
α talasemia no delección en España. Índices hematológicos anormales y su estudio molecular.

*Olga María Briceño Polacre¹, Fernando Atcaúlfo González Fernández²,
Paloma Roperó Gradilla², Ana Ruiz¹, Maczy González¹, José Briceño³,
María Carolina Camacho¹ y Ana Villegas Martínez².*

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. ²Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Madrid, España, ³Hospital de Valera e Instituto Médico Valera. Valera, Venezuela.

Palabras clave: α talasemia, no delección, genes α .

Resumen. Las α talasemias en la mayoría de los casos es debida a delecciones que afectan a uno o a los dos genes α , siendo poco frecuente los casos debidos a mutaciones puntuales, inserciones o delecciones de pocos pares de bases, los cuales se han denominado α talasemias no delección. Se determinó la incidencia de la α talasemia no delección en los pacientes con α talasemia, mediante biología molecular. Se estudiaron 517 individuos remitidos al Hospital Clínico San Carlos, centro de referencia de estudios moleculares de Talasemias en Madrid- España, entre Enero del 2001 a Diciembre del 2003, en los que se había descartado ferropenia y presentaban microcitosis, hipocromía, Hb A₂, Hb F y EEF de Hbs normales. Se estudiaron los 2 tipos de α talasemia no delección más descritas en el Mediterráneo: 1) α Hph debida a la delección de 5 bp en el IVS I y 2) α Nco a un cambio en el codón de iniciación del gen. De los 517, 40 presentaban una α talasemia no delección (7,7%). De éstos, 28 fueron positivos para α Hph del gen α_2 , 24 en estado heterocigoto, 1 homocigoto y 3 dobles heterocigotos asociados con la delección 3,7 kb. Los 12 restantes resultaron positivos para la α Nco del gen α_2 , 10 heterocigotos, 1 homocigoto y 1 doble heterocigoto asociado con la delección 4,2 kb. La α talasemia no delección representa < 8% de los casos de α talasemia en nuestro medio. La α Hph es el tipo de α talasemia no delección más frecuente y cuyas anormalidades hematológicas son más manifiestas que las presentadas en los casos de α Nco.

No Deletion α Thalassaemia in Spain. Abnormal hematological index and molecular study.

Invest Clin 2011; 52(2): 111 - 120

Key words: α thalassaemia, no deletion, α genes.

Abstract. The α thalassaemia diseases in most cases are caused by deletions that affect one or two of the α genes, being less frequent the cases due to punctual mutations, insertions or deletions of a few pairs of bases, which have been denominated no deletion α thalassaemias. The objective of this investigation was to determine the incidence of the no deletion α thalassaemia in patients with α thalassaemia using molecular biology techniques. We studied 517 individuals of the San Carlos Hospital (Thalassaemia Molecular Research Center, Madrid-Spain) between January 2001 and December 2003, in whom iron deficiency anemia had been ruled out, that presented microcytosis and hypochromia and that presented normal HbA₂, HbF and EEF from normal Hbs. The two types of no deletion α thalassaemia most frequently described in the Mediterranean were studied: 1) α Hph due to deletion of 5bp in the IVS I and 2) α Neo due to a change in the initiation codon of the gene. Of the 517 cases studied, 40 (7.7% of the cases) represented a no deletion α thalassaemia. Of these cases, 28 were positive for α Hph of the α_2 gene, 24 in the heterozygote state, one homozygote and three double heterozygotes associated with the 3,7 kb deletion. The remaining 12 cases were positive for the α Neo of the α_2 gene, 10 heterozygotes, one homozygote and one double heterozygote associated with the 4,2 kb deletion. The no deletion α thalassaemias represent < 8% from the cases in our environment. The α Hph is the most frequent type of no deletion α thalassaemia and its haematological abnormalities are more manifest than the ones present in the cases of α Neo.

Recibido: 22-02-2010. Aceptado: 10-02-2011

INTRODUCCIÓN

La α talasemia, es probablemente el desorden genético aislado, más frecuente en el mundo y actualmente se ha observado una clara relación entre dichos síndromes y aquellas áreas que fueron endémicas de malaria en el pasado. Esta patología resulta de una disminución (α^+) o ausencia (α^0) de la síntesis de las cadenas α de globina, que se produce tanto en la vida fetal como en la del adulto. (1,2) En la mayoría de los casos esta alteración en la síntesis, se deben a de-

lecciones de varios segmentos de ácido desorribonucleico (ADN) del "cluster" de α globina (5' - ζ_2 - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ_1 - 3'), que se localiza en el cromosoma 16p13.3, afectando a uno o a los dos genes α . Con menos frecuencia la α talasemia son debidas a no deleciones que se producen por mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones de una o más bases en los genes estructurales que regulan la expresión de los genes α , envolviendo predominantemente la expresión del gen α_2 ($\alpha^T\alpha$) o raramente la del gen α_1 ($\alpha\alpha^T$) o

también por deleciones fuera del cluster de α -globina el cual deja intacto la estructura de los genes pero sin expresión. Estas α talasemias no deleciones afectan a los procesos de transcripción, procesamiento de ARN y traducción (3-5).

