



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN EL GEN β GLOBINA
EN PACIENTES QUE ASISTEN AL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE
HEMOGLOBINAS ANORMALES, UCV
(Modalidad: Investigación)

GILBERTO JOSÉ GÓMEZ ORTÍZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2008

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN EL GEN β GLOBINA
EN PACIENTES QUE ASISTEN AL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE
HEMOGLOBINAS ANORMALES, UCV

APROBADO POR:

Asesor Académico

Co-Asesor Académico

Asesor Externo

INDICE

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| LISTA DE TABLAS | iv |
| LISTA FIGURAS | v |
| RESUMEN | vii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| Área de estudio | 8 |
| Recolección de muestras | 8 |
| Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC-CE) (Tan <i>et al.</i> , 1990) | 8 |
| Separación de glóbulos blancos mediante centrifugación en gradiente de densidad (Mongini y Waldner, 1996) | 9 |
| Extracción de ADN genómico | 10 |
| Protocolo de extracción de Miller <i>et al.</i> (1988) | 10 |
| Protocolo de extracción de Welsh y Bunce (1999) | 11 |
| Cuantificación del ADN | 12 |
| Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) | 12 |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 13 |
| PCR para secuenciación de ADN genómico | 16 |
| Secuenciación automática de ADN genómico | 17 |
| RESULTADOS | 18 |
| Estandarización de la extracción de ADN genómico | 18 |
| Diagnóstico de hemoglobinopatías | 18 |
| Análisis del gen β globina por DGGE | 21 |
| Identificación de mutaciones por secuenciación de ADN genómico | 24 |
| Determinación del catálogo para las mutaciones CD39(C/T), IVSI-110 (G/A) y -88 (C/T) | 30 |
| DISCUSIÓN | 34 |
| CONCLUSIONES | 44 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO.

A mis padres, Eneida y Gilberto; sin su ayuda y constante apoyo es seguro que no estaría donde estoy ni sería lo que soy.

A mi hermano Eduardo. Que todo este esfuerzo realizado le sirva de ejemplo de perseverancia y esperanza; sabiendo afrontar los obstáculos toda meta puede ser alcanzada.

A mis abuelos: José, Carmen, Felipe y Ana.

A la familia Uzcátegui Rada (Augusto, Nelly, Lourdes, Rafael y la Sra Inés), sin su ayuda incondicional estoy seguro de no haber superado muchas trabas desde el inicio de este trabajo.

A toda mi Familia, a mis tíos, a Abilio, primos (Hernán, Rafael Augusto y Esteban).

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la Dra Anabel Arends, por su ayuda, constantes consejos, modelo lucha y perseverancia, gracias por abrirme las puertas a un mundo totalmente desconocido y darme la oportunidad de desarrollarme en su laboratorio de investigación. Gracias por darme una oportunidad y por creer en mí.

A mis tutores, la Prof María José González por guiar mis primeros pasos en este campo y hacia este trabajo: al Dr. Marcos de Donato por su constante apoyo y consejo; a la Dra. Martha Bravo, a la cual me faltan palabras para agradecerle, gracias por estar conmigo al inicio, al final y en todo momento.

A todo el equipo personal y humano del Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Martha, Silvia Mariela, Odalis, Marycarmen, Maribel, Joseba, Douglas, Paola y Ligia; quienes con su apoyo e incondicional ayuda, en los buenos y malos momentos estuvieron conmigo. Muchachos esto no hubiese dado frutos sin ustedes.

A la Universidad de Oriente y a todos mis profesores durante la carrera por inculcarme conocimientos y muchos principios.

A todos mis compañeros de clases por todos los momentos compartidos. A Richard y Jesús, por estar conmigo y apoyarme desde el inicio hasta el final de esta aventura.

Esta investigación no se hubiese podido realizar sin el financiamiento de FONACIT S1-2002000539, G-2005000373, MC-2007001066, ECOS-NORD PI-2005000758, CODECIH UC 2005-011 y CDCH PI 09-00-6451-2006.

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Composición nucleotídica que define los polimorfismos neutrales del gen β -globina. (Según Ghanem <i>et al.</i> , 1992) | 15 |
| Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación del gen β globina. (Según Ghanem <i>et al.</i> , 1992)..... | 15 |
| Tabla 3. Frecuencia de los distintos tipos de beta talasemia detectadas por HPLC-CE.. | 20 |
| Tabla 4. Análisis de los resultados obtenidos por DGGE en pacientes no relacionados. Los patrones anormales observados permiten la localización de la mutación para ser identificadas por secuenciación automática de ADN genómico. | 24 |
| Tabla 5. Mutaciones, tipos, origen y frameworks estudiados por DGGE y secuenciación automatizada de ADN genómico en pacientes no relacionados. | 27 |
| Tabla 6. Frecuencia de las mutaciones β talasémicas en pacientes no relacionados. | 28 |
| Tabla 7. Porcentajes de hemoglobinas en pacientes con beta talasemia en pacientes relacionados | 29 |
| Tabla 8. Clasificación de las mutaciones β talasémicas identificadas en este estudio según su clase, tipo y origen. | 30 |
| Tabla 9. Perfil de migración obtenido por DGGE en pacientes con la mutación CD 39 (C/T)..... | 32 |
| Tabla 10. Perfil de migración obtenido por DGGE en pacientes con la mutación IVSI-110 (G/A)..... | 32 |
| Tabla 11. Perfil de migración obtenido por DGGE en pacientes con la mutación -88(C/T) analizados por DGGE. | 33 |

LISTA FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. A.- Bloque de genes beta, localizado en el cromosoma 11; B.- Bloque de genes alfa, localizado en el cromosoma 16..... | 1 |
| Figura 2. A.- Electroforésis de ADN genómico extraído con el método de Salting Out, Miller (1988). B.- Electroforésis de ADN genómico extraído con el método de Welsh y Bunce (1999)..... | 18 |
| Figura 3. Frecuencia de hemoglobinopatías detectadas por HPLC-CE en pacientes referidos al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales. | 19 |
| Figura 4. Patrones electroforéticos mostrando la combinación de los polimorfismos del ADN en el fragmento G de los pacientes analizados por DGGE. Líneas 1 y 4: pacientes mostrando un frente de corrida 1/1, Línea 2: paciente mostrando un frente de corrida 2/3a, Línea 3: paciente mostrando un frente de corrida 1/3. Líneas 5 y 6: pacientes mostrando un frente de corrida 1/2,..... | 21 |
| Figura 5. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento A de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 2, 4 y 5: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento A. Línea 3: ADN heterodúplex de un paciente mostrando la presencia de una mutación..... | 22 |
| Figura 6. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento B de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 2, 3: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento B. Líneas 4 y 5: ADN heterodúplex de pacientes analizados por DGGE en el fragmento B. | 22 |
| Figura 7. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento C de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 4, y 5. ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento C. Línea 3. ADN heterodúplex de un paciente analizado por DGGE. | 23 |
| Figura 8. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento D de pacientes analizados por DGGE. Línea 1: ADN Heterodúplex de un paciente analizado en el fragmento D. Líneas 2, 3, 4, y 5: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento D por DGGE. | 23 |

| | |
|--|----|
| Figura 9. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento F de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 2, 4 y 5: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento F. Línea 3: ADN heterodúplex de un paciente mostrando la presencia de una mutación..... | 23 |
| Figura 10. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina donde se muestra la presencia de la mutación -86 (G/C). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G C en la posición -86 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido..... | 24 |
| Figura 11. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina del paciente uno, se muestra la presencia de la mutación IVSII-1 (G/T). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G T en la posición IVSII-1 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido. | 25 |
| Figura 12. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina del paciente dos, se muestra la presencia de la mutación IVSII-1 (G/T). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G T en la posición IVSII-1 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido. | 25 |
| Figura 13. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina del paciente tres, se muestra la presencia de la mutación IVSII-1 (G/T). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G T en la posición IVSII-1 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido..... | 26 |
| Figura 14. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina donde se muestra la presencia de la mutación IVSI-110 (G/A). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G A en la posición IVSI-110 (G/A) del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido. | 26 |
| Figura 15. Esferograma del análisis de secuencias del gen β globina donde se muestra la presencia de la mutación IVSI-5 (G/A). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G A en la posición IVSI-5 del gen β globina. | 27 |
| Figura 16. Localización esquemática de las mutaciones del gen β globina encontradas en este estudio..... | 30 |

RESUMEN

El estudio del gen β globina ha proporcionado grandes aportes al conocimiento de desórdenes genéticos hereditarios, tales como la β talasemia, las variantes hemoglobínicas y la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal; al mismo tiempo ha facilitado la comprensión de los mecanismos de regulación y expresión de los diferentes genes que conforman el bloque β globina. Esta enfermedad esta ampliamente distribuida a nivel mundial, en Venezuela alcanza una frecuencia de 1,8%. Los estudios llevados a cabo utilizando técnicas de ADN recombinante, han permitido caracterizar decenas de mutaciones y demostrar directamente la gran variabilidad genética de las anormalidades que producen los fenotipos talasémicos. En el presente estudio se analizaron un total de 54 pacientes, de los cuales a 36 se les realizó el análisis molecular para definir el espectro de mutaciones por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y secuenciación de ADN genómico, y los 18 pacientes β talasémicos restantes fueron estudiados para definir el catálogo para las mutaciones -88 (C/T), CD39 (C/T) y IVSI-110 (A/G). En 12 pacientes no relacionados se logró identificar mutaciones por secuenciación automatizada de ADN genómico. Las mutaciones fueron la -88 (C/T) (2,7%), la -86 (G/C) (8,3%), la IVSI-5 (G/A) (2,7%), la IVSI-110 (G/A) (8,3%), la IVSII-I (G/T) (5,5%), de los cuales tres están relacionadas, la CD 39 C/T) (2,7%) y la IVSII-849 (A/G) (2,7%). El catálogo de mutaciones demostró la asociación de la mutación -88 (C/T) con el perfil de migración 2, la mutación CD39 (C/T) con el perfil de migración 1 y la mutación IVSI-110 (A/G) con el perfil de migración 1. Los resultados obtenidos permiten concluir que la (DGGE) es un método apropiado para la caracterización de mutaciones que difieren de pequeños cambios nucleotídicos con respecto a la secuencia normal del gen beta globina humano. Esta técnica, al ser combinada con la secuenciación automatizada del ADN ha probado ser particularmente útil en la detección de mutaciones responsables de enfermedades genéticas.

INTRODUCCIÓN

La hemoglobina (Hb) es una proteína que transporta oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, está constituida por una parte prostética llamada hemo y por una parte proteica llamada globina.

En las distintas etapas del desarrollo, desde el embrión hasta llegar al adulto se sintetizan, en un orden fijo y rigurosamente determinado, diferentes hemoglobinas constituidas por dos pares de cadenas polipeptídicas. Los genes que codifican para estas hemoglobinas se encuentran en dos cromosomas diferentes formando bloques, el alfa, localizado en el cromosoma 16, formado por los genes alfa y zeta, y el beta, localizado en el cromosoma 11, formado por los genes épsilon, gamma, delta y beta (figura 1) (Antonarakis *et al.*, 1984; Varawalla *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 2000).

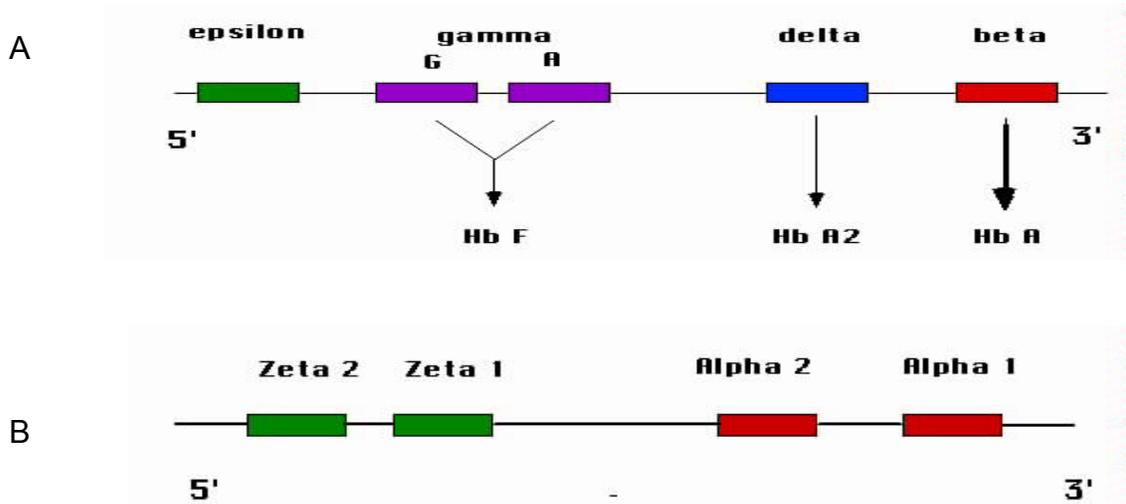


Figura1. A.- Bloque de genes beta, localizado en el cromosoma 11; B.- Bloque de genes alfa, localizado en el cromosoma 16.

Existen tres tipos de hemoglobinas embrionarias, las cuales son detectables a partir de los 15 días de gestación, la Hb Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) (Huehns *et al.*, 1961; Hecht *et al.*, 1966, Gale *et al.*, 1979) y la Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) (Kaltsoya *et al.*,

1966; Capp *et al.*, 1967, Todd *et al.*, 1970; Weatherall y Clegg, 1970) en proporciones de un 42, 24 y 21%, respectivamente; éstas se sintetizan hasta aproximadamente 40 días, cuando empieza la síntesis de la hemoglobina fetal ($\alpha_2 \gamma_2$). Paralelamente a la reducción de estas cadenas globinas, se produce un aumento de la síntesis de la hemoglobina fetal (Hb F) que predomina durante la vida fetal y representa más de un 90% de la hemoglobina total.

La hemoglobina A (Hb A) es la mayor fracción de la Hb en los adultos representando un 97-98% de la hemoglobina total. Está formada por dos cadenas alfa y dos cadenas beta ($\alpha_2 \beta_2$) globinas unidas al grupo hemo; en menor proporción se encuentra la hemoglobina A₂ (Hb A₂) formada por dos cadenas alfa y dos cadenas delta ($\alpha_2 \delta_2$), con un porcentaje de 1,8 a 3% de la hemoglobina total. El cambio de Hb F a Hb A ocurre en el periodo perinatal, alcanzando luego valores entre 0,3 y 1,2% (Kunkel y Wallenius, 1955).

El estudio de las hemoglobinas ha contribuido sustancialmente al conocimiento de los principios básicos de la genética y ha permitido detectar e identificar mutaciones en los genes que codifican para las cadenas globinas de las hemoglobinas. Estas alteraciones dan origen a los desórdenes genéticos hereditarios más comunes que afectan al hombre, como son las hemoglobinopatías, entre las que destacan, las variantes estructurales, las cuales son producidas por una alteración en la composición química en una de las cadenas globinas, las talasemias, causadas por mutaciones que producen alteraciones cuantitativas en la síntesis de la hemoglobina (Orkin y Kazazian, 1984; Steinberg, 1993; Weatherall y Clegg, 1996) y la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal. Genéticamente las talasemias son clasificadas de acuerdo a la cadena cuya síntesis es alterada en α , β , γ , $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemia (Weatherall y Clegg, 1970; Kazazian, 1990).

