

# Síndromes talasémicos: bases moleculares

Gustavo E. Chiappe, Beatriz Iparraguirre,  
Beatriz Erramouspe, Sandra Pennesi

Hospital Francés, Buenos Aires.  
E-mail: gustavochiappe@fibertel.com.ar

Fecha de recepción: 12/11/03  
Fecha de aceptación: 13/12/03



EDITORIAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 8 N° 1: 1-7  
Enero-Abril, 2004

## RESUMEN

Las hemoglobinopatías se deben a una gran variedad de defectos de los genes de globina. Mientras que las hemoglobinopatías estructurales y los síndromes de sobreexpresión son determinados por unos pocos mecanismos fisiopatológicos (mutaciones sin sentido, y mutaciones en la región promotora o deleciones / inserciones respectivamente), los síndromes talasémicos (y las hemoglobinopatías talasémicas) tienen causas genéticas muy diversas, con consecuencias fisiopatológicas a veces complejas. El propósito de esta revisión es proveer una introducción para la mejor comprensión de las bases moleculares de esta patología hereditaria frecuente aunque subdiagnosticada. Médicos y biólogos deben ser concientes de la importancia de este conocimiento para el diagnóstico molecular correcto en casos de estudios prenatales o preimplante realizados con el fin de evitar el nacimiento de niños con talasemia mayor.

**Palabras clave:** talasemia, hemoglobinopatía, bases moleculares, ADN.

## HEMOGLOBINAS NORMALES: ESTRUCTURA

La hemoglobina (Hb), la proteína eritrocitaria más abundante, tiene como función el transporte de O<sub>2</sub> e H<sup>+</sup>. Su conformación es de un heterodímero doble, y cada subunidad consiste en un grupo prostético (el hem= protoporfirina IX + Fe<sup>2+</sup>), alojado en la cavidad de una cadena proteica de globina. La cadena de globina puede ser de tipo  $\alpha$  ( $\zeta$  -  $\alpha$ ) o de tipo no  $\alpha$  ( $\epsilon$  -  $\zeta\gamma$  -  $\alpha\gamma$  -  $\delta$  -  $\beta$ ). De la combinación de dos subunidades de tipo  $\alpha$  con dos subunidades de tipo no  $\alpha$  surgen las distintas variantes normales de Hb, cuya expresión varía a lo largo de la vida (Fig 1):

Variante Hb	Fórmula	Expresión en etapa
Gower 1	$\zeta_2 \epsilon_2$	} embrionaria
Portland	$\zeta_2 \gamma_2$	
Gower II	$\alpha_2 \epsilon_2$	
F	$\alpha_2 \gamma_2$	fetal - adulta (< 2 %)
A2	$\alpha_2 \delta_2$	adulta (< 3.5 %)
A	$\alpha_2 \beta_2$	adulta (> 95 %)

## Hemoglobinas normales: variantes

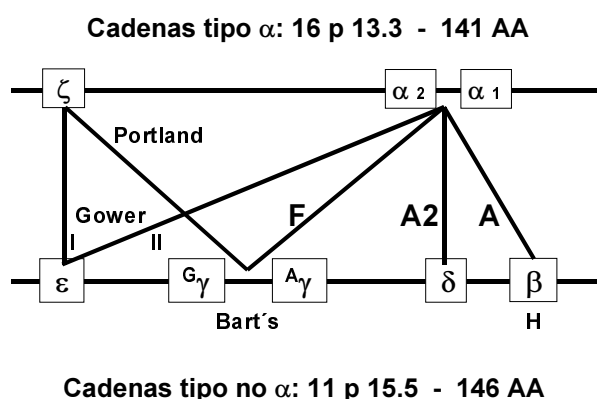


Figura 1: Variantes normales de hemoglobina. Todas las Hbs normales son heterodímeros dobles compuestos por dos cadenas de tipo  $\alpha$  y dos de tipo no  $\alpha$ . En  $\alpha$  talasemia se forman homotetrámeros patológicos: Hb Bart's ( $\gamma_4$ ) y Hb H ( $\beta_4$ ).