La expresión fenotípica de la α talasemia se presenta de forma muy variada, desde una anemia microcítica e hipocrómica en ocasiones indetectable (portador silente), hasta desarrollarse un cuadro de anemia hemolítica severa bien por la presencia de Hb H en caso de la pérdida de 3 genes α funcionales o la muerte durante el período perinatal, debido a la pérdida de los 4 genes α , conocido este cuadro clínico como “hidrops fetalis” por Hb Bart (2, 3, 6, 7).

El extenso estudio realizado en España de la α talasemia (8-10), pone de manifiesto la relativa frecuencia de esta patología en este país, fundamentalmente de la determinante α^+ talasemia por la pérdida de 3.7 kilobase (kb) de ADN conocida con el nombre de α^+ talasemia *rightward*, que se origina por la desalineación y recombinación recíproca de homólogos entre los cromosomas, lo cual afecta ambos genes α en cis y se forma un gen híbrido ($\alpha_2\alpha_1$), dejando un solo gen α funcional en un cromosoma ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). (11) Con menos frecuencia se mencionan los dos tipos de α talasemia no delección más diagnosticados en el mediterráneo, pero no en España, la mutación $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$ que se caracteriza por ser una delección que comprende cinco pares de bases de nucleótidos (TGAGG) situados en el extremo 5' de la secuencia interpuesta o “*intervening sequence 1*” (IVS 1) e interfiere en el procesamiento normal del α_2 ARNm ya que afecta al mecanismo normal de “*splicing*”, esta mutación se manifiesta in vitro al abolir el sitio de corte de la enzima de restricción Hph I en el gen α_2 (12, 13) y en segundo lugar la mutación $\alpha^{\text{Nco}}\alpha$ o $\alpha\alpha^{\text{Nco}}$ causadas por sustituciones de una base en el codon de iniciación ATG en el gen α_2

(ATG→ACG) y en el gen α_1 (ATG→GTG) respectivamente, lo cual elimina completamente la expresión del gen involucrado, la que envuelve el gen α_2 es más severa que la del gen α_1 y se evidencia al abolir el sitio de corte de la enzima NcoI (11, 14, 15).

En principio era suficiente determinar el volumen corpuscular medio (VCM) para establecer el diagnóstico de α talasemia, que en ausencia de ferropenia y con una hemoglobina A_2 normal o baja, podría ser responsable de la anemia microcítica. La intensa actividad desarrollada en la década de los 80 y 90, junto el gran avance de las técnicas de Biología Molecular para establecer las bases moleculares de las talasemias, han demostrado que muchas de las lesiones genéticas no pueden ser detectadas con los métodos analíticos convencionales, que tienen aplicación tanto en la etiopatogenia, diagnóstico y prevención de estas patologías.

En España los estudios epidemiológicos, aunque escasos y esporádicos, han evidenciado una elevada incidencia de las α talasemia de 4,79% con distribución geográfica irregular y marcada heterogeneidad fenotípica (16, 17). Sin embargo no existen trabajos que asocien la α talasemia no delección con sus anormalidades hematológicas, lo que nos permitió plantearnos, que el principal objetivo de esta investigación sea determinar la incidencia de la α talasemia no delección en los pacientes con α talasemia, utilizando técnicas de biología molecular que permitan una óptima caracterización genética y a su vez comparar los parámetros hematológicos entre los diferentes genotipos más frecuentes de α talasemia en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

En el período de Enero del 2001 a Diciembre del 2003, se estudiaron 517 pa-

cientes remitidos al Hospital Clínico San Carlos, centro de referencia de estudios moleculares de Talasemias en Madrid-España, con microcitosis y/o hipocromía ($VCM \leq 80$ fL y/o $HCM \leq 27$ pg), en los que previamente se había descartado anemia ferropénica ya que los estudios de hierro resultaron normal (ferritina, sideremia, IST). También se consideró para esta selección de las muestras los valores de hemoglobina A_2 , hemoglobina fetal y electroforesis de hemoglobinas normales, con el fin de descartar hemoglobinopatías y otras talasemias diferentes a las de cadena α , y posteriormente realizar el diagnóstico molecular de α talasemia.

A cada uno de los sujetos se les solicitó por escrito su consentimiento para participar en el estudio y también se contó con la aprobación del Comité de Ética de la institución y se procedió de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki de 1975 (actualizado en el 2000).