Se ha estimado que aproximadamente el 7% de la población mundial es portadora de distintos desórdenes hereditarios de la hemoglobina, la β talasemia es una de las

enfermedades genéticas más comunes y se estima que aproximadamente existen 80 millones de portadores de esta enfermedad a nivel mundial (Capellini *et al.*, 2007).

La β talasemia es un grupo de anemias congénitas que resultan de mutaciones ocurridas en el bloque de genes β globina, localizado en el brazo corto del cromosoma 11. Existen dos variedades principales de β talasemia, la β^0 talasemia, en la cual no hay producción de cadenas β , y la β^+ talasemia, en la cual, algunas cadenas β son producidas pero en niveles más bajos de los normales (Weatherall y Clegg, 2001).

En 1925, Thomas Cooley y Pearl Lee describieron por primera vez la β talasemia como una forma de anemia severa caracterizada por microcitosis, hipocromía y anemia hemolítica congénita, producto de una variedad de defectos moleculares que interfieren en la síntesis normal de cadenas β globina, esta patología se encontró en niños de origen italiano asociada a esplenomegalia y cambios característicos en los huesos.

Desde el punto de vista molecular la beta talasemia es causada en un 95% por mutaciones puntuales dentro o en las inmediaciones del gen beta globina y en un 5% por deleciones, afectando la transcripción del gen, el procesamiento del ARNm y la traducción (Navaratnam *et al.*, 2000).

Las mutaciones que afectan la transcripción del gen son simples cambios nucleotídicos en las secuencias conservadas de la región promotora, provocando la reducción de un 10 a 25% de la producción del ARN mensajero, expresando un fenotipo leve de beta talasemia.

El procesamiento del ARNm involucra la remoción de los intrones y la unión de las regiones codificantes para producir una molécula de ARNm funcional. Las mutaciones de mayor interés funcional son las que afectan el procesamiento del ARNm, las cuales pueden resultar en un fenotipo β^0 o β^+ talasemia, dependiendo de la secuencia mutada. Entre las mutaciones que afectan el procesamiento del ARNm se tienen las mutaciones que afectan los dinucleótidos no variables GT en el extremo 5' (donante) y AG en el extremo 3' (aceptor), en los sitios de "*splicing*", mutaciones que afectan las

secuencias consenso, mutaciones que afectan sitios críticos de “*splicing*” en los intrones y las mutaciones que afectan sitios críticos de “*splicing*” en los exones (Breathnach y Chombon, 1981).

Las que afectan el proceso de traducción son clasificadas como mutaciones sin sentidos, que introducen un codón stop, y las mutaciones del tipo frameshift, que modifican el marco de lectura de la molécula de ARN

Se han descrito cinco mutaciones que afectan el codón de iniciación del proceso de traducción del ARN, de las cuales todas producen β^0 talasemia. Estas son simples sustituciones de bases, una afecta el primer nucleótido (A), dos afectan el segundo nucleótido (T) y dos afectan el tercer nucleótido del codón de iniciación ATG (Jankovic *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1990; Hattori *et al.*, 1991; Soba *et al.*, 1992; Ohba *et al.*, 1997).

Solo 14 deleciones que afectan al gen beta globina han sido descritas, aunque son poco comunes, la caracterización de estas deleciones han permitido conocer los mecanismos de expresión de los genes del bloque β . Existen deleciones que varían en tamaño del fragmento, desde 290 pb hasta 60 kb, de éstas, la más común es la deleción de 619 pb, es frecuente en India y Pakistan, donde se localizan aproximadamente el 20% de los alelos mutantes causantes de la β talasemia. En el mundo existen otras deleciones que remueven parte del extremo 5' del bloque β dejando el gen β globina intacto, lo que resulta en un fenotipo de β talasemia (Thein *et al.*, 1984; Varawalla *et al.*, 1991).

Kunkel *et al.* (1957), encontraron que los individuos portadores de la β talasemia se caracterizan por presentar un incremento en los niveles de hemoglobina A_2 mostrando valores entre 3,5% y 6,5%, esto se ha convertido en uno de los principales caracteres de diagnóstico de estos trastornos, aunque se ha observado que los niveles de A_2 en Venezuela pueden estar aumentados en presencia de anemia megaloblástica, paludismo, hemoglobina S, hepatitis viral, embarazo, esferocitosis hereditaria y en algunos casos por esquistosomiasis intestinal (Arends, 1962).

La β talasemia presenta tres formas clínicas, la β talasemia mayor, la β talasemia intermedia y la β talasemia menor, que están definidas de acuerdo a la severidad clínica, y se corresponde con el número de alteraciones en los genes, por lo que es considerada una enfermedad heterogénea a nivel molecular. La β talasemia mayor se caracteriza por una anemia severa transfusión dependiente, lesiones orgánicas secundarias, eritropoyesis inefectiva que resulta en una expansión de la médula ocasionando una progresiva esplenomegalia y malformaciones óseas (Gratwick *et al.*, 1978; Rioja *et al.*, 1990).

La β talasemia intermedia se caracteriza porque los pacientes presentan anemia moderada con requerimiento de transfusiones en algunos casos, en otros casos no necesitan transfusiones sanguíneas y en la β talasemia menor los individuos son asintomáticos pero con deformaciones en los glóbulos rojos (Evans *et al.*, 2003). La β talasemia se ha observado asociada a las variantes de hemoglobinas S y C. En este sentido Weatherall y Clegg (1981), propusieron tres clasificaciones fenotípicas para catalogar a los pacientes doble heterocigotos Hb S - β talasemia y Hb C - β talasemia, de acuerdo al porcentaje de hemoglobina A presente. Así se tienen tres tipos: uno el doble heterocigoto Hb S (C) - β^+ talasemia tipo 1 cuando los pacientes producen Hb A en un 5-15%, el segundo es Hb S (C) - β^+ talasemia tipo 2 cuando los pacientes producen Hb A en un 15-30% y tercer tipo el Hb S (C) - β^0 talasemia cuando los pacientes no producen Hb A.

La β talasemia es una enfermedad que está distribuida principalmente en regiones del mundo donde la malaria es o fue una vez endémica y afecta especialmente a personas del Mediterráneo, Oeste de África, Islas del Pacífico y Sureste de Asia. Es extremadamente heterogénea desde el punto de vista molecular y a nivel mundial se conocen alrededor de 200 mutaciones puntuales y 14 deleciones causantes de este desorden (Weatherall y Clegg, 1996; Orkin y Kazazian, 1984). Las mutaciones puntuales causantes de la β talasemia más comunes en el Mediterráneo son la IVSI-1(G/A), CD39 (C/T), IVSI-6 (T/C), IVSI-110 (G/A), IVSII-745 (C/G), CD8/9 (+G), CD8 (-AA), IVSII-1 (G/A), IVSI-5 (G/A) (Amselen *et al.*, 1988; Di Marzo *et al.*, 1988;

Pirastu *et al.*, 1988; Villegas *et al.*, 2001; Talmaci *et al.*, 2004). Las mutaciones más frecuentes en el continente Africano son las -29 (A/G), -88 (C/A) (C/T), CD24 (T/A), IVSII-849 (A/G) y en el continente asiático la IVSI-5 (G/C), CD41/42 (-TCTT), IVSI-1 (G/C), CD8/9 (+G), CD15 (G/A), la delección de 619 pb 3', CD16 (-C) y la IVSII-654 (C/T), (Varawalla *et al.*, 1991; Bashyam *et al.*, 2004).

En países como Grecia e Italia existe una alta prevalencia de esta patología, en regiones de Italia como Sardinia se alcanza un 13%, en la región delta del Río Po cerca de Ferrara se encuentra en un 8%, mientras que en Sicilia se refleja con un 5,9% (Cao *et al.*, 1996; Barraï *et al.*, 1984; Schiliro *et al.*, 1995).

Schiliro (1987) y Pepe *et al.* (1992), encontraron una incidencia de 3 a 9% en India, por otra parte Stamatoyannopoulos y Fessas (1964) realizaron estudios en las islas Corfu y Serifos (Grecia), encontrando una proporción de 6 a 19%. Posteriormente, Schizas *et al.* (1977) estimaron que la frecuencia de esta enfermedad en Grecia era de 7%.

En Sao Paulo, la frecuencia β talasémica alcanza un 3% (Bonini *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004). En Norte América, Pierce *et al.* (1977) reportan que esta enfermedad alcanza una frecuencia de 1,4%, este mismo valor fue observado en Venezuela por Arends (1984) localizándolo en poblaciones mestizas, negroides y caucasoides.

Es importante destacar que los estudios sobre β talasemia en Venezuela eran realizados mediante análisis clínico y fenotípico (Arends, 1971a). En estudios realizados por Bravo-Urquiola *et al.* (2006), usando las técnicas de biología molecular *reverse dot-blot* (Maggio *et al.*, 1993) y amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (Newton *et al.*, 1989; Old *et al.*, 1990) reportaron que la mutación mas frecuente en nuestra población es la CD39 (C/T), seguida por la IVSI-1(G/A), la IVSI-6(T/C) y la IVSI-110(G/A), todas de origen mediterráneo, pero debido a la heterogeneidad molecular de este trastorno, existen muchos casos cuyas mutaciones no

han sido posible identificar por las técnicas usadas por estos autores, por lo que es importante el uso de técnicas de estudio masivo de detección de mutaciones como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante DGGE.

Para esta investigación se propuso la utilización de la técnica de electroforesis en gel con un gradiente de desnaturización (DGGE), la cual es un método electroforético que permite identificar cambios de una única base en un segmento de ADN, en el cual la doble hebra es sometida a condiciones de desnaturización formada por un gradiente incrementado linealmente por dos agentes desnaturizante como la formamida y urea. El gen β globina fue dividido en seis fragmentos, cada uno de estos alcanza una temperatura específica para cada secuencia y la presencia de una mutación alterará el perfil de unión/disociación de ese fragmento de ADN mutado con respecto a un fragmento de secuencia normal (Talmaci *et al.*, 2004).

No se han reportado en el país estudios sobre la aplicación de la técnica de DGGE en este tipo de investigación, de allí que la realización del mismo es un aporte al conocimiento genético de la distribución de las diferentes mutaciones β talasémicas en nuestra población. Además, la identificación del tipo de mutación en cada paciente, a temprana edad, resulta una ventaja, porque conociendo el genotipo se puede predecir el fenotipo en cada caso y de esta manera proporcionar un consejo genético adecuado a cada paciente y sus familiares. La presente investigación tiene por finalidad la caracterización molecular de mutaciones en el gen β globina que causan β -talasemia en pacientes del Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales (LIHA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las muestras de sangre fueron obtenidas de los pacientes referidos al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales ubicado en el Hospital Clínico Universitario de Caracas e Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela.

Recolección de muestras

Para la recolección de muestras, se les suministró a los pacientes evaluados un consentimiento previa información (CPI) bajo el formato establecido por el código de bioética de FONACIT para la participación en el estudio.

Se recolectaron 5 ml de sangre periférica por cada paciente, los cuales se obtuvieron de acuerdo a las técnicas rutinarias de laboratorio, utilizando sal sódica al 10% (EDTA) como anticoagulante. Las muestras de sangre fueron tomadas por un profesional en el área de la salud.

Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC-CE) (Tan *et al.*, 1990)

La cuantificación de las hemoglobinas A, A₂ y F se realizó mediante la técnica de HPLC-CE, utilizando el sistema automatizado VARIANT *Hemoglobin testing system* (Bio-Rad). Este sistema consta de cinco programas, de los cuales uno de ellos, el programa *β-Thalassemia Short*, es capaz de determinar los porcentajes relativos de las hemoglobinas A, A₂ y F; además este programa cuenta con ventanas adicionales para la identificación de variantes hemoglobínicas como la Hb S, Hb C y Hb D.

Las muestras se prepararon mezclando 5 µl de sangre total en 1 ml de solución hemolizante (dispuesta por Bio-Rad), con la ayuda de un *Autodilutor* (Bio-Rad). Cada

muestra fue cubierta con parafilm y mezclada por inversión. Posteriormente se colocaron dentro del VARIANT junto con una serie de reactivos, los cuales fueron procesados por el equipo al inicio de cada corrida.

Estos reactivos son: un “*primer*” encargado de acondicionar la columna (4,5 x 30 mm, suministrada por Bio-Rad) para el análisis, un calibrador de las hemoglobinas A₂ y F, y dos controles, uno normal y otro anormal, diseñados para monitorear la precisión de la cuantificación automatizada.

Cada una de las muestras se incorporó, de manera automática y secuencial, a un gradiente pre-programado de dos buffer de fosfato de sodio de diferente fuerza iónica a intervalos de 6,5 minutos una vez dentro del gradiente, las muestras fueron transportadas a través de la columna, donde cada una se separó en sus componentes individuales.

Las fracciones eluidas pasaron luego por un filtro fotométrico de doble longitud de onda (415 y 690 nm), el cual monitoreó la elusión por medio de la detección de cambios en la absorbancia a 415 nm. El filtro secundario de 690 nm, se encargó de corregir el efecto causado por la mezcla de los buffer con diferente fuerza iónica. Los cambios en la absorbancia fueron mostrados en un cromatograma de absorbancia versus tiempo.

Las hemoglobinas se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención pre-programados para la variedad de hemoglobinas.

Separación de glóbulos blancos mediante centrifugación en gradiente de densidad (Mongini y Waldner, 1996).

Este método se utilizó para la separación de células mononucleares a partir de sangre periférica. Para ello se empleó el reactivo Ficoll-Hypaque.

El Ficoll es un polisacárido que produce la aglutinación de los eritrocitos logrando que éstos sedimenten más rápidamente, el Hypaque es una sustancia densa que, diluida apropiadamente, confiere a la mezcla la densidad requerida para la separación.

Esta técnica ofrece una separación por densidad en bandas o zonas entre los glóbulos blancos y los glóbulos rojos, para ello se añade 3 ml de Ficoll - Hypaque (100 ml Ficoll 400: 5,7 g diatrizoato de sodio, 9 g edetato de calcio disódico en agua, Pharmacia Biotech) por cada 5 ml de la muestra de sangre tratando de no mezclar, y centrifugando a 3 000 g/ 30 min. Se transfirió la interfase de linfocitos, lavándose con buffer TE pH 7,5 (10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, 2 mmol·l⁻¹ EDTA) y se resuspendieron con el vortex. Posteriormente se centrifugó a 3 000 g/10 min y se descartó el sobrenadante, (este procedimiento se repitió dos veces) una vez realizado el lavado se resuspendieron las células en 1 ml de buffer TE y se guardaron en un vial eppendorf a -20 °C.

Extracción de ADN genómico

Con el fin de establecer un método eficiente de extracción de ADN, adecuado a las necesidades del laboratorio, se emplearon dos protocolos de extracción, de manera de obtener un ADN de alta pureza y óptima cantidad así como libre de enzimas para prevenir la degradación. Se empleó el método de Miller *et al.* (1988) y el protocolo de Welsh y Bunce (1999).

Protocolo de extracción de Miller *et al.* (1988).