## HEMOGLOBINAS NORMALES: SÍNTESIS

Mientras el hem se sintetiza a nivel mitocondrial  $\rightarrow$  citoplasmático  $\rightarrow$  mitocondrial, la globina se traduce a nivel ribosómico a partir de ARNm transcrito de genes localizados en 16p13.3 (genes tipo  $\alpha$ :  $\zeta$  -  $\alpha_2$  -  $\alpha_1$ ) y en 11p15.5 (genes tipo no  $\alpha$ :  $\epsilon$  -  $\zeta\gamma$  -  $\alpha\gamma$  -  $\delta$  -  $\beta$ ) (Fig. 2). A 5' de los locus de genes de globina se encuentra la región de control del locus (LCR) que regula la expresión de los genes de globina en diferentes etapas de la vida. La estructura de los genes de globina es relativamente sencilla (Fig. 3): 3 exones (I, II y III) y 2 intrones (IVS-I y IVS-II), flanqueados por dos regiones no traducibles, una a 5', otra a 3'. A 5' del gen la región promotora se extiende unos 100 nucleótidos y contiene secuencias a las que se acoplan distintos factores de transcripción.

El mecanismo de expresión de los genes de globina es idéntico al de cualquier otro gen (Fig 4):  
- transcripción del ADN a ARN mensajero (ARNm) inmaduro.

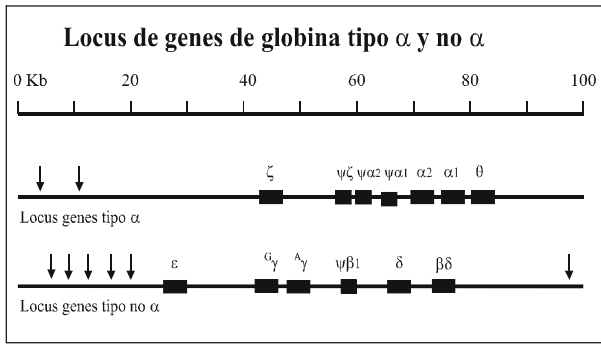


Fig. 2. Estructura de los locus de genes de globina tipo  $\alpha$  (en cromosoma 16p13.3) y de tipo no  $\alpha$  (cromosoma 11p15.5). Hay 3 pseudogenes ( $\psi$ ) en el locus de genes tipo  $\alpha$  y 1 en el de genes tipo no  $\alpha$ . La función del gen  $\theta$  es desconocida. Las flechas ( $\downarrow$ ) indican los sitios DNAsa I hipersensibles localizados en la región de control del locus (LCR).

**Gen  $\beta$  globina: estructura**

5' no traducible	1 - 53 =	53 N	
Exon I	54 - 142 =	89 N =	29,66 AA
IVS - I	143 - 272 =	130 N	
Exon II	273 - 495 =	223 N =	74,33 AA
IVS - II	496 - 1345 =	850 N	
Exon III	1346 - 1471 =	126 N =	42 AA
3' no traducible	1472 - 1606 =	135 N	
		1606 N	146 AA

Fig. 3. Estructura del gen de  $\beta$  globina con la cantidad de nucleótidos (N) transcritos y de aminoácidos (AA) traducidos.

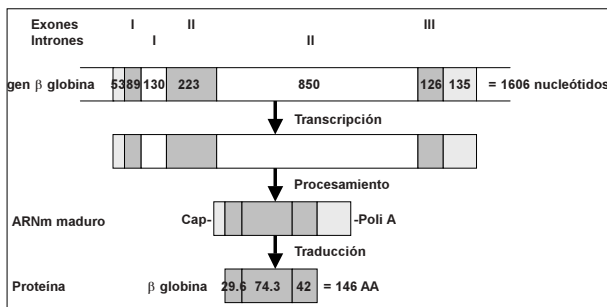


Fig. 4. Mecanismo de expresión de los genes de globina: transcripción, procesamiento (eliminación de los intrones, capping y poliadenilación) y traducción a nivel ribosómico.

