sangre** 1999; 44 (3): 210-215.
12. Huisman THJ, Carver MFH and Baysal E. A Syllabus of Thalassaemia Mutations (1997). The Sickle Cell Anemia Foundation. Augusta, GA, USA; 1997.
13. Beris P, Deutsch S, Darbellay R. Molecular pathology of thalassaemia intermedia. **Hematol J** 2004; 5 Suppl 3: S199-204.
14. Hartevelde CL, Refaldi C, Cassinerio E y col. Segmental duplications involving the α -globin gene cluster are causing β -thalassaemia intermedia phenotypes in β -thalassaemia heterozygous patients. **Blood Cells Mol Dis** 2008; 40: 312-316.
15. Sollaino MC, Paglietti ME, Perseu L y col. Association of alpha globin gene quadruplication and heterozygous beta thalassaemia in patients with thalassaemia intermedia. **Haematologica** 2009; 94 (10): 1445-1448.
16. Galanello R, Sanna S, Perseu L y col. Amelioration of Sardinian beta-zero thalassaemia by genetic modifiers. **Blood** 2009; 114 (18): 3935-3937.
17. Giambona A, Passarello C, Vinciguerra M, y col. Significance of borderline hemoglobin A2 values in an Italian population with a high prevalence of beta-thalassaemia. **Haematologica** 2008; Sep; 93 (9): 1380-1384.
18. Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN. Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. **Hum Mutat** 2005; 26 (5): 399-412.