Se resuspendió el paquete de glóbulos blancos en buffer de lisis de glóbulos blancos pH 8 (0,4 mol·l⁻¹ de NaCl, 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl), posteriormente el lisado celular se incubó durante toda la noche a 37 °C con 0,2 ml de SDS al 10% y 10 µl de una solución de proteinasa K. Se añadió 1 ml de NaCl saturado (6 mol·l⁻¹), se agitó rigurosamente por 15 seg y se centrifugó a 2 500 g durante 15 min. El sobrenadante (que contenía el ADN) se transfirió a otro tubo de 15 ml al cual se le agregó 2 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente y se agitó por inversión varias veces hasta que el ADN precipitó. Posteriormente el ADN es hidratado con buffer TE a pH 7,5.

Protocolo de extracción de Welsh y Bunce (1999).

Este método es una modificación del método propuesto por Miller *et al.* (1988) donde se suprime la digestión con proteinasa K y se añade una extracción con cloroformo.

Una vez obtenido el paquete de glóbulos blancos, se le agregó 9 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB) ($0,144 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de cloruro de amonio, $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de bicarbonato de sodio), se mezcló por inversión varias veces, se dejó reposar para luego congelar a -20°C por 30 minutos. Posteriormente, se descongeló y se centrifugó a $3\ 000 \text{ g}/15 \text{ min}$.

Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 2 ml de RCLB y se centrifugó a $3\ 000 \text{ g}/15 \text{ min}$. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en $600 \mu\text{l}$ de buffer de lisis de glóbulos blancos y dodecil sulfato de sodio (NLB+SDS) ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,2, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de EDTA disódico) luego se transfirió a un vial eppendorf, el cual se dejó incubando a 56°C durante toda la noche para disolver el precipitado.

Una vez disuelto el paquete de glóbulos blancos se le adicionó $100 \mu\text{l}$ de NaCl $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y se mezcló con el vortex, posteriormente se le agregó $600 \mu\text{l}$ de cloroformo para desnaturalizar las proteínas, se agitó con el vortex hasta formar una emulsión lechosa para centrifugar nuevamente a $3\ 000 \text{ g}/15 \text{ min}$.

Se tomó la fase acuosa, y se transfirió a un nuevo vial (si la fase acuosa se observó turbia, se agregó nuevamente $600 \mu\text{l}$ de cloroformo para desnaturalizar las proteínas que pudiesen estar presentes).

Se le adicionó 1 ml de etanol 100% (frío) y se agitó por inversión suavemente hasta observar la aparición de una malla de ADN, se incubó por 30 minutos a -20°C y posteriormente se centrifugó a $12\ 000 \text{ g}/5 \text{ min}$, descartándose el alcohol por inversión y añadiendo 1 ml de etanol 70% (frío), para luego centrifugar a $12\ 000 \text{ g}/5 \text{ min}$. Se

eliminó el alcohol y se dejó secar el tubo colocándolo invertido sobre un papel absorbente por 30 min.

Una vez seco el pellet de ADN, se le añadió 100 μl de agua ultra pura y se incubó por 15 min a 65°C. El ADN se almacenó por periodos cortos de tiempo a 4°C y a -2°C por periodos prolongados.

Cuantificación del ADN

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas, la cual se fundamenta en la movilidad diferencial de las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa.

La cuantificación del ADN se realizó en un gel de agarosa al 2%. Se pesaron 0,8 g de agarosa y se disolvieron en 40 ml de buffer TAE 1X (0,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-Acido Acético, 0,02 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pH 7,5), se coloreó con bromuro de etidio (10mg. ml^{-1}) y se agregó en el molde.

Se tomaron 3 μl de la muestra de ADN y se mezcló con 1,5 μl de buffer de carga. La corrida electroforética se realizó a 150V por 15 min. Posteriormente el gel de agarosa se observó en una lámpara de luz UV, donde se fotografió y se evidenció el recorrido del ADN.

Se usó un marcador de masa molecular de concentración conocida (Low DNA Mass Ladder) mezclado con un buffer de carga en una proporción 4:1, el tamaño y los ng de ADN de las muestras se estimaron por comparación con las bandas del marcador comprendidas entre 100 pb (5 ng) hasta 2000 pb (100 ng).

Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Es un método electroforético diseñado por Myers *et al.* (1987), utilizado para identificar cambios de bases en la secuencia del ADN de doble cadena a través del gel con concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes.

Durante la migración en el gel, cada uno de los fragmentos alcanza una temperatura de disociación denominada temperatura de melting que es específica de la secuencia. El ADN se disocia parcialmente en un punto determinado del gradiente, creando moléculas ramificadas, que permitan diferenciar un fragmento de ADN mutado con respecto a la secuencia normal. La disociación parcial del ADN mutado reduce su movilidad en un gel de poliacrilamida.

Puesto que la temperatura de disociación es específica de cada secuencia, la presencia de una mutación alterará el perfil de unión/disociación de ese fragmento de ADN mutado respecto al mismo fragmento normal provocando la visualización de bandas diferentes (homodúplex mutantes o heterodúplex). El fragmento mutado tendrá cambios en la movilidad respecto del ADN normal.

La corrida electroforética fue llevada a cabo en un gel de poliacrilamida al 6,5% a una temperatura uniforme de 60°C, 160 voltios y un gradiente de desnaturalización formado por la urea y la formamida (100% de desnaturalización: 7 mol·l⁻¹ de úrea, 40% de formamida) incrementando linealmente desde 30-80% para los fragmentos A, B, y C, y desde 10-60% para los fragmentos D, F y G. La urea y la formamida son compuestos polares compiten en la formación de enlaces de hidrógenos con los grupos amino y carbonilo propios de las bases, facilitando así la ruptura de sus apareamientos y la consiguiente separación de las hebras (Luque y Herraes, 2002).

Finalizada la corrida electroforética, el gel fue teñido con de bromuro de etidio (10 mg.ml⁻¹) y observado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El gen beta globina fue amplificado por PCR siguiendo el protocolo de Ghanem *et al.* (1992). La amplificación del gen se realizó desde la posición -238 hasta la +1666, incluyendo el sitio de poliadenilación. Para ello el gen fue dividido en seis fragmentos denominados como A, B, C, D, F y G, utilizándose para cada fragmento un par de oligonucleótidos específicos, de los cuales uno de ellos posee en su extremo 5' una cola de GC, necesaria para aumentar la temperatura de disociación de la hebra de ADN de cada fragmento.

La reacción de PCR se llevó a cabo para un volumen final de 50 μl , a la cual se le añadió buffer *GoTaq flexi* 1X (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,3; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelatina), cloruro de magnesio (MgCl_2) 3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, dNTP'S 0,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de cada oligonucleótido, *Taq* polimerasa *GoTaq flexi* 1,25 U y 100 ng de ADN.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer 2400) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 1 min e hibridación a 50 – 55°C por 1 min, de acuerdo al fragmento estudiado, seguido de 30 ciclos consecutivos de desnaturalización a 94°C por 1 min e hibridación a 50 – 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, con un periodo de extensión final de 72°C por 5 min.

Una vez finalizada la PCR, las muestras fueron corridas electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,6%, a 150 voltios por 15 minutos y posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y visualizado en luz ultravioleta.

El gen beta globina humano presenta cinco secuencias nucleotídicas que varían de un individuo a otro. Estos polimorfismos, considerados neutrales son llamados frameworks por algunos autores, por lo tanto, deben ser reconocidos e interpretados antes de determinar la presencia de mutaciones en el gen por DGGE.

De los cinco polimorfismos reconocidos, tres de éstos (IVSII-16, IVSII-74, IVSII-81) están localizados en el fragmento G; el framework 1 presenta las bases C, G, C; el framework 2 presenta las bases C, T, C; el framework 3 presenta las bases G, T, T y el

framework 3a las bases G, T, C (Tabla N° 1). Estas diferencias permiten una mejor caracterización y visualización de las bandas correspondientes al perfil migratorio de cada framework. Los fragmentos B, C y D contienen cada uno un sitio polimórfico (codón 2 C/T, IVSII-16, y IVSII-666 respectivamente). La secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de cada fragmento del gen β globina y el tiempo de corrida necesario para cada uno son descritos en la tabla 2.

Tabla 1. Composición nucleotídica que define los polimorfismos neutrales del gen β -globina. (Según Ghanem *et al.*, 1992)

| | CODON 2 | IVSII-16 | IVSII-74 | IVSII-81 | IVSII-666 |
|--------------|---------|----------|----------|----------|-----------|
| Framework 1 | C | C | G | C | T |
| Framework 2 | C | C | T | C | T |
| Framework 3 | T | G | T | T | C |
| Framework 3a | T | G | T | C | C |

Fragmentos de DGGE:

B: Codón 2; C: IVSII – 16; G: IVSII - 16, 74, 81; D: IVSII-666

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación del gen β globina. (Según Ghanem *et al.*, 1992)

| Frag | Secuencia de Oligonucleótidos | Pb | Hr |
|------|---|-----|----|
| A | A1: 5'-TTTAGTGCAATTTGTA CTGA-3' | 242 | 6 |
| | A2: 5'-GCCCTGGCTCCTGCCCTCCC-3'+ 40 GC | | |
| B | B1: 5' -CAGGAGCAGGGAGGGCAGGA-3'+ 40 GC | 307 | 6 |
| | B2: 5' -GTCTCCACATGCCCAGTTTC-3' | | |
| C | C1: 5' -GGTTTCTGATAGGCACTGAC-3'+ 60GC | 404 | 8 |
| | C2: 5' -CCTATTGACATGAACTTAACC-3' | | |
| D | D1: 5' -CTAATCTCTTTCTTTGATT-3' | 483 | 8 |
| | D2: 5' -TGGACAGCAAGAAAGCGAGC-3'+ 45 GC | | |
| F | E1: 5' -GGTTGGGATAAGGCTGGATT-3' | 404 | 8 |
| | F: 5' -CACTGACCTCCCACATTCCC-3' | | |
| G | G1: 5' - CTGGGCATGTGGAGACAGAG-3'+ 40 GC | 474 | 7 |
| | G2: 5' -CACTGATGCAATCATTTCGTC-3' | | |

PCR para secuenciación de ADN genómico

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl , a la cual se le añadió buffer *GoTaq flexi* 1X (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,3, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelatina), cloruro de magnesio (MgCl_2) 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, dNTP'S 0,25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de cada oligonucleótidos, Cl_1 (sentido) 5'-CACTGATGCAATCATTCGTC-3' y PCO_3 (antisentido) 5'-GCTGAGGGTTTGAAGTCCAA-3', que abarcan desde la posición -238 hasta la +621), *Taq* polimerasa *goTaq flexi* 1,25 U y 100 ng de ADN (Trabuchet *et al.*, 1991).

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 1 min e hibridación a 50 – 55°C por 1 min, de acuerdo al fragmento estudiado, seguido de 30 ciclos consecutivos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 50 – 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, con un periodo de extensión final de 72°C por 5 min.

Posteriormente, las muestras fueron purificadas aplicando el protocolo PCR Cleanup Column Kit de Maxim Biotech. Para ello, se mezclaron 3 volúmenes del buffer de unión de membrana con 1 volumen de producto de PCR, se agitó y se agregó 1 volumen de Isopropanol, luego se mezcló por inversión durante 5 min. Se transfirió la mezcla a la columna rotatoria dentro de un tubo de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó por 1 min a 10 000 g.

Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga nuevo y se agregó 500 μl de buffer de lavado, se centrifugó por 1 min a 10 000 g. Se transfirió la columna a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se le agregó 60 μl de buffer de elusión, se dejó reposar por 1 min y se centrifugó por un min a 10 000 g

Se usó un marcador de masa molecular (Low DNA Mass Ladder) mezclado con un buffer de carga en una proporción 4:1, los ng y concentración de ADN de las muestras se estimaron por comparación con las bandas del marcador.

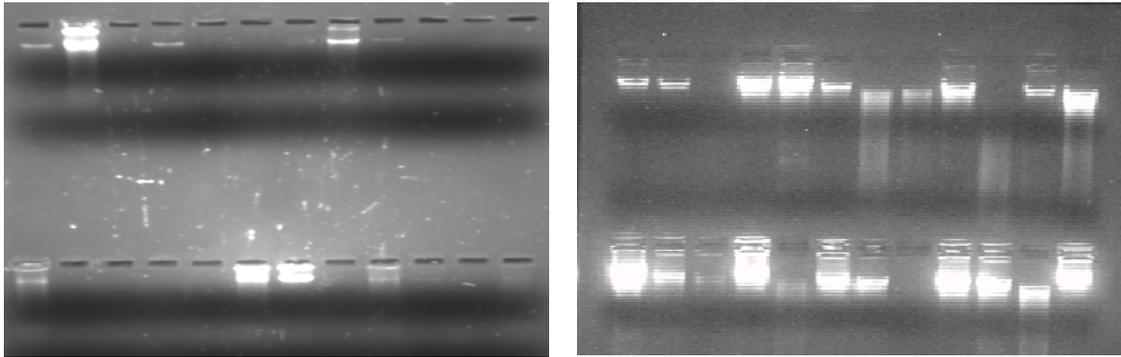
Secuenciación automática de ADN genómico

Las muestras fueron secuenciadas en un equipo automatizado ABI Prism 377, utilizando el método de terminación de cadena de Sanger *et al.* (1977). Este procedimiento se realizó en el Centro de Secuenciación de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

RESULTADOS

Estandarización de la extracción de ADN genómico

La extracción de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. Antes de implementar un método de extracción específico a cada una de las muestras, se aplicaron dos técnicas de aislamiento para obtener un ADN puro y en gran cantidad. Entre las técnicas aplicadas estuvieron el método de “salting out” propuesto por Miller (1988) (fig. 2A) y el método de extracción de Welsh y Bunce (1999) (fig. 2B).



A

B

Figura 2. A.- Electroforésis de ADN genómico extraído con el método de Salting Out, Miller (1988). B.- Electroforésis de ADN genómico extraído con el método de Welsh y Bunce (1999).

Diagnóstico de hemoglobinopatías

Un total de 871 pacientes referidos por problemas de anemia al Laboratorio de Investigación de hemoglobinas Anormales del Hospital Universitario de Caracas fueron estudiados empleando la técnica de cromatografía líquida de alta precisión de intercambio catiónico (HPLC-CE) utilizando el programa *β Thal Short*, de los cuales el 48% de los casos fueron diagnosticados con hemoglobinopatías y el 52% restantes presentaron Hb A, por lo que se infiere que el cuadro anémico en éstos era debido a

otras causas. La hemoglobinopatía encontrada en mayor proporción en este estudio fue la variante estructural S, la β talasemia fue hallada en segundo lugar (Figura 3).