- procesamiento del ARNm inmaduro a maduro, que comprende:
  - a 5': unión de una 7-metil-guanosina (capping).
  - a 3': unión del poli-A (poliadenilación).
- empalme de los exones con eliminación de los intrones (splicing) a partir de las secuencias críticas: GT y AG, y consensuales: (C/A)AGGT(A/

G)AGT y (T/C)<sub>n</sub>N(C/T)AGG, al comienzo y final de cada intrón respectivamente.

- traducción a nivel ribosómico del ARNm a proteína según el código genético.

La proteína recién formada tiene 141 (cadenas de tipo  $\alpha$ ) o 146 (cadenas de tipo no  $\alpha$ ) aminoácidos (AA) (estructura primaria). Por segmentos (A - B - C - D - E - F - G - H) adopta una conformación helicoidal (hélice  $\alpha$ ) con segmentos no helicoidales a) intercalados (AB - CD o CE - EF - FG - GH) y b) en los extremos amino (NA) y carboxilo (HC) (estructura secundaria), se pliega sobre si misma generando una cavidad (bolsillo del hem) donde se aloja una molécula de hem con su Fe<sup>++</sup> unido a las histidina F8 (proximal) y E7 (distal) (estructura terciaria). Finalmente una cadena de tipo  $\alpha$  se une a una cadena de tipo no  $\alpha$  formando un heterodímero, y 2 heterodímeros se unen para constituir un tetrámero de Hb (estructura cuaternaria).

**HEMOGLOBINOPATÍAS**

Las hemoglobinopatías (Hbpatía) se deben a defectos en los genes de globina. Los defectos pueden ser a) de tipo delección / duplicación (debidos generalmente a entrecruzamientos no homólogos) o b) de tipo mutación (ya sea reemplazo de un nucleótido por otro o pequeñas delecciones / inserciones de hasta unos 10-15 nucleótidos). El defecto genético puede afectar la síntesis de globina de forma cuantitativa (mayor o menor cantidad de Hb sintetizada) o cualitativa (alteración de la estructura primaria), dando lugar diversos síndromes clínicos: Hbpatías estructurales, síndromes talasémicos, Hbpatías talasémicas y síndromes de sobreexpresión (Tabla 1).

**DEFECTOS MOLECULARES (Tabla 2)**

- a) Defectos tipo delección / duplicación En general una delección (cientos o miles de nucleótidos) anula la expresión de un gen (Ej.: talasemias delecionales, mecanismo frecuente en  $\alpha$ -talasemia=  $\alpha^0$  cuando ambos genes de un alelo están delecionados,  $\alpha^+$  cuando uno solo lo está (Fig 5)), mientras que una duplicación la aumenta (Ej.: triple  $\alpha$ ). En el locus de genes de tipo no  $\alpha$ , la delección más frecuente en nuestro medio determina una globina quimérica de fusión (Hb Lepore (Fig 6)).
- b) Defectos tipo mutación Los efectos de una mutación, mecanismo frecuente en  $\beta$ -talasemia, son, por el contrario, más diversos y complejos. Una mutación puede afectar el mecanismo de expresión de un gen de globina a distintos niveles:
  - transcripción: mutaciones en la región promotora que interfieren ( $\alpha^+$  -  $\beta^+$  talasemias, Ej.:  $\beta$ -87 C→G) o favorecen (persistencia hereditaria de Hb F



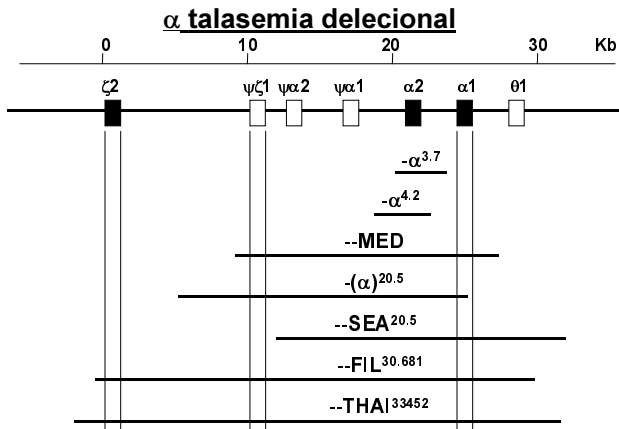


Fig. 5. Las deleciones son la causa más frecuente de  $\alpha$  talasemia. Pueden involucrar sólo al gen  $\alpha 2$  (genotipo  $\alpha^-$ :  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ), a ambos genes  $\alpha$  (genotipo  $\alpha^0$ :  $-\text{Med}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $-\text{SEA}^{20.5}$ , responsable de hidropesía fetal en su forma homocigota) o a todo el locus (genotipo  $\zeta^0\alpha^0$ :  $-\text{Fil}$ ,  $-\text{Thai}$ , responsable de aborto en el primer trimestre del embarazo en su forma homocigota).

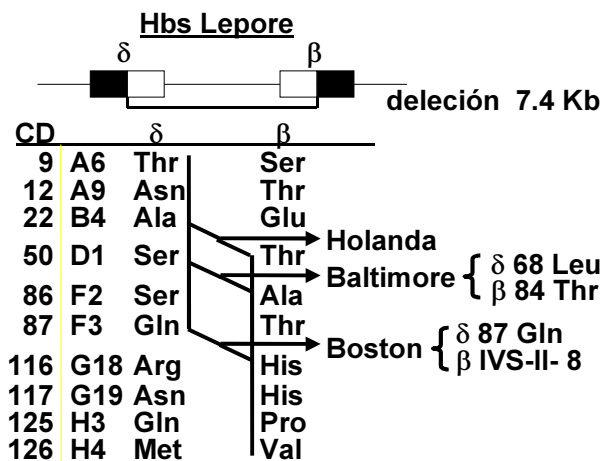


Fig. 6. La deleción por entrecruzamiento no homólogo de 7.4 Kb entre regiones de alta homología de los genes  $\delta$  y  $\beta$  crea un gen híbrido de fusión  $\delta\beta$ . La Hb Lepore, producto de dicho gen, es una hemoglobinopatía talasémica, dada su estructura primaria alterada (secuencia aminoacídica propia de  $\delta$  globina hasta un cierto punto y luego de  $\beta$  globina) y su síntesis en cantidad disminuida (el gen quimérico ha heredado la región promotora, de por sí defectuosa, del gen  $\delta$  globina). Dado que las cadenas de globina  $\delta$  y  $\beta$  difieren en 10 AA, según el lugar exacto del entrecruzamiento se reconocen diferentes variedades de Hb Lepore (Holanda, Baltimore, Boston) con distinta secuencia aminoacídica pero con igual velocidad electroforética a pH alcalino. Comparando la secuencia nucleotídica (ADN) del gen de Hb Lepore con los de  $\delta$  y  $\beta$  globina normales se puede acotar aun más la franja donde se produjo el entrecruzamiento no homólogo (Ej.: Hb Lepore<sup>Baltimore</sup> entre CD68 de  $\delta$  globina y CD84 de  $\beta$  globina).

- deleción / inserción de un número pequeño de nucleótidos no múltiplo de 3: determina alteración del encuadre (marco de lectura) con síntesis de una cadena de globina corta (no funcional) por señal de fin de traducción prematura