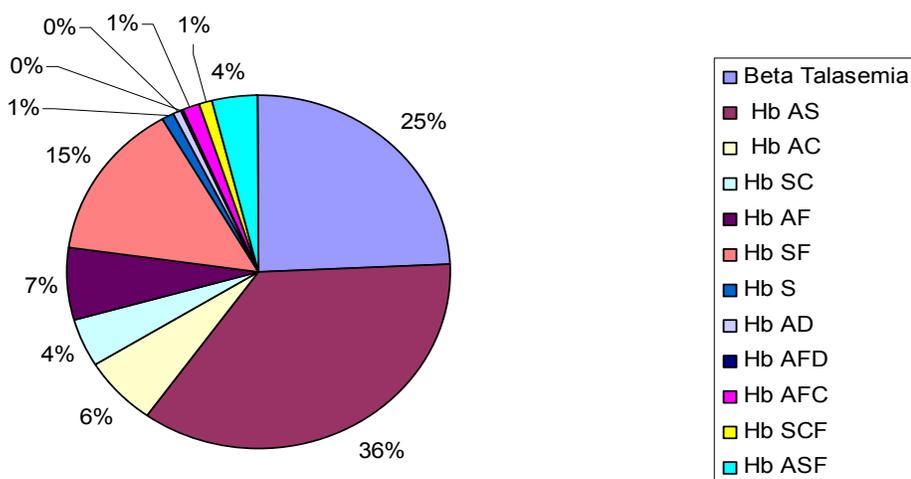


Figura 3. Frecuencia de hemoglobinopatías detectadas por HPLC-CE en pacientes referidos al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales.

El diagnóstico de la β talasemia se realizó tomando en cuenta el porcentaje de Hb A, Hb A₂, Hb F y los parámetros hematológicos, encontrando 54 pacientes que cumplieran con estos criterios.

De los 54 pacientes no relacionados, a 36 de ellos se les realizó el análisis molecular para definir el espectro de mutaciones por DGGE y secuenciación de ADN genómico, y 18 pacientes β talasémicos se estudiaron para definir el catálogo para las mutaciones -88 (C/T), CD39 (C/T) y IVSI-110 (A/G).

De los 36 pacientes estudiados para definir el espectro de mutaciones, 29 eran portadores de un cuadro de β talasemia menor, un paciente presentó β talasemia intermedia y seis pacientes presentaban asociación de la hemoglobina S con la β talasemia (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de los distintos tipos de beta talasemia detectadas por HPLC-CE

| Diagnóstico | Número de Pacientes | Frecuencia |
|---------------------------------|---------------------|------------|
| β Talasemia Menor | 29 | 80,5 |
| β Talasemia Intermedia | 1 | 2,8 |
| Hb S- β Talasemia tipo I | 2 | 5,6 |
| Hb S- β Talasemia tipo II | 4 | 11,1 |
| Total | 36 | 100,00% |

Para el estudio por DGGE, el gen β globina, fue dividido en seis fragmentos de manera de localizar la mutación dentro del gen.

Los patrones electroforéticos obtenidos por DGGE en 36 pacientes no relacionados son mostrados en las figuras 4, 5, 6, 7, 8 y 9. En cuatro pacientes se localizó la mutación en el fragmento A, en siete pacientes en el fragmento B, en 9 pacientes en el fragmento C, en tres pacientes en el fragmento D, en 1 paciente en el fragmento F, en dos casos el análisis sugiere la presencia de una delección, diez pacientes aún presentan análisis incompleto del gen β globina por DGGE.

El gen β globina humano normalmente presenta secuencias polimórficas llamadas *framework*. Cinco posiciones específicas han sido mapeadas, definiendo cuatro *frameworks*: 1 (Fr 1), 2 (Fr 2), 3 (Fr 3), 4 (Fr 3a). Para determinar el *framework* del gen β globina, las muestras fueron primero amplificadas mediante la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos G1 y G2, los cuales generan un fragmento que incluye tres de los cinco polimorfismos (nt 16, 74 y 81 de la IVS-II).

Las secuencias polimórficas obtenidas en cada uno de los pacientes estudiados fueron tomadas como referencia para el posterior análisis del correspondiente patrón electroforético generado por los fragmentos B, C, y D debido a que cada uno de ellos contienen alguno de los sitio polimórficos que definen estos frameworks (codón 2 C/T,

IVS2 nt 16 C/G, IVS2 nt 666 T/C, respectivamente. Las secuencias polimórficas obtenidas en cada uno de los pacientes estudiados fueron tomadas como referencia para el posterior estudio del gen β globina por secuenciación automatizada de ADN genómico (Tabla 4).

Análisis del gen β globina por DGGE

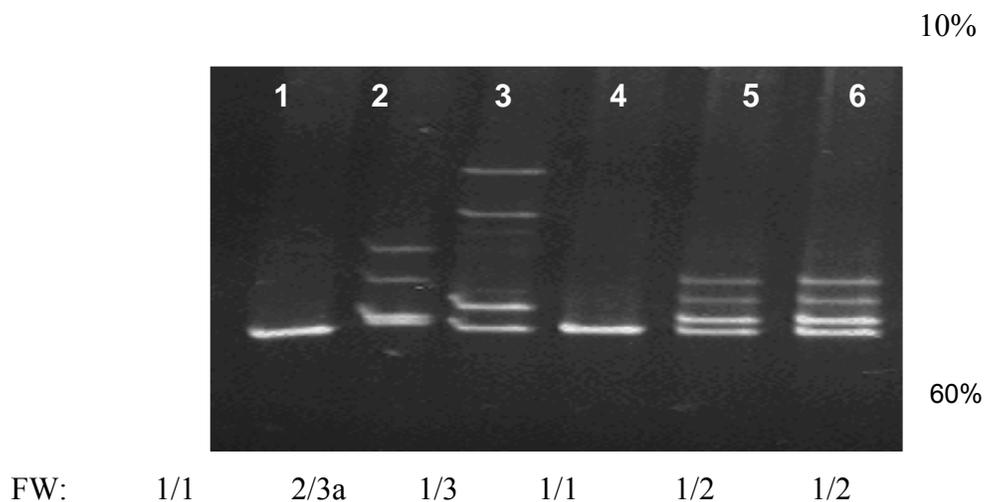


Figura 4. Patrones electroforéticos mostrando la combinación de los polimorfismos del ADN en el fragmento G de los pacientes analizados por DGGE. Líneas 1 y 4: pacientes mostrando un frente de corrida 1/1, Línea 2: paciente mostrando un frente de corrida 2/3a, Línea 3: paciente mostrando un frente de corrida 1/3. Líneas 5 y 6: pacientes mostrando un frente de corrida 1/2,

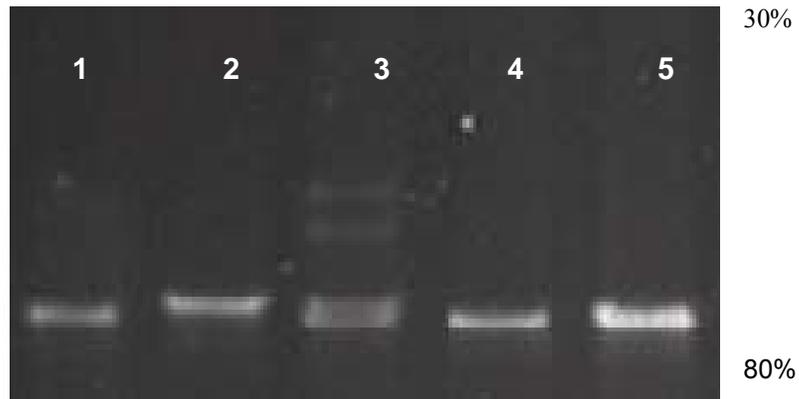


Figura 5. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento A de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 2, 4 y 5: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento A. Línea 3: ADN heterodúplex de un paciente mostrando la presencia de una mutación.

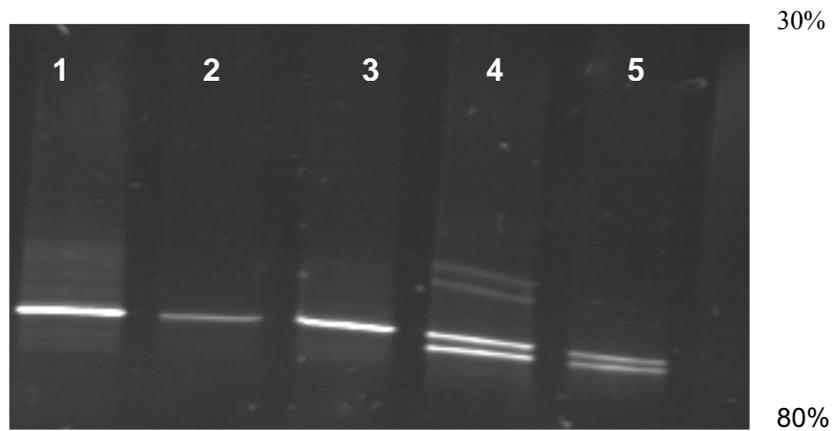


Figura 6. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento B de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 2, 3: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento B. Líneas 4 y 5: ADN heterodúplex de pacientes analizados por DGGE en el fragmento B.

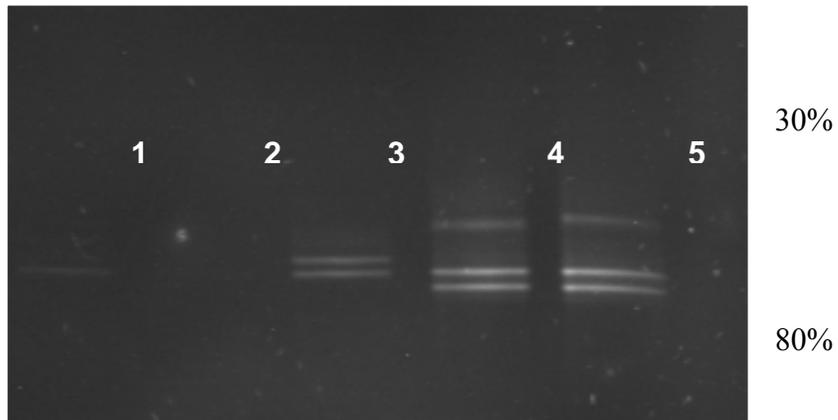


Figura 7. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento C de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 4, y 5. ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento C. Línea 3. ADN heterodúplex de un paciente analizado por DGGE.

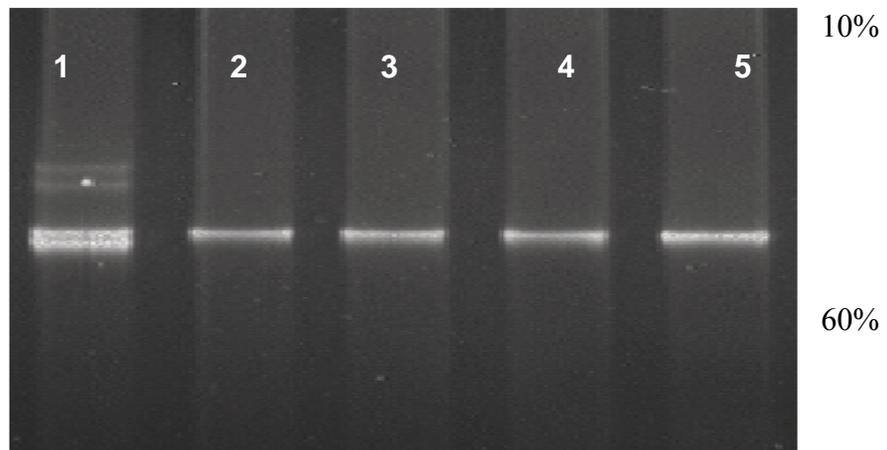


Figura 8. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento D de pacientes analizados por DGGE. Línea 1: ADN Heterodúplex de un paciente analizado en el fragmento D. Líneas 2, 3, 4, y 5: ADN homodúplex de pacientes analizados en el fragmento D por DGGE.

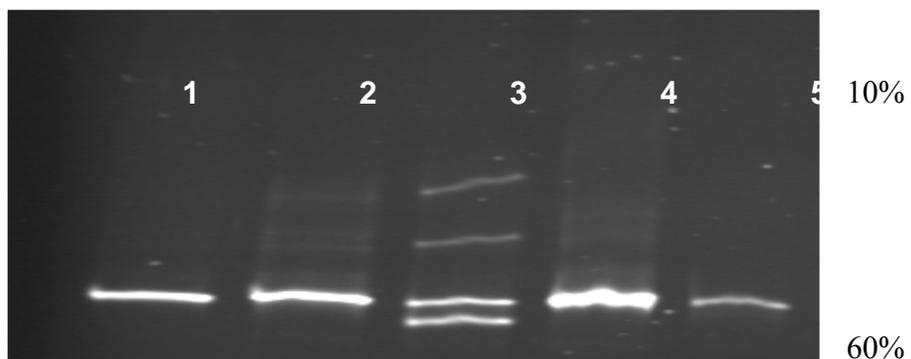


Figura 9. Patrones electroforéticos del ADN en el fragmento F de pacientes analizados por DGGE. Líneas 1, 2, 4 y 5: ADN homodúplex de pacientes analizados en el

fragmento F. Línea 3: ADN heterodúplex de un paciente mostrando la presencia de una mutación.

En la tabla 4 se muestra el análisis de los resultados obtenidos por DGGE en los 12 pacientes no relacionados a los cuales se les detectó la mutación presente.

Tabla 4. Análisis de los resultados obtenidos por DGGE en pacientes no relacionados. Los patrones anormales observados permiten la localización de la mutación para ser identificadas por secuenciación automática de ADN genómico.

| Muestras | DGGE G | DGGE A | DGGE B | DGGE C | DGGE D | Secuenciar |
|----------|--------|---------|---------|---------|---------|------------|
| 78782 | 2/2 | 1 banda | Homod | Heterod | Homod | C |
| 78304 | 1/1 | 1 banda | Homod | Heterod | Homod | C |
| 79561 | 1/3a | Heterod | Heterod | ----- | ----- | A |
| 79969 | 1/1 | 1 banda | Homod | Heterod | Heterod | C |
| 76489 | 2/2 | Heterod | Homod | Homod | ----- | A |
| 76492 | 2/3 | Heterod | Heterod | Homod | Homod | A |
| 80240 | 1/2 | 1 banda | heterod | Homod | Homod | B |
| 80272 | 1/1 | 1 banda | Homod | Heterod | Homod | C |
| 81132 | 1/3a | 1 banda | Heterod | Heterod | Homod | D |
| 81179 | 2/3a | 1 banda | Homod | ----- | ----- | B |
| 80974 | 1/2 | Heterod | Heterod | Homod | Homod | A |
| 79747 | 1/2 | ----- | Heterod | Heterod | Heterod | C |

*Homo: Homodúplex *Hetero: Heterodúplex

Identificación de mutaciones por secuenciación de ADN genómico.

En el análisis de los esferogramas obtenidos por secuenciación automática de ADN genómico, se evidencia la presencia de las mutaciones -86 (G/C), IVSII-1 (G/T), IVSI-110 (G/A), IVSI-5 (G/A) en 12 pacientes no relacionados (Figuras 10, 11, 12,13 y 14).