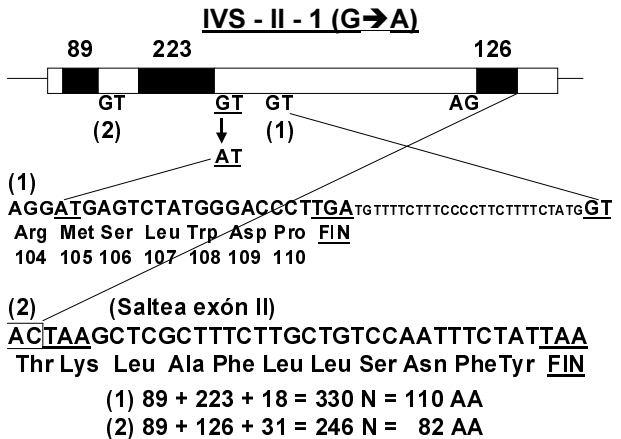


Fig. 7. Esta mutación anula el sitio dador normal de IVS-II, con 2 posibles alternativas. 1) se activa un sitio de empalme dador alternativo subóptimo en IVS-II-48, determinando la incorporación de 47 nuevos nucleótidos al final del exón II, entre los que hay una señal de fin de traducción en fase en CD111, dando lugar a una cadena de globina de 110 AA, absolutamente inviable ( $\beta^0$  tal). 2) el empalme se realiza entre el sitio dador de IVS-I y el sitio receptor de IVS-II, saltando el exón II con pérdida de sus 223 nucleótidos (no múltiplo de 3). En consecuencia, la señal de fin de traducción normal va a quedar fuera de fase, continuando la traducción hasta encontrar una señal de fin de traducción en fase 32 nucleótidos más adelante. La cadena de globina así traducida tendrá 82 AA y será absolutamente inviable ( $\beta^0$  tal).

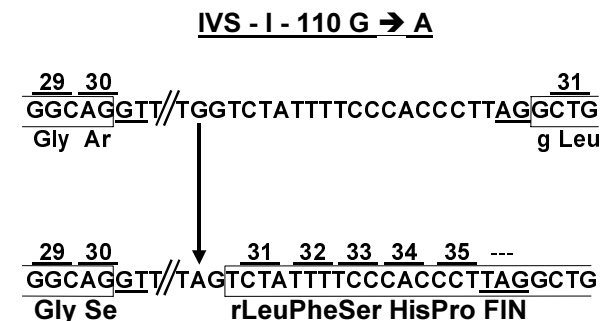


Fig. 8. Esta mutación optimiza un sitio de empalme receptor alternativo en IVS-I-111 (normalmente subóptimo) que pasa a competir con el sitio de empalme receptor normal (IVS-I-130). En consecuencia, cuando el empalme se hace con el sitio receptor anormal (la mayor parte de las veces) los últimos 19 nucleótidos del IVS-I normal quedan incluidos dentro del segundo exón. Cuando esta secuencia nueva es traducida a nivel ribosómico encuentra en CD 36 (casualmente correspondiente a los 3 últimos nucleótidos del intrón normal) una señal de fin de traducción en fase, dando lugar a una cadena de globina de sólo 35 AA, absolutamente inviable. Sólo cuando el empalme se hace con el sitio receptor normal (la menor parte de las veces) la síntesis de globina  $\beta$  es normal ( $\beta^+$  tal).

( $\beta^0$  tal, Ej.:  $\beta$  CD 8/9 +G (Fig 10)). En el gen de  $\beta$  globina existen 18 señales de fin de traducción prematuras, 5 en fase -1/+2, 13 en fase -2/+1.  
- reemplazo de un nucleótido por otro, afectando, según su localización:

**Hb E: β CD 26 (GAG → AAG)**

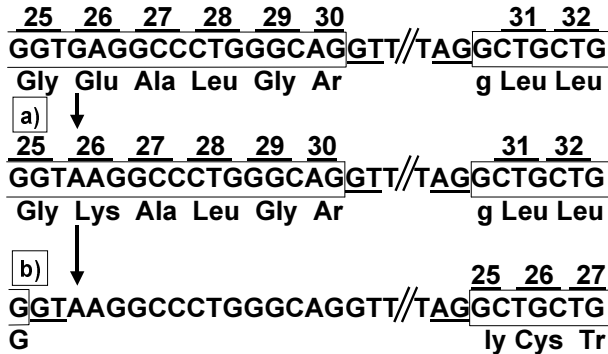


Fig. 9. Esta mutación optimiza un sitio de empalme dador alternativo (normalmente subóptimo) en CD25 que ahora pasa a competir con el sitio de empalme dador normal (IVS-I-1). Cuando el empalme se hace (b) con el sitio dador anormal (más de la mitad de las veces) el exón I pierde sus últimos 16 nucleótidos que ahora pasan a formar parte del IVS-I. Cuando esta secuencia nueva es traducida a nivel ribosómico encuentra en CD55 (no mostrado) una señal de fin de traducción, dando lugar a una cadena de globina de sólo 54 AA, absolutamente inviable. En cambio, cuando el empalme se hace (a) con el sitio dador normal, la cadena de globina tiene 146 AA, pero con lisina (AAG) en CD26 en lugar de ácido glutámico (GAG). En resumen, el reemplazo de un solo nucleótido es responsable tanto de la alteración de la estructura primaria de la cadena de globina (hemoglobinopatía) como de su síntesis en cantidad disminuida (talasémica).

**CD 8/9 (+G)**

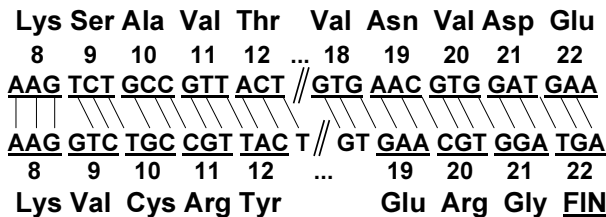


Fig. 10. La delección / inserción de un número pequeño de nucleótidos (no múltiplo de 3) en el interior de un exón determina un corrimiento del marco de lectura (desplazamiento del encuadre= frameshift) con traducción de una secuencia inédita de AA desde la mutación en adelante, hasta encontrar una señal de fin de traducción prematura, en este ejemplo en CD 22 dando lugar a una cadena de globina de sólo 21 AA, totalmente inviable (β<sup>0</sup> tal).

- codón de inicio de traducción (° tal, Ej.: β ATG→AGG).
- codón de fin de traducción (Hbpatía talasémica, Ej.: Hb Constant Spring α CD 142 TAA→CAA (Fig 11)).
- codón que codifica para un AA determinado y que ahora pasa a codificar para:
- señal de fin de traducción (° tal, Ej.: β CD 39 CAG→TAG (Fig 12)).

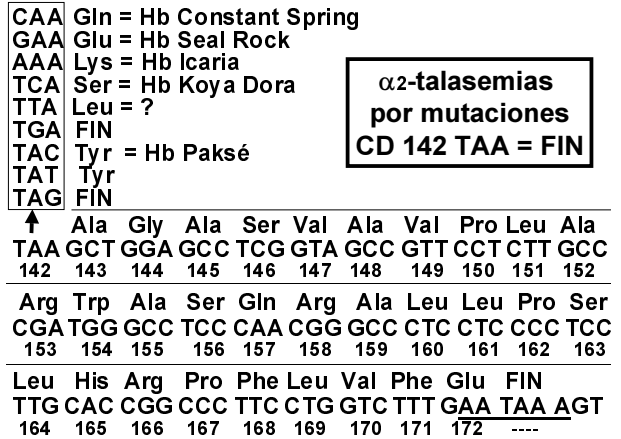


Fig. 11. La mutación de un nucleótido en el codón 142 del gen α2 globina puede reemplazar la señal de fin de traducción normal por la de codificación de un aminoácido, dando lugar a distintas Hbpatías según el AA resultante en dicho codón (CAA=Gln es el más común: Hb Constant Spring). Cualquiera sea el AA en CD 142 la cadena se va a elongar hasta encontrar una nueva señal de fin de traducción en fase en el codón 173, por lo que todas estas hemoglobinopatías tendrán 31 AA excedentes (141 + 31 = 172), el primero propio de cada variante y los 30 restantes idénticos en todas las variantes. Estas cadenas elongadas son inestables y se degradan parcialmente antes de conformar el dímero, por lo que todas estas hemoglobinopatías son talasémicas. La secuencia subrayada (AATAAA) corresponde a la señal de poliadenilación.

- otro AA (Hbpatías estructurales, Ej.: Hb S - C - D - etc.).

En resumen, los síndromes talasémicos pueden deberse a:

- no síntesis de cadena de globina: defectos por delección (°)
- síntesis en menor cantidad de una cadena de globina estructuralmente normal: mutaciones en la región promotora (+)

**CD 39 CAG → TAG**

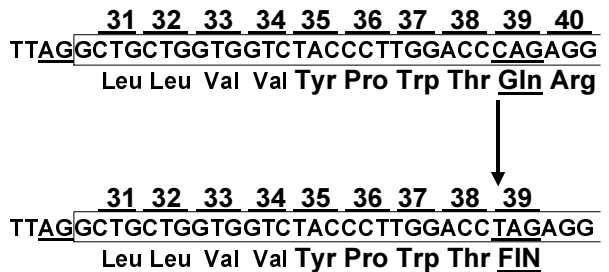


Fig. 12. Esta mutación genera una señal de fin de traducción prematura (CD39) dando lugar a una cadena de globina de sólo 38 AA, absolutamente inviable (β<sup>0</sup> tal). Aparentemente el ARNm con señal de fin de traducción prematura sería parcialmente degradado antes de ser traducido a nivel ribosómico, disminuyendo así la cantidad de globina a ser proteolizada.



- síntesis en cantidad normal de una cadena de globina estructuralmente muy anormal, absolutamente inviable y que se degrada antes de llegar a conformar un dímero:  $(^0)$  o  $(^+)$  según que la mutación determine la síntesis sólo de cadenas anormales o, por caminos alternativos, en parte de cadenas normales y en parte de cadenas anormales.

Según el grado de alteración de su estabilidad una cadena de globina estructuralmente anormal puede determinar:

- estabilidad normal: hemoglobinopatías estructurales. Ej.: Hbs S, C, D, etc.
- ligeramente alterada: formación de dímeros y tetrámeros (muy) inestables: Hbpatías inestables. Ej.: Hbs Köln, Bristol, Saint-Étienne, etc.
- alterada: degradación parcial antes de llegar a conformar dímeros: Hbpatías talasémicas severas. Ej.: Hb Constant Spring,  $\beta$ -talasemias del tercer exón (talasemias dominantes). Nótese la frontera poca precisa entre talasemias dominantes y Hbpatías inestables.
- muy alterada: degradación total antes de llegar a conformar dímeros:  $(^0)$  o  $(^+)$  talasemias. Ej.:  $\beta$  39 CAG→TAG,  $\beta$  8/9 (+G), IVS-I-110 G→A, etc.

## SEVERIDAD DEL CUADRO CLÍNICO

La severidad del cuadro clínico de un paciente portador de talasemia (Ej.:  $\beta$ -talasemia menor, intermedia, mayor) depende en buena medida del daño de membrana determinado por el exceso de cadenas de globina libres que un sistema proteolítico saturado no alcanza a degradar. En  $\beta$ -talasemia dichas cadenas libres son (Fig 13):

- cadenas  $\alpha$  excedentes: mayor cantidad en talasemia mayor que en intermedia y que en menor y, a su vez, mayor cantidad en  $\beta^0$  que en  $\beta^+$ .
- cadenas  $\beta$  inviables:
  - ausentes en talasemias delecionales ( $\beta^0$ , Ej.: -619 pb) o por mutaciones en la región promotora ( $\beta^+$ , Ej.: -87 C→T).
  - presentes en talasemias por mutaciones que afectan el procesamiento o la traducción, con más cantidad (= mayor severidad clínica):
    - en  $\beta^0$  (Ej.: CD 8/9 +G, CD 39 C→T, CD 121 G→T) que en  $\beta^+$  (Ej.: CD 26 G→A, IVS-I-110 G→A, aunque ésta última se comporta clínicamente casi como una  $\beta^0$ ).
    - cuanto más distal (más próximo al extremo 3') se encuentra la señal de fin de traducción prematura (más en CD 121 G→T -talasemia dominante- que en CD 39 C→T y más que en 8/9 +G), favorecido por la degradación pre-traducción del ARNm con señal de fin de traduc-