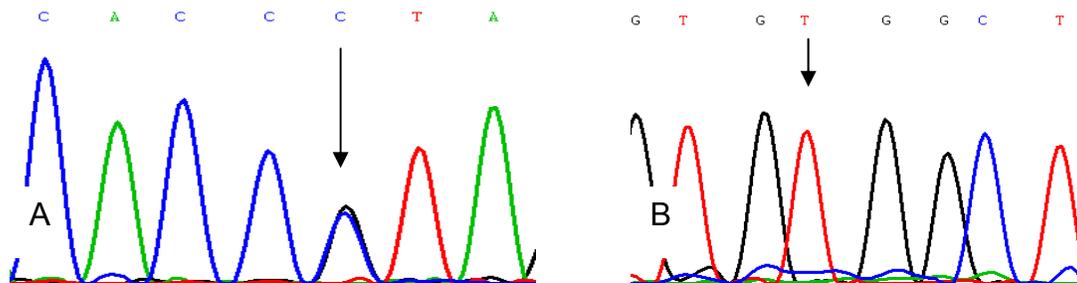


Figura 10. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina donde se muestra la presencia de la mutación -86 (G/C). La flecha indica la heterocigocidad para la



sustitución G → C en la posición -86 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido.

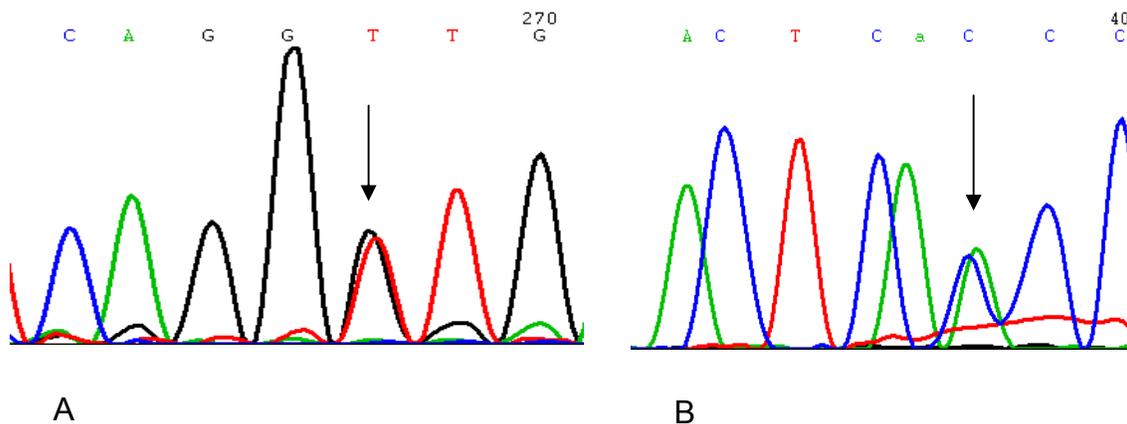


Figura 11. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina del paciente uno, se muestra la presencia de la mutación IVSII-1 (G/T). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G → T en la posición IVSII-1 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido.

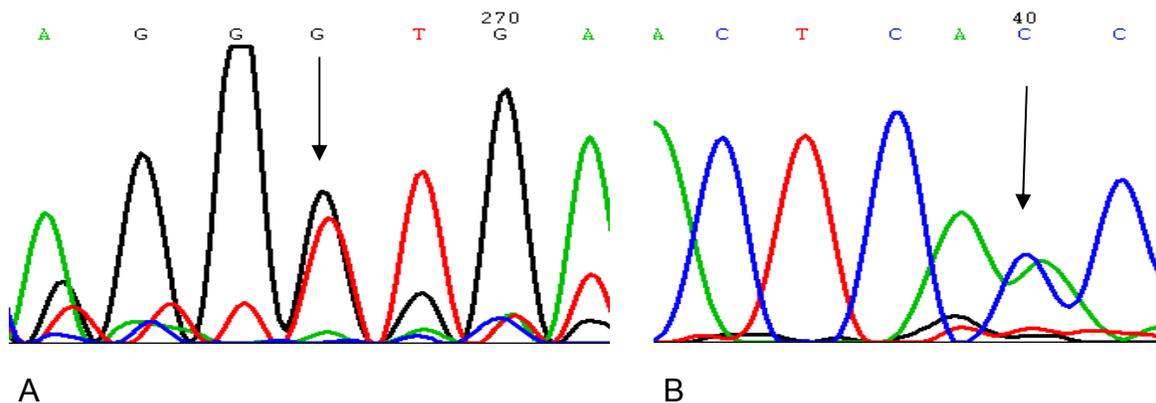


Figura 12. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina del paciente dos, se muestra la presencia de la mutación IVSII-1 (G/T). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G → T en la posición IVSII-1 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido.

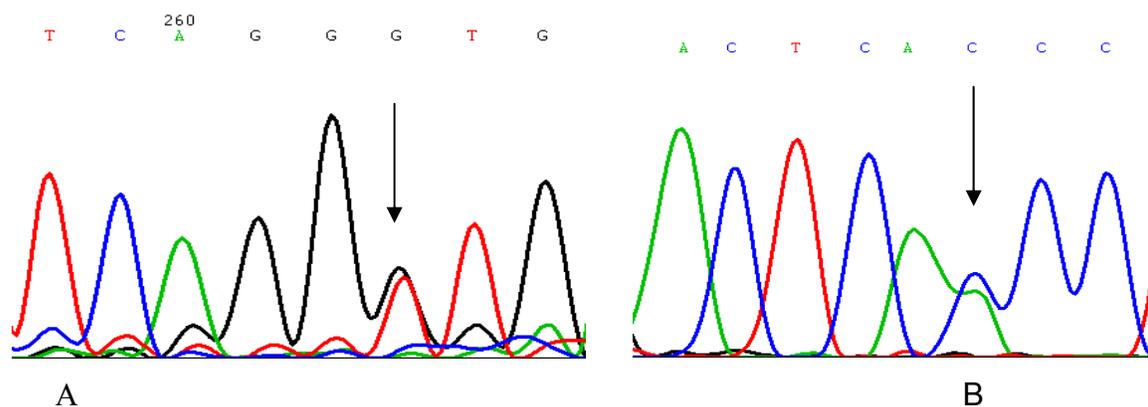


Figura 13. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina del paciente tres, se muestra la presencia de la mutación IVSII-1 (G/T). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G→T en la posición IVSII-1 del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido.

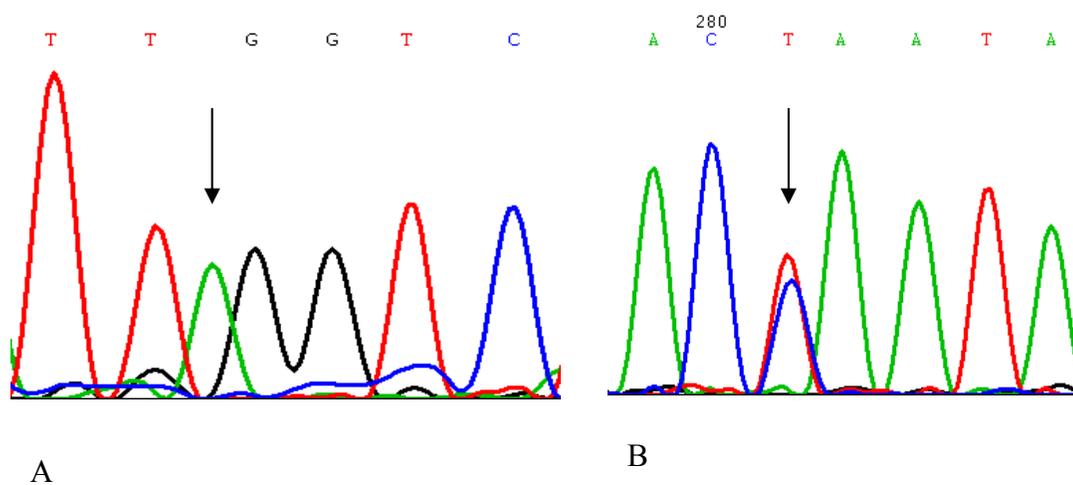


Figura 14. Esferogramas del análisis de secuencias del gen β globina donde se muestra la presencia de la mutación IVSI-110 (G/A). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G→A en la posición IVSI-110 (G/A) del gen β globina. (A) cadena sentido (B) cadena antisentido.

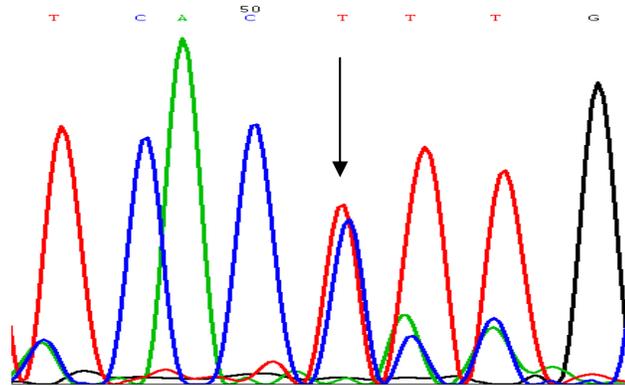


Figura 15. Esferograma del análisis de secuencias del gen β globina donde se muestra la presencia de la mutación IVSI-5 (G/A). La flecha indica la heterocigocidad para la sustitución G \rightarrow A en la posición IVSI-5 del gen β globina.

Tabla 5. Mutaciones, tipos, origen y frameworks estudiados por DGGE y secuenciación automatizada de ADN genómico en pacientes no relacionados.

| Muestras | Framework | Mutaciones | Tipo | Origen |
|----------|-----------|-----------------|-----------|--------------|
| 79561 | 1/3a | -88 (C/T) | β^+ | Africano |
| 76489 | 2/2 | -86 (G/C) | β^+ | Asiático |
| 76492 | 2/3 | -86 (G/C) | β^+ | Asiático |
| 80974 | 1/2 | -86 (G/C) | β^+ | Asiático |
| 80240 | 1/2 | IVSI-5 (G/A) | β^+ | Mediterráneo |
| 80272 | 1/1 | IVSI-110 (G/A) | β^+ | Mediterráneo |
| 78304 | 1/1 | IVSI-110 (G/A) | β^+ | Mediterráneo |
| 79969 | 1/1 | IVSI-110 (G/A) | β^+ | Mediterráneo |
| 78782 | 2/2 | IVSII-1 (G/T) | β^o | Africano |
| 79747 | 1/2 | IVSII-1 (G/T) | β^o | Africano |
| 81132 | 1/3a | IVSII-849 (A/G) | β^o | Africano |
| 81179 | 2/3a | CD 39 (C/T) | β^o | Mediterráneo |

En 12 pacientes no relacionados se logró identificar mutaciones por secuenciación automatizada de ADN genómico. Las mutaciones fueron la -88 (C/T) en un paciente, la -86 (G/C) en tres pacientes, la IVSI-5 (G/A) en un paciente, la IVSI-110 (G/A) en tres pacientes, la IVSII-I (G/T) en cuatro pacientes, de los cuales tres están relacionados (Fig 11, 12, 13); la CD 39 (C/T) en un paciente y la IVSII-849(A/G) también en un paciente (tabla 5).

La mutación IVSII-1 (G/T) se encontró en estado doble heterocigoto Hb S-β⁰ talasemia, esta misma mutación también se encontró en estado heterocigoto en la hija de la paciente y en una hermana con diagnóstico Hb S-β⁰ talasemia. Es la primera vez que se reporta esta mutación β talasémica en nuestro país, por ello la importancia de realizar el estudio familiar (figura 12, 13,14).

En los pacientes estudiados se identificaron siete mutaciones puntuales distintas, de las cuales tres mutaciones son de origen Africano, tres mutaciones de origen Mediterráneo y una de origen Asiático (tabla 8). Las mutaciones más frecuentes fueron la -86 (G/C) y la IVSI-110 (G/A), seguida de la mutación IVSII-1 (G/T), existen pacientes que aún permanecen en estudio pero ya han sido ubicadas las zonas dentro del gen donde se encuentra la mutación (tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de las mutaciones β talasémicas en pacientes no relacionados.

| Mutaciones | No. Alelos | Frecuencia (%) |
|------------------|------------|----------------|
| -86 (G/C) | 3 | 8,3 |
| -88 (C/T) | 1 | 2,8 |
| IVSI-5 (G/A) | 1 | 2,8 |
| IVSI-110 (G/A) | 3 | 8,3 |
| IVSII-1 (G/T) | 2 | 5,6 |
| IVSII-849 (A/G) | 1 | 2,8 |
| CD 39 (C/T) | 1 | 2,8 |
| No Identificados | 24 | 66,6 |
| Total | 36 | 100 |

En la tabla 7 se detallan los porcentajes de las diferentes hemoglobinas detectadas por HPLC-CE, de acuerdo al genotipo y al tipo de mutación presente.

Tabla 7. Porcentajes de hemoglobinas en pacientes con beta talasemia en pacientes relacionados

| Genotipo | Hb A (%) | Hb A2 (%) | Hb F (%) | Hb S (%) |
|--------------------|----------|-----------|----------|----------|
| -88 (C/T)/N | 78.9 | 5.7 | 6.6 | |
| -86 (G/C)/N | 82 | 5.9 | 1.5 | |
| -86 (G/C)/N | 83.8 | 6.3 | 1.6 | |
| -86 (G/C)/Hb S | 20.3 | 6.7 | 3.8 | 66.2 |
| IVSI-5 (G/A)/N | 81.6 | 4.4 | 1.4 | |
| IVSI-110 (G/A)/N | 79.4 | 4.4 | 2.4 | |
| IVSI-110 (G/A)/N | 76.9 | 4.7 | 7.4 | |
| IVSI-110 (G/A)/N | 78.6 | 4.7 | 8 | |
| IVSII-1 (G/T)/N | 78.6 | 4.7 | 8 | |
| IVSII-1 (G/T)/Hb S | 2.0 | 7 | 6.8 | 83.4 |
| IVSII-1 (G/T)/N | 85.2 | 5.9 | 1.1 | |
| IVSII-849 (A/G)/N | 82.6 | 6 | 1 | |
| CD 39 (C/T)/N | 83.3 | 6.1 | 1.2 | |

Las mutaciones causantes de la β talasemia identificadas en este estudio afectan los procesos de transcripción, procesamiento y traducción del ARN mensajero en cadenas globina, lo que impide la expresión correcta del gen β globina. Entre las mutaciones que afectan el proceso de transcripción se encuentran la -86 (G/C) y la -88 (C/T). Entre las mutaciones que afectan el procesamiento del ARN mensajero están las mutaciones localizadas en el primer y segundo intrón del gen β globina: IVSI-5 (G/A); IVSI-110 (G/A); IVSII-1 (G/T); IVSII-849 (A/G). Entre las mutaciones que afectan el proceso de traducción del ARN mensajero destaca la mutación CD 39 (C/T), la cual introduce un codón de terminación para la traducción del ARN mensajero (tabla 8 y figura 16).

En la figura 16 se ilustra la localización de las mutaciones encontradas en este estudio. Las mutaciones -86 (G/C) y -88 (C/T) afectan la región promotora del gen β globina; las mutaciones IVSI-5 (G/A), IVSI-110 (G/A) afectan el primer intrón del gen; las mutaciones IVSII-1 (G/T) y la IVSII 849 (A/G) afectan el segundo intrón del gen; la mutación CD 39 (C/T) afecta el segundo exón.

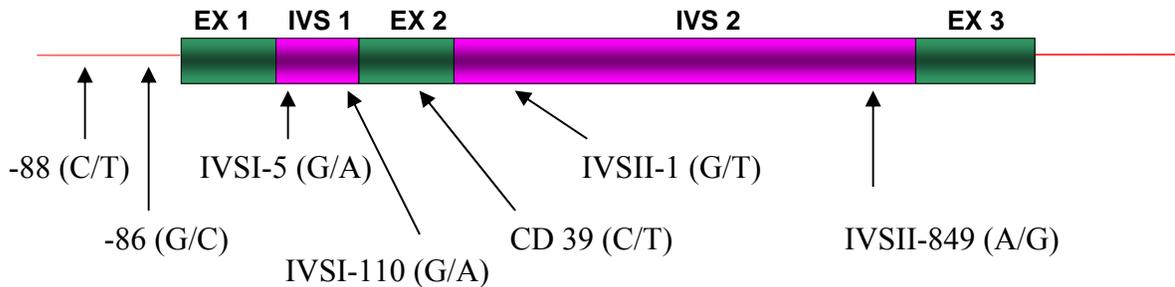


Figura 16. Localización esquemática de las mutaciones del gen β globina encontradas en este estudio.

Tabla 8. Clasificación de las mutaciones β talasémicas identificadas en este estudio según su clase, tipo y origen.

| Mutaciones | Tipo | Origen |
|---|-----------|--------------|
| Mutaciones que afectan el proceso de transcripción: | | |
| -88 (C/T) | β^+ | Africano |
| -86 (G/C) | β^+ | Asiático |
| Mutaciones que afectan el procesamiento del ARN: | | |
| Mutaciones en los sitios de corte y empalme | | |
| IVSI-5(G/A) | β^+ | Mediterráneo |
| IVSI-110(G/A) | β^+ | Mediterráneo |
| IVSII-1(G/T) | β^0 | Africano |
| IVSII-849(A/G) | β^0 | Africano |
| Mutaciones que afectan el proceso de traducción: | | |
| Mutaciones sin sentido | | |
| CD 39 (C/T) | β^0 | Mediterráneo |

Determinación del catálogo para las mutaciones CD39(C/T), IVSI-110 (G/A) y -88 (C/T).

El catálogo de mutaciones se realizó para determinar la asociación de cada una de las mutaciones estudiadas con un Framework específico; donde el perfil de migración dependerá de la combinación polimórfica presente. Los patrones electroforéticos para cada mutación estudiada son presentados en las tablas 9, 10 y 11.

Tabla 9. Perfil de migración obtenido por DGGE en pacientes con la mutación CD 39 (C/T).

| COD | HPLC | DGGE G | DGGE A | DGGE B | DGGE C | DGGE D | DGGE F |
|-------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 80274 | AA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 80997 | AA2 | 2/3a | Homo | Hetero | Hetero | ----- | Homo |
| 80390 | AA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 80684 | AA2 | 1/2 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 80261 | AA2F | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 89383 | AA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |

*Homo: Homodúplex

*Hetero: Heterodúplex

Los patrones electroforéticos obtenidos de los seis pacientes talasémicos diagnosticados con la mutación CD 39 (C/T) muestran que un 66,6% presentan asociación con el patrón de migración electroforético 1/1, un 16,6% presentan una asociación con el patrón de migración electroforético 1/2 y un 16,6% muestra una asociación al patrón de migración electroforético 2/3a.

Tabla 10. Perfil de migración obtenido por DGGE en pacientes con la mutación IVSI-110 (G/A).

| COD | HPLC | DGGE G | DGGE A | DGGE B | DGGE C | DGGE D | DGGE F |
|-------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 79969 | AFA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 80272 | AA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 76115 | AFA2 | 1/2 | Homo | Homo | Hetero | Hetero | Homo |
| 76089 | AA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 76071 | AFA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |
| 76091 | AA2 | 1/1 | Homo | Homo | Hetero | Homo | Homo |

*Homo: Homodúplex

*Hetero: Heterodúplex

Los patrones electroforéticos obtenidos de los seis pacientes talasémicos diagnosticados con la mutación IVSI-110 (G/A) muestran que un 83,3% presentan asociación con el patrón de migración electroforético 1/1 y un 16,7% muestran asociación con el patrón de migración electroforético 1/2.

Tabla 11. Perfil de migración obtenido por DGGE en pacientes con la mutación -88(C/T) analizados por DGGE.

| COD | HPLC | DGGE G | DGGE A | DGGE B | DGGE C | DGGE D | DGGE F |
|-------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 78816 | AA2 | 2/2 | Hetero | Homo | Homo | Homo | Homo |
| 77362 | AFA2 | 2/3a | Hetero | Hetero | ----- | Hetero | Homo |
| 81066 | AA2 | 1/2 | Hetero | Homo | Homo | Homo | Homo |
| 77307 | AFA2 | 2/3a | Hetero | Hetero | Hetero | Hetero | Homo |
| 79327 | AFA2 | 2/3a | Homo | Hetero | Hetero | Hetero | Homo |
| 80342 | AA2 | 1/2 | Hetero | Homo | Homo | Homo | Homo |

*Homo: Homodúplex

*Hetero: Heterodúplex

Los patrones electroforéticos obtenidos de los seis pacientes talasémicos diagnosticados con la mutación -88 (C/T) muestran que un 50% mostraron asociación con el patrón de migración electroforético 2/3a., un 33,3% muestran una asociación con el patrón de migración electroforético 1/2 y un 16,6% con el patrón de migración electroforético 2/2.

DISCUSIÓN

La primera etapa de este estudio consistió en la estandarización de un protocolo de extracción del ácido desoxirribonucleico genómico con el fin de obtener una solución de ADN de concentración y pureza óptima para el estudio por biología molecular. Para ello, se estandarizaron dos protocolos, el protocolo de “salting out” propuesto por Miller et al. (1988), y el otro fue una modificación del “salting out” (Welsh y Bunce, 1999). Este último fue el método seleccionado, donde la proteinasa K fue sustituida por una serie de lavados con cloroformo, para provocar un choque hidrofóbico con la posterior naturalización de las proteínas. Este método es sencillo, práctico, económico y permite obtener una gran cantidad de ADN de alta pureza y rendimiento en poco tiempo (Celaya, 2008).

La extracción se hizo a partir de leucocitos de sangre periférica y se empleó un procedimiento de lisis idóneo que consistió en un equilibrio de técnicas que fueron lo suficientemente suaves para preservar el ácido nucleico protegiéndolo de la degradación, pero lo suficientemente fuertes para romper la membrana celular y nuclear.

Uno de los obstáculos encontrados al extraer el ADN fue lograr una eficaz desproteinización celular e impedir la degradación. Por otro lado, la desventaja de utilizar solventes orgánicos potencialmente tóxicos como el fenol e isoamilcloroformo radica en la utilización de condiciones de máxima seguridad durante la extracción.

Estudio molecular de la β talasemia

Estudios a nivel molecular han permitido dilucidar el origen y formas de transmisión de algunas enfermedades de origen genético entre las que se pueden mencionar las talasemias, con el fin de ofrecer un diagnóstico, tratamiento y formas de prevención a cada una de las personas que resulten con esta patología.

La β talasemia es un grupo de alteraciones congénitas de carácter autosómico recesivo extremadamente heterogéneas desde el punto de vista clínico, hematológico y genético, observadas principalmente en personas de origen mediterráneo, Africano, Asiático y en sus descendientes; es caracterizada por una reducción total o parcial de la

síntesis de una o más subunidades β de la molécula de hemoglobina. Esta reducción varía en cada paciente lo que hace a la β talasemia clínica y molecularmente compleja, la predicción del fenotipo a partir del genotipo ha proporcionado importantes aportes para el consejo genético y diagnóstico prenatal, así como el establecimiento del tratamiento apropiado.

Clínicamente, los pacientes β talasémicos cursan con anemia, microcitosis, hipocromía y en algunos casos niveles elevados de hemoglobina A_2 y hemoglobina fetal, por lo que la determinación de los niveles de estos parámetros se ha convertido en la forma más idónea para su diagnóstico. Los pacientes estudiados en la presente investigación presentaron niveles de hemoglobina A_2 entre 4,4 – 7,2%, a excepción de un paciente cuyo valor de hemoglobina A_2 estaban dentro del rango normal. Sus síntomas pueden variar desde un individuo asintomático con anemia leve, hasta aquel con debilidad, cansancio, palidez e ictericia. Existen otras manifestaciones clínicas que dependen de la severidad de la enfermedad, como lo son las deformaciones óseas en individuos con talasemia mayor (Weatherall y Clegg, 1996).

La fisiopatología de la β talasemia básicamente está relacionada con la disminución de la síntesis de las cadenas β de la hemoglobina y la precipitación de cadenas α en forma de inclusiones que dañan la membrana eritrocitaria provocando eritropoyesis inefectiva y la lisis de los glóbulos rojos, característica principal de esta enfermedad (Weatherall y Clegg, 2001), dando como resultado eritrocitos pequeños y pálidos, por lo que la detección de esta enfermedad desde el punto de vista clínico está basada generalmente en la determinación de los valores del volumen corpuscular medio (VCM) y de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

La disminución de la síntesis de las cadenas de globina puede variar expresando distintos síntomas β talasémicos; se han propuestos varios mecanismos patofisiológicos entre los que destacan una disminución o producción anormal del ARN mensajero con una o más sustituciones en los codones provocando un retraso en la iniciación,

elongación o terminación disminuyendo así la transcripción de la nueva cadena β globina.

En la β talasemia, las mutaciones se dan en distintas zonas del gen, afectando distintos procesos durante la síntesis de la proteína. Es regionalmente específica, producida en un 95% por mutaciones puntuales; aproximadamente 200 mutaciones puntuales distintas a nivel mundial han sido descritas y 14 deleciones causantes de este trastorno con un espectro específico en cada región (Rahimi *et al.*, 2006).

Las talasemias se describieron en Venezuela en 1957, tanto en italianos residentes (Romer, 1958) como en la población nativa (Arends, 1960). En estudios de más de cuatro décadas, Arends (1962, 1963, 1969, 1971b), Arends *et al.* (1987, 1990), y Arends *et al.* (1998, 2000) demostraron que la α y β talasemia menor estaban asociadas a las hemoglobinas S y C, y a la esferocitosis hereditaria. Esto fue encontrado en familias con ancestros de origen italiano, francés y español, así como también en familias nativas, producto de la mezcla de los tres troncos raciales: indígenas, africanos y caucásicos con una frecuencia beta talasémica estimada en 1,4% (Arends, 1984).

La frecuencia β talasémica en poblaciones indígenas, de origen africano y mestizas reportada por Arends, (1984) fue de 1,4%. La frecuencia encontrada en este estudio fue de 1,8%, obtenida empleando el HPLC-CE como herramienta de estudio de variantes hemoglobínicas y β talasemia. La ventaja de este método en comparación con los métodos convencionales de electroforesis de hemoglobina radica en poder separar y cuantificar las diferentes fracciones de hemoglobinas normales y anormales así como la cuantificación de Hb A₂, realizada anteriormente por cromatografía en micro-columna, además, permite diferenciar la Hb A₂ de la Hb C, obteniendo un patrón de resolución completamente diferente. Con el método convencional de electroforesis a pH alcalino, estas hemoglobinas migran en la misma posición, dificultando un diagnóstico acertado acerca de la β talasemia presente y su asociación con otras hemoglobinopatías, por lo que era imposible la clasificación de los pacientes doble heterocigoto Hb S- β Tal de acuerdo a los niveles de Hb A.

En estudios realizados por Bravo *et al.* (2008), aplicando distintas técnicas de biología molecular, como la *ARMS-PCR* (oligonucleótidos alelo específico) (Fortina *et al.*, 1992; Old *et al.* 1990), *Reverse Dot blot* (sondas alelo-específicos) (Maggio *et al.*, 1993), análisis con enzimas de restricción, entre otras, encontraron que las mutaciones beta talasémicas más frecuentes en Venezuela fueron la CD 39 (C/T) 35,1%, la IVS1-1 (G/A) 11,5%, la IVS1-6 (T/C) con 6,9% y la IVS1-110 (G/A) 6,9%, todas éstas de origen mediterráneo y las mutaciones de origen africano, la IVSII-849 (A/G) 6,9%, -29 (A/G) 5,3%, -88 (C/T) 5,3%.

Sin embargo, debido a que esta enfermedad es muy diversa a nivel molecular con una continua aparición de alelos poco frecuentes, se aplicó una estrategia de estudios para la detección de mutaciones como las técnicas de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) que está basada en la separación de la doble cadena del ADN mediante un gradiente desnaturización proporcionando diferencias migratorias entre moléculas con secuencias distintas, complementada con la secuenciación de ADN genómico para la identificación de polimorfismos y mutaciones β talasémicas en el gen beta globina.

La técnica de DGGE tiene la ventaja de detectar cambios de bases en la molécula de ADN, siendo una de las más confiables para ser aplicada en este campo de la investigación. Esta ha sido aplicada exitosamente en China, norte de Europa, Sardinia y en poblaciones del Mediterráneo (Cai y Kan, 1990; Loosekot *et al.*, 1990; Rosatelli *et al.*, 1992).

Por medio de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante y secuenciación automatizada de ADN genómico se logró la detección e identificación de las mutaciones de origen africano -86 (G/C), encontrándose en un 8,3%, la mutación -88 (C/T) representando, un 2,8% del total de mutaciones encontradas. Estas mutaciones afectan el proceso de transcripción del gen beta globina. También se encontraron mutaciones de origen mediterráneo, la IVS1-5 (G/A) con un 2,8%, la IVS1-110 (G/A) con 8,3%, la IVSII-1(G/T) con 5,6%, la IVSII-849 (G/A) con 2,8%, todas estas

mutaciones afectan el procesamiento del ARNm; la CD 39 (C/T) se encontró en un 2,8% de los casos, esta mutación introduce un codón de terminación y afecta el proceso de traducción del ARN. Todas estas mutaciones fueron descritas anteriormente por otros autores en países europeos y el continente africano.

La mayoría de la población venezolana es producto de la mezcla de indígenas, colonos españoles y esclavos africanos, pero con la posterior contribución de inmigrantes italianos, españoles y portugueses, la población se ha vuelto multirracial. Algunos navíos de esclavos vinieron directamente de África a Venezuela y más tarde los esclavos fueron traídos como consecuencia de transacciones lícitas comerciales con las Antillas, para servir en la agricultura y trabajos mineros. También llegaron esclavos fugitivos provenientes de Curazao y Trinidad que permanecieron libres en la selva, eran muy agresivos y eran llamados “negros cimarrones”, quienes más tarde formaron comunidades aisladas que aún hoy en día se encuentran en las montañas. Igualmente, durante el tiempo de la esclavitud proliferó en Venezuela el tráfico ilegal de africanos a tierra firme (Acosta-Saignes, 1967).

No se ha demostrado que los síndromes talasémicos tengan algún origen en poblaciones Sudamericanas, por lo que esta heterogeneidad molecular observada en la población Venezolana está íntimamente ligada a la colonización, donde los españoles y los negros africanos fueron los dos grupos inmigratorios más importantes en la conformación de la población venezolana después del descubrimiento, conquista y colonización; intensificándose la presencia de estos últimos con el desarrollo creciente de las plantaciones de cacao en las zonas costeras introduciendo en el país las variantes hemoglobínicas S y C, las cuales son francamente patológicas. La variante S se encuentra en alto porcentaje, en algunas poblaciones aisladas mostrando un patrón de distribución ligado al desplazamiento de las poblaciones dentro del país; se ha estimado su frecuencia hasta un 19% en algunas poblaciones de origen africano (Arends *et al.*, 1978; Arends, 1971a; Salazar-Lugo, 2004).