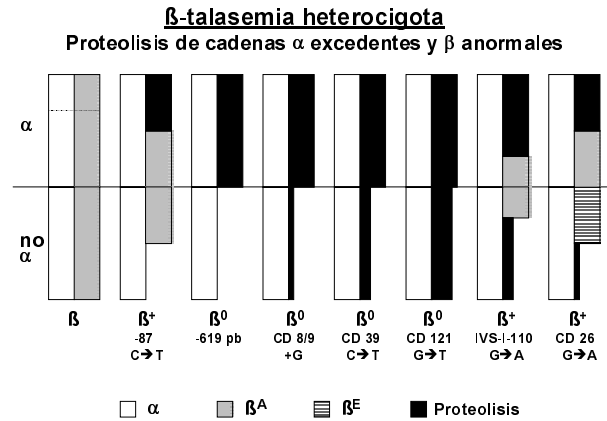


Fig. 13. En este esquema la síntesis de globina a partir de cada alelo está representada por un rectángulo en el cual la altura equivale a la cantidad de globina sintetizada y la base a la longitud de dicha cadena. Las cadenas  $\alpha$  globina y  $\beta$  globina se sintetizan por separado y luego se combinan para formar dímeros y tetrámeros. Las cadenas que no concreten la dimerización deben ser proteolisadas:  $\alpha$  excedentes (mayor cantidad en  $\beta^0$  que en  $\beta^+$ ) y  $\beta$  anormales (mayor cantidad en  $\beta^0$  que en  $\beta^+$  y cuanto mayor es la longitud de la cadena inviable). En las formas delecionales (Ej.:  $\beta^0$  del 619 pb, común en la India) o por mutaciones en la región promotora (Ej.:  $\beta^+$  -87 C→T) no hay síntesis de cadenas  $\beta$  anormales. A mayor cantidad de proteína a degradar mayor severidad del cuadro clínico: -87 C→T determina una  $\beta^+$  silente, mientras que  $\beta$ 121 G→T determina una talasemia dominante (clínica de talasemia intermedia en el heterocigota).

ción muy distante de su extremo 3' (NDM: nonsense codon-mediated mRNA decay).

## CONCLUSIÓN

Cientos de defectos moleculares (delecionales o mutacionales) diferentes pueden afectar los genes de globina. Cada defecto tiene su mecanismo fisiopatológico particular responsable de una síntesis deficiente y/o defectuosa de cadenas de globina, determinando diversos cuadros clínicos, en general leves o silentes en su forma heterocigota pero severos hasta incompatibles con la vida en sus formas homocigota o doble heterocigota. De ahí la importancia de detectar a los portadores talasémicos heterocigotas a fin de prevenir, mediante el consejo genético, el nacimiento de hijos con formas severas de talasemia. En el manejo de dicha prevención, el diagnóstico a nivel ADN (de los padres, prenatal o preimplante) juega un papel importante, por lo cual es imprescindible un conocimiento mínimo de las bases moleculares de las talasemias.

## SUMMARY

A large variety of globin genes defects are responsible for hemoglobinopathies. While structural hemoglobinopathies

and overexpression syndromes are determined by a few number of physiopathologic mechanisms (missense mutations, and mutations in the promoter region or deletion / insertions respectively), thalassemic syndromes (and thalassemic hemoglobinopathies) have very different genetic causes with sometimes complex physiopathologic consequences. The aim of this review is to afford an introduction for a better comprehension of the molecular basis of this frequent albeit underdiagnosed hereditary pathology. Physicians and biologists should be aware of the importance of this knowledge in order to make accurate molecular studies whenever prenatal or even preimplantation diagnosis is required with the pur-

pose of preventing the birth of children with thalassemia major.

**Keywords:** thalassemia, hemoglobinopathy, molecular basis, DNA.

#### **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

Huisman THJ, Carver MFH and Baysal E. A Syllabus of Thalassemia Mutations, 1997. **The Sickle Cell Anemia Foundation**, Augusta, GA, USA, 1997.