La β talasemia puede estar asociada frecuentemente a variantes hemoglobínicas como la S y la C. En este sentido, Arends *et al.* (1998) observaron un gran número de pacientes doble heterocigotos Hb S- β talasemia en la población venezolana, determinando la presencia de los tres fenotipos propuestos por Weatherall *et al.* (1981), dependiendo del porcentaje de hemoglobina A presente, Hb S- β talasemia tipo I cuando se encuentra porcentajes de Hb A en rangos de 10-15%, Hb S- β talasemia tipo II cuando se hallaba la hemoglobina A en valores de 15-30% y el Hb S- β^0 talasemia donde no hay producción de Hb A, presentando mayor severidad de la enfermedad debido a la presencia de grandes cantidades de Hb S, lo que conduce a la aparición del fenómeno de siclemia.

La variabilidad clínica de los pacientes Hb S- β talasemia puede estar determinada, en parte, por el tipo de mutación β talasémica presente ya que existen mutaciones supresoras (β^0) y mutaciones que disminuyen la síntesis de las de cadenas β globina (β^+), de allí la importancia de determinar el tipo de mutación β talasémica presente en cada caso. En este estudio se encontró que aproximadamente el 66,6% de los pacientes Hb S- β talasémicos fueron clasificados dentro del grupo de los S β^+ talasemia tipo II y un 33,4% fueron del tipo S β^+ talasemia tipo I.

En uno de los pacientes catalogados como Hb S- β talasemia tipo II se determinó que la mutación β talasémica que presentaba era la -86 (G/C), dicha mutación es de tipo β^+ , localizada en el nucleótido -86 relativo con el sitio CAP ubicado en la región promotora afectando el proceso de transcripción del gen beta globina disminuyendo la unión de factores de transcripción, lo que provoca niveles bajos de Hb A cuando se encuentra asociada a la variante estructural S. Esta mutación es de origen asiático y su mayor frecuencia ha sido reportada en el Líbano y Tailandia en 0,24% (Thein, *et al.*, 1990).

Por otra parte, la expresión clínica de los pacientes doble heterocigotos Hb S- β talasemia está también relacionada con la expresión de los genes γ globina que producen un incremento en los niveles de la hemoglobina fetal presente (Schiliro *et al.*, 1995). En

este estudio se observó un amplio rango de niveles de Hb F en los grupos de pacientes Hb S β talasemia encontrándose los niveles más elevados en los pacientes diagnosticados como S- β talasemia tipo I.

La mutación -88 (C/T) es de tipo β^+ y afecta el nucleótido -88 relacionado de igual forma con el sitio CAP ubicado en la región promotora, disminuyendo la tasa de transcripción del gen beta globina, ya que disminuye la unión de los factores de transcripción (Orkin *et al.*, 1984; González Redondo *et al.*, 1988). En el fenotipo del heterocigoto se evidencia los típicos rasgos talasémicos, mientras que la condición del individuo homocigoto es caracterizada por una relativa talasemia intermedia. Los altos valores de hemoglobina A₂ y hemoglobina F reflejan la inadecuada unión de los factores de transcripción a la región promotora del gen beta globina.

Los niveles de hemoglobina A observados en pacientes con Hb S- β talasemia depende de la mutación β talasémica presente. La mayoría de las personas con ascendencia africana presentan las mutaciones en la región promotora causando una leve reducción en la producción de las cadenas beta globina, asociada a niveles de hemoglobina A en un 20% (González-Redondo *et al.*, 1988).

La mutación IVSI-5 (G/A) es de tipo β^+ y afecta el proceso de corte y empalme del ARN, generando defectos en el sitio 5'. Está encontrada en el subcontinente Indio, siendo la mutación con más prevalencia alrededor de Pakistán e India y su distribución varía de manera radical de un país a otro. En españoles se ha reportado una frecuencia de 0,93%, en poblaciones de Algeria en un 0,90% al igual que en Tunisia (Lapoumériou *et al.*, 1986).

La mutación IVSI-110 (G/A) es de tipo β^+ y afecta el proceso de corte empalme, generando defectos en el sitio 3' del donante. Provoca la reducción de hasta un 90% de la síntesis de la cadena β globina, requiriéndose transfusiones periódicas a los pacientes homocigotos. En países como Grecia, Turquía y Macedonia se ha reportado esta mutación con más de un 42% del total de alelos talasémicos.

La mutación IVSII-1 (G/T) es de tipo β^0 , fue reportada por Giordano (comunicación personal, 2007), hallándola asociada a la mutación -88 (C/T) en una niña de 13 años de Surinam. En este estudio se reporta el hallazgo de esta mutación en la población venezolana, fue diagnosticada en cuatro pacientes, de los cuales tres estaban relacionados. En dos de estos pacientes en estado heterocigoto y en dos pacientes se encontró asociada a la variante estructural S, provocando un fenotipo de Hb S- β talasemia tipo 0.

La mutación IVSII-849 (A/G) es de tipo β^0 , en personas de raza negra con β talasemia es hallada en el 2,34% de los casos, esta mutación ocurre en uno de los dinucleótidos invariables AG necesario para el empalme correcto del ARN mensajero, al ser suprimido este proceso no existe producción de un ARN normal (Antonarakis *et al.*, 1984).

La mutación CD39 (C/T) esta localizada en el codón 39 del segundo exón del gen β globina, es del tipo β^0 y afecta el proceso de traducción del ARNm introduciendo un codón de terminación produciendo una proteína no funcional. Estudios realizados en Italia por Rosatelli (1992) indican que esta mutación representa el 95,7% del total de las mutaciones causantes de β talasemia en este país.

El perfil migratorio obtenido en cada uno de los pacientes para las distintas mutaciones estudiadas en el catálogo de mutaciones varía de acuerdo al polimorfismo presente. Es de esperarse que en pacientes con la misma mutación, y presenten igual polimorfismo, mantengan similares perfiles de migración en el fragmento del gen estudiado.

No todas las mutaciones poseen un polimorfismo específico, la mutación -88 (C/T) está asociada con el *framework* 1 en poblaciones mediterráneas, al *framework* 3a en poblaciones asiáticas y al *framework* 2 en poblaciones Africanas (Losekoot *et al.*, 1992).

En esta ocasión, como era de esperarse, la mutación -88 (C/T) se encontró asociada al *framework* 2, debido a que es una mutación de origen africano, confirmando, una vez

más, que la población venezolana tiene un alto componente africano en su pool de genes.

La mutación IVSI-110 (G/A) se observa asociada al *framework* 1, tal como lo señalan estudios realizados por Moreira *et al.* (1997), quien mediante secuenciación automatizada de 225 cromosomas de individuos de ascendencia mediterránea, demostró la correlación entre de la mutación IVSI-110 con este polimorfismo.

La mutación CD39 (C/T) se observa asociada al *framework* 1 y en algunos casos al *framework* 3, tal como lo señalan estudios realizados por Moreira *et al.* (1997), quien mediante secuenciación automatizada de 225 cromosomas de individuos de ascendencia mediterránea, demostró la correlación entre la mutación CD 39 y los *frameworks* 1 y 3.

La combinación de la PCR con subsecuentes técnicas analíticas como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, han probado ser particularmente útiles en la detección de mutaciones responsables de enfermedades genéticas. Estas técnicas son utilizadas para determinar el área del gen en la cual está localizada la mutación, la misma región que subsecuente será amplificada y secuenciada.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) es un método apropiado para la separación de cadenas de ADN que difieren de pequeños cambios nucleotídicos permitiendo la detección de la mutación en el gen beta globina humano. La localización de las mutaciones dentro del gen β globina evita la secuenciación del gen en todos los casos, además, permite el análisis simultáneo de varios fragmentos con el fin de que en pocas corridas electroforéticas se estudie el gen en completo.

Además de las aplicaciones directas para la detección de mutaciones puntuales responsables de enfermedades genéticas, la DGGE también ha proporcionado grandes avances en estudios genéticos relacionados con el diagnóstico de enfermedades genéticas.

El costo de los análisis moleculares es relativamente elevado y por esto, las estrategias de detección de las mutaciones deben ser establecidas de acuerdo a cada país. Por esta razón, es recomendable hacer un estudio inicial de mutaciones básicas (las más frecuentes) en los pacientes de una población, y de resultar negativo este análisis, se

debe proceder al estudio del gen por métodos analíticos como la DGGE y secuenciación de ADN genómico.

CONCLUSIONES

La técnica cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC-CE) permite analizar y cuantificar simultáneamente las Hb A, Hb A2 y Hb F, así como alguna variante de hemoglobina, en una sola preparación, lo cual se traduce en un menor tiempo y mayor economía, además, es el único método que permite diferenciar a la Hb A2 de la Hb C, obteniendo un patrón de resolución completamente diferente.

Por medio de la DGGE y secuenciación automatizada de ADN genómico se detectaron e identificaron siete mutaciones puntuales, tres de origen Africano, tres de origen Mediterráneo y una de origen Asiático.

El origen de las mutaciones β talasémicas detectadas en la población Venezolana pone una vez más en manifiesto la existencia de los distintos troncos raciales encontrados en nuestro país.

Después de la variante estructural S, la β talasemia es la segunda hemoglobinopatía con más frecuencia en Venezuela.

En este estudio aproximadamente el 6% de los paciente Hb S- β talasemia pertenecían al grupo de los S- β talasemia tipo I y un 12 % fueron de tipo S- β talasemia tipo II.

La variabilidad clínica de los pacientes talasémicos y la de los pacientes asociados a variantes estructurales depende del tipo de mutación β talasémica.

En la población venezolana, la mutación -88 (C/T) está asociada al perfil de migración electroforético 2, poniendo de manifiesto nuestra ascendencia africana.

La mutación CD 39 (C/T) se halla asociada al perfil de migración electroforético 1.

La mutación IVSI-110 (G/A) está asociada al perfil de migración electroforética 1.

La combinación de la DGGE con la secuenciación de ADN genómico forman una de las herramientas más confiables para el diagnóstico de mutaciones causantes de β talasemia.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta- Saignes, M. 1967. *Vida de los esclavos en Venezuela*. Ed. Hesperides. Caracas. Venezuela. p 251-296.
- Amselem, S.; Nuñez, V.; Vivaud, M.; Estivill, X.; Wang, C. D' Auriol, L.; Vivaud, D.; Galibert, E.; Baiget, M. y Goossens, M. 1988. Determination of spectrum of beta thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta globin DNA. *Am J Genet*, 43: 94-100.
- Antonarakis, S.; Orkin, S.; Cheng, T.; Scott, A.; Sexton, J.; Trusko, S.; Charache, S. y Kazazian, H. 1984. Beta-thalassemia in American Blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 81(4):1154-1158.
- Arends, A.; Álvarez, M.; Velásquez, D.; Bravo, M.; Salazar, R.; Guevara, J. y Castillo, O. 2000. Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alfa-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. *Am J Of Haematol*, 64:87-90.
- Arends, A.; Bravo, M.; Álvarez, M.; Velásquez, D.; Salazar, R.; Guevara, J. y Castillo, O. 1998. Origin and prevalence of β talasemia in Venezuela. 27th Congress of the International Society of Hematology and the 3rd Congress of the European Hematology Association. Amsterdam, Netherland. *Br. J. Haematol*. 102:48 (Abstract).
- Arends, T. 1960. Talasemia en Venezolanos nativos. *Gac Med Caracas*, 69:333.
- Arends, T. 1962. Frecuencia de hemoglobinas anormales en Venezuela. *Acta Cient Venezol*, 1:46-57.
- Arends, T. 1963. Estado actual del estudio de las hemoglobinas anormales en Venezuela. *Sangre*, 8:1.
- Arends, T. 1969. Epidemiology of hemoglobina variants in Venezuela. 1st Inter-Amer Symp Hemoglobins, Caracas. 82-98.
- Arends, T. 1971a. Epidemiology of hemoglobin variants in Venezuela. En: Arends T. Bemski, G. Nagel, R. Eds. Genetical, functional and physical studies of hemoglobin. Karger, Basel Swizerland. Págs 82-98.
- Arends, T. 1971b. *Hemoglobinopathies and enzymes deficiencies in Latin American population. The ongoing evolution of Latin American populations*. Copyright 1971 by Charles C. Thomas publishes.

- Arends, T.; Gallango, M.; Muller, A.; González, M. y Pérez, O. 1978. Tapipa: *A negroid Venezuelan isolate*. En: Meyer RJ, Otten CM, Ab del Hameed F Eds. *Evolutionary Models and Studies in Human Diversity*. The Hague, Mouton. P 570-573
- Arends, T. 1984. Epidemiología de las variantes hemoglobínicas en Venezuela. *Gac Med Caracas*, 92:189.
- Arends, T. 1984. Epidemiología de las variantes hemoglobínicas en Venezuela. *Gac Med Caracas*, 92:189.
- Arends, T.; Castillo, O.; Garlin, G.; Maleh, Y.; Anchustegui, M. y Salazar, R. 1987. hemoglobin Alamo ($\alpha_2 \beta_2$ 19(B1) ASN-ASP) in a Venezuelan family. *Hemoglobin*, 11:135-138.
- Arends, T.; Salazar, R.; Anchustegui, M. y Garlin, G. 1990. Hemoglobin variant in the northeastern region of Venezuela. *Interciencia*, 15:36-41.
- Barrai, I.; Rosito, A. y Cappellozza, G. 1984. Beta-thalassemia in the Po Delta: selection, geography, and population structure. *Am J Hum Genet*, 36:1121-1134.
- Bashyam, M.; Bashyam, L.; Savithri, G.; Gopikrishna, M. y Sangal, V. 2004. Molecular genetics of beta thalassemia in South Indian reveals rare mutations in the beta globin gene. *J Hum Genet*, 49:408-403.
- Bonini, A.; Viana, L. y Bonini, C. 2004. Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 26 :57-59.
- Bravo-Urquiola, M.; Arends, A.; Montilla, S.; Gerard, N.; Velásquez, D.; García, G.; Alvarez, M., Guevara, J.; Castillo, O. y Krishnamoorthy, R. 2008. Molecular characterization of β thalassemia in Venezuelan patients. *Am J Hematol* (en publicación).
- Bravo-Urquiola, M.; Gómez, G.; Montilla, S.; García, O.; Chacín, M.; De Donato, M.; Castillo, O.; Krishnamoorthy, R. y Arends, A. 2008. Origen e incidencia de beta talasemia en Venezuela. 1^{era} Conferencia Panamericana de Beta Talasemia. Río de Janeiro, Brasil (Abstract).
- Breathnach, R. y Chombon, R. 1981. Organization and expression of eukariotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*, 50:349.
- Cai, S. y Kan, Y. 1990. Identification of multiple β thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Invest*, 85:550-553.
- Cai, S.; Wall, J.; Kan, Y. Y Chehab, F. 1994. reverse dot blot probes for the screening of β -thalassemia mutations in Asians and American blacks. *Human Mutat*, 3:59-63.

- Cao, A.; Galanello, R. y Rosatelli, M. 1996. Clinical experience of management of thalassaemia: the Sardinian experience. *Semin Hematol*, 1:66-75.
- Capellini, M. 2007. Thalassaemia syndromes. Internatiuonal Society of Haematology European and African Division, Budapest, Hungary. *Blood Reviews*, 21:34-35
- Capp, G.; Rigas, D. y Jones, R. 1967. Haemoglobin portland 1- a new human haemoglobin unique in structure. *Science*, 157:65-66.
- Celaya, J. 2008. Estudios de polimorfismos del gen (APOE) de la apolipoproteina E (Apo-E) en relación con los niveles de colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL en niños de 2 a 10 años de edad. Tesis de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Venezuela.
- Cooley, T. y Lee, P. 1925. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatric Soc*, 37:29-30.
- Di Marzo, R.; Dowling, C.; Wong, C.; Maggio, A. y Kazazian H. 1988. The spectrum molecular of beta thalassaemia mutation in Sicily. *Br J Hematol*, 69:393-397.
- Evans, G.; Poulsen, R.; Canahuate, J y Pastor, J. 2003. Talasemia Asociada a Embarazo. *Rev. Chil Obstet Gineco*, 68:124-128.
- Fortina, P.; Dotti, G.; Conant, R.; Monokian, G.; Parella, T. y Hitchcock, W. 1992. Detection of the most common mutations causing β talasemia in Mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *PCR Methods Appl*, 2: 163-166.
- Gale, R.; Glegg, J. y Huehns, E. 1979. Human embryonic haemoglobins Gower 1 and Gower 2. *Nature*, 280:162.
- Ghanem, N.; Girodon, E.; Vidaud, M.; Martin, J.; Fanen, P.; Plassa, F. y Goosens, M. 1992. A comprehensive scanning method for rapid detection of β -globin gene mutations and polymorphisms. *Human Mutation*, 1:229-239.
- González-Redondo, J., Stoming, J. y Lanclos, K. 1988. Clinical and genetic heterogeneity in Black patients with homozygous β -thalassaemia from the Southeastern United states. *Blood*, 72:1007.
- Gratwick, G.; Bullough, P.; Bohne, W.; Markenson, A. y Peterson, C. 1978. Thalassaemia osteoarthropathy. *Ann Intern Med*, 88:494-501.
- Hattori, Y.; Yamashiro, K. y Ohba, Y. 1991. A new β thalassaemia mutation (initiation codon ATG-GTG) found in the Japanese population. *Hemoglobin*, 15:317-325.

- Hecht, F.; Motulsky, A.; Lemire, R. y Shepard, T. 1966. Predominance of hemoglobin Gower 1 in early human embryonic development, *Science*, 152:91-92.
- Hoffman, R.; Benz, E.; Shattil, S.; Furie, B. y Cohen, H. 2000. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Tercera Edicion. Churchill Livingstone.
- Huehns, E.; Flynn, F.; Butler, E. y Beaven, G. 1961. Two new haemoglobin variants in a very young human embryo. *Nature*, 189:496-497.
- Jankovic, L.; Efremov, G. y Josifovska, O. 1990. An initiation codon mutation as a cause of a β^0 thalassemia. *Hemoglobin*, 14:169-176
- Kaltsoya, A.; Fessas, A. y Stavropoulos, A. 1966. Hemoglobins in early human development. *Science*, 153 :1417-1418.
- Kazazian, H. 1990. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Seminars in Hematology*, 27:209-228.
- Kunkel, H. y Wallenius, G. 1955. New hemoglobin in normal adult blood. *Science*, 122:128.
- Kunkel, H.; Ceppellini, R.; Muller-Eberhard, U. y Wolf, J. 1957. Observations on the minor basis hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassemia. *J Clin Invest*, 33:1615-1620.
- Lam, V.; Xie, S.; Tam, J.; Woo, Y.; Gu, Y. y Li, A. 1990. A new single nucleotide change at the initiation codon (ATG → AGG) identified in amplified genomic DNA of a chinese β thalassemic patient. *Blood*, 75: 1207-1208
- Lapouméroulie, C.; Pagnier, J.; Bank, A.; Labie, D. y Krishnamoorthy, R. 1986. β -thalassemia due to a novel mutation in IVS-1 sequence donor site consensus sequence creating a restriction site. *Biochem Biophys Res Comm*, 139:709.
- Losekoot, M.; Fodde, R.; Harteveld, C.; Van Heeren, H.; Giordano, P. y Bernini, L. 1990. Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: A rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassemia. *Br J Haematol*, 76:269-274.
- Losekoot, M.; Van Heere, H.; Schipper, J.; Giordano, P.; Bernini, L. Y Fodde, R. 1992. Rapid detection of the highly polymorphic β globin framework by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Med Genet*, 29:574-577.
- Luque, J. y Herráez, A. 2002. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier Science Publicaciones. Madrid, España.

- Maggio, A.; Giambona, A.; Cai, S.; Wall, J.; Kan, Y. y Chehab, F. 1993. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood*, 81:239-42.
- Mendes, F. 2004. Contribuição para o estudo das alterações moleculares e interferentes na expressão fenotípica das hemoglobinas à partir de um programa de Triagem Neonatal. Tese de doutoramento em Genética. Ibilce, Unesp.
- Miller, S.; Dykes, D. y Polesky, H. 1988. A simple Salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, 16:1215.
- Mongini, C. y Waldner, C. 1996. *Metodología para la evaluación de las células mononucleares*. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Moreira, W.; De Oliveira, M.; bertuzzo, S.; Sueko, T. y Ferreira, F. 1997. Determination of neutral polymorphism (frameworks) of the human beta globin gene in beta thalassemia by PCR/DGGE. *Sangre*, 42(1):21-24.
- Myers, R.; Maniatis. T. y Lerman, L. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 155 :501-527.
- Navaratnam, K.; Ramasawmy, R.; Lu, C.; Sem, N.; Gerard, N.; Beesoon, S.; Ducrocq, R.; Koomar, S.; Nagel, R. y Krishnamoorthy, R. 2000. Spectrum of β Thalassemia Mutations and Their Linkage to β -Globin Gene Haplotypes in the Indo-Mauritians. *Am J Hematol*, 63:11-15.
- Newton, C.; Graham, A.; Heptinstall, L.; Powell, S. y Summer, C. 1989. Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation systems (ARMS-PCR). *Nucl Ac Res*, 17: 2503-2516.
- Ohba, Y.; Hattori, Y.; Harano, T.; Karano, K.; Fukumaki, Y. y Ideguchi, H. 1997. β thalassemia mutations in japanese and koreans. *Hemoglobin*, 21:191-200.
- Old, J.; Varawalla, N. y Weatherall, D. 1990. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet*, 336: 834-837.
- Orkin, S. y Kazazian, H. 1984. The mutation and polymorphism of the human β - globin gene and its surrounding DNA. *Annu Rev Genet*, 18: 131-171.
- Pepe, F.; Pepe, L.; Greco, L.; Sprini, R. y Garozzo, G. 1992. Frequenza Della beta-thalassemia heterozigote in gravide delle Alta Madonie. *Min Ginecol*, 44:271-272.

- Pierce, H.; Karachi, S.; Sofroniadou, K. y Stamatoyannopoulos, G. 1977. Frequency of thalasemia in American Blacks. *Blood*, 49: 981-986.
- Pirastu, M.; Saglio, G., Canaschella, C.; Loi, A.; Sera, A. y Bertero, t. 1988. Delineation of specific mutations in high risk areas of Italy: a prerequisite for prenatal diagnosis. *Blood*, 71:983-988.
- Rahimi, Z., Raygani, V.; Merat, A.; Haghshenass, N.; Gerard, N.; Nagel, R. Y Krisnamoorthy, R. 2006. Thalassemic mutations in Southern Iran. *Iran J Med Sci*, 31(2):70-73.
- Rioja, L.; Girot, R.; Garabedian, M. y Cournot-Witmer, G. 1990. Bone disease in children with homozygous beta-thalassemia. *Bone Miner*, 8: 69-86.
- Romer, M. 1958. Consideraciones sobre la talasemia con motivo de la comprobación de los primeros casos en Venezuela. *Gac Med Caracas*, 66:27.
- Rosatelli, M.; Dozy, A.; Foa, V.; Meloni, A.; Sardu, R.; Saba, L.; Kan, Y. y Cao, A. 1992. A molecular characterization of beta thalassemia in the Sardinian population. *Am Human Genet*, 50:422-426.
- Salazar-Lugo R (2004) La hemoglobina S en la población venezolana. *Invest Clin*. 45: 175-183.
- Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 74: 5463-5467.
- Schiliro, G. 1987. Epidemiology of thalassemia and hemoglobinopathies in Sicilia in a historic perspective. In: *Thalassemia toda.*, Centro transfusionale, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. Milano.
- Schiliro, G.; Di Gregorio, F.; Samperi, P.; Mirable, E.; Liang, R.; Curuck, M.; Ye, Z. y Huisman, T. 1995. Genetic heterogeneity of beta-thalassemia in southeast Sicily. *Am J Hematol*, 48:5-11.
- Schizas, N.; Tegos, K. y Ventsadakis, A. 1977. The frequency and distribution of β thalasemia and abnormal hemoglobins in Greece. A study of 15.500 recruits. *Hellenic Armed Forces Med. Rev*, 11:197-205.
- Soba, L.; Meloni, A. y Sardu, R. 1992. A novel β thalassaemia mutation (G A) at the initiation codon of the β globin gene. *Hum Mutat*, 1:420.

Stamatoyannopoulos, G. y Fessas, P. 1964. Thalassemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency sickling, and malarial endemicity of Greece: a study of five areas. *Br Med J*, 1:875-879.

Steinberg, M. 1993. DNA diagnosis for the detection of sickle hemoglobinopathies. *Am J Hematol*, 43:110-115.

Talmaci, R.; Traeger-Synodinos, J.; Kanavakis, E.; Coriu, D.; Colita, D. y Gavrila, L. 2004. Scanning of β -globin gene for identification of β -thalassemia mutation in Romanian population. *J Cell Mol Med*, 8:232-240.

Tan, G.; Aw, T., Dunstan, R. y Lee, S. 1993. Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A₂ and F. *J Clin Pathol*, 46:852-856.

Thein, S.; Al-Hakim, I. y Hoffbrand, A. 1984. Thalassemia intermedia: a new molecular basis. *Br J Haematol*, 56:333.

Thein, S.L.; Winichagoonj, C.; Hesketch, S.; Best, S.; Fucharoen, P.; Wasi, I y Weatherall, D.J. 1990. The molecular basis of β in Thailand: Application to prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 47:369-375.

Todd, D.; Lai, M.; Beaven, G. y Huehns, E. 1970. The abnormal haemoglobins in homozygous α -thalassaemia. *Br J Haematol*, 19:27-31.

Trabuchet, G.; Elion, J.; Dunda, O.; Lapoum roulie, C., Ducrocq, R., Nadifi, S.; Zohoun, I.; Chaventre, A.; Carnevale, P y Nagel, R. 1991. Nucleotide sequence evidence of the uncentric origin of the beta C mutation in Africa. *Hum Genet*, 87(5):597-601.

Varawalla, N.; Old, J.; Sarkar, R.; Venkatesan, R. y Weatherall, D. 1991. The spectrum of beta thalassaemia mutations of the Indian subcontinent: The basis of prenatal diagnosis. *Br J Hematol*, 78:242-247.

Varawalla, N.; Fitches, A. y Old, J. 1992. Analysis of β globin gene haplotypes in Asian Indians: origin and spread of β -thalassemia on the Indian subcontinent. *Human Genetics*, 90:443-499.

Villegas, A.; Ropero, P.; González, F.; Anguita, E. y Espin s D. 2001. The thalassemi s s ndromes: Molecular characterization in the Spain population. *Hemoglobin*, 25:273-283.

Weatherall, D. y Clegg, J. 1970. Hemoglobin synthesis. *Biochem.*, 119: 68.

Weatherall, D. y Clegg, J 1981. *Thalassemia Syndromes*. 3^{era} Edición. London: Blackwell Scientific Publications.

Weatherall, D. y Clegg, J. 1996. Thalassaemia a global public health problem. *Nat Med*, 2: 847-849.

Weatherall, D. y Clegg, J. 2001. *The Thalassaemia Syndromes*. Fourth Edition. Blackwell Science. London.

Welsh, K. y Bunce, M. 1999. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogen*, 1:157-176.

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

| Área | Subárea |
|----------|----------|
| Ciencias | Biología |
| | |
| | |
| | |
| | |

Resumen (abstract):

El estudio del gen β globina ha proporcionado grandes aportes al conocimiento de desórdenes genéticos hereditarios, tales como la β talasemia, las variantes hemoglobínicas y la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal; al mismo tiempo ha facilitado la comprensión de los mecanismos de regulación y expresión de los diferentes genes que conforman el bloque β globina. Esta enfermedad esta ampliamente distribuida a nivel mundial, en Venezuela alcanza una frecuencia de 1,8%. Los estudios llevados a cabo utilizando técnicas de ADN recombinante, han permitido caracterizar decenas de mutaciones y demostrar directamente la gran variabilidad genética de las anomalías que producen los fenotipos talasémicos. En el presente estudio se analizaron un total de 54 pacientes, de los cuales a 36 se les realizó el análisis molecular para definir el espectro de mutaciones por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación de ADN genómico, y los 18 pacientes β talasémicos restantes fueron estudiados para definir el catálogo para las mutaciones -88 (C/T), CD39 (C/T) y IVSI-110 (A/G). En 12 pacientes no relacionados se logró identificar mutaciones por secuenciación automatizada de ADN genómico. Las mutaciones fueron la -88 (C/T) (2,7%), la -86 (G/C) (8,3%), la IVSI-5 (G/A) (2,7%), la IVSI-110 (G/A) (8,3%), la IVSII-I (G/T) (5,5%), de los cuales tres están relacionadas, la CD 39 C/T (2,7%) y la IVSII-849 (A/G) (2,7%). El catálogo de mutaciones demostró la asociación de la mutación -88 (C/T) con el perfil de migración 2, la mutación CD39 (C/T) con el perfil de migración 1 y la mutación IVSI-110 (A/G) con el perfil de migración 1. Los resultados obtenidos permiten concluir que la (DGGE) es un método apropiado para la caracterización de mutaciones que difieren de pequeños cambios nucleotídicos con respecto a la secuencia normal del gen beta globina humano. Esta técnica, al ser combinada con la secuenciación automatizada del ADN ha probado ser particularmente útil en la detección de mutaciones responsables de enfermedades genéticas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

| Apellidos y Nombres | ROL / Código CVLAC / e-mail | |
|---------------------|-----------------------------|---|
| Marta Bravo | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| Marco De donato | ROL | CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| Raquel Salazar | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| Merlyn Vivenes | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |

Fecha de discusión y aprobación:

| Año | Mes | Día |
|------|-----|-----|
| 2008 | 10 | 20 |

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

| Nombre de archivo | Tipo MIME |
|-------------------|------------------|
| Tesis_GGO.doc | APPLICATION/Word |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Alcance:

Espacial _____ (Opcional)

Temporal: 1 _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente del Núcleo de Sucre