Métodos

Las muestras de estos individuos fueron sangre periférica anticoagulada con EDTA- K_3 y se les practicó los siguientes estudios para el diagnóstico de la α talasemia: estudio hemocitométrico convencional (Contador Coulter STKR®), recuento de reticulocitos, isoelectroenfoque de hemoglobinas (IEF) y HPLC de cadenas de globina, estas dos últimas determinaciones se realizan con el fin de descartar la posible existencia de otra patología asociada. También se determinó la Hb A_2 y Hb F, para descartar β o $\delta\beta$ talasemia y se finaliza con la cuantificación de los Cuerpos de Inclusión (18, 19).

Una vez puesto de manifiesto la existencia de una α talasemia, se procede a realizar el estudio de la biología molecular de dicha patología, mediante la extracción del ADN contenido en los núcleos de leucocitos de sangre periférica por el método de Miller *et al.* modificado (*Salting out*) (20) y la apli-

cación de las siguientes técnicas: PCR para las mutaciones 3.7 (delección de 3.7 Kb conocida como *rightward* (11), método de Southern Blot, para descartar cualquiera otra α talasemia delección y finalmente amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción para el estudio de la α talasemia no delección.

Amplificación selectiva del gen α_2 y del gen α_1 por PCR

Los genes completos α_2 y α_1 de cada paciente se amplificó de forma selectiva por PCR (21) utilizando previamente los oligonucleótidos (C_8 Directo: 5' GAGCCTG GCCAAACCATCAC 3' y $C3$ Reverso: 5' CC ATTGTTGGCACATTCCGG 3') ya descritos para el gen α_2 (22), obteniéndose un fragmento de 1943 pares de bases (pb). La amplificación del gen α_1 se logró con oligonucleótidos (C_1 Directo: 5' TGGAGGGTG GAGACGTCCTG 3' y RMU Reverso: 5' GGGGGGAGGCCCAAGGGGCAAGAA 3'), diseñados en esta investigación que produce un fragmento de 980 pb. La PCR se realizó en un ADN Termal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus), con una de mezcla de reacción (100 μ L) que contenía 1 μ g de ADN genómico, 0,5 μ mol/L de cada oligonucleótido con 670 mmol/L de Tris-HCl pH 8,8, 166 mmol/L de $SO_4(NH_4)_2$, 20 mmol/L de Cl_2 Mg, 1 mg/mL de Albúmina sérica bovina 4%, 7,5 μ L de DMSO, 0,2 mmol/L de cada dNTPs y 2,5 Unidades/ μ L de *Taq* DNA Polimerasa. Luego de la desnaturalización completa del ADN durante 7 minutos a 99°C, se procede a amplificar el gen α_2 , con un total de 25 ciclos siguiendo estas condiciones: 1 minuto a 95°C de desnaturalización, 1 minuto a 56°C de reconocimiento y 2,5 minutos a 72°C de síntesis y se finaliza para estabilizar la reacción con 10 minutos a 72°C (elongación final) y esperar un enfriamiento a 4°C, para mantener la muestra. La amplificación del gen α_1 , se desarrolla con 30 ciclos en total y bajo las siguien-

tes condiciones: 1 minuto a 95°C de desnaturalización, 1 minuto a 60°C de reconocimiento y 2 minutos a 72°C de síntesis y se finaliza para estabilizar la reacción con 7 minutos a 72°C (elongación final) y esperar un enfriamiento a 4°C, para mantener la muestra. Ambas amplificaciones son comprobadas al colocar 10 μ L del producto en un gel de acrilamida (Bio-Rad's Acrylamide/Bis Solutions) al 40% 37,5:1 en una solución reguladora TBE 1X (Tris-Trizma Base, Acido Bórico, EDTA 0,5M pH 8 y H₂O c.s.p.), mediante una electroforesis minivertical (Modelo Mini-Protean III Cell) durante 45 minutos a 110 V (Fuente Power Pac 1.000-BIORAD) y posterior tinción en una solución de bromuro de etidio (C₂₁H₂₀N₃Br) 0,5 μ g/mL (Boehringer Mannheim GMBH, Alemania). Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador (Modelo TM-20 UVP) y posteriormente fotografiados con una cámara polaroid (Mitsubishi Video Copy Processor).

Digestión con enzimas de restricción del producto de la PCR para las mutaciones α^{Hph} y α^{Nco}

La presencia de las mutaciones de las α talasemias no delección estudiadas en este trabajo se evidencian en el gen α_2 , al digerir 20 μ L del ADN amplificado con las respectivas enzimas Hph I para la delección de 5 pb en el IVS-1 ($\alpha^{\text{Hph}}\alpha$) obteniéndose cuatro fragmentos de 1204 pb, 322 pb, 254 pb y 163 pb cuando se trata de un individuo normal. La presencia de la mutación provoca una abolición del sitio de corte por la enzima de restricción Hph I en el fragmento amplificado, da lugar en los individuos heterocigotos a cinco fragmentos de 1526 pb, 1204 pb, 322 pb, 254 pb y 163 pb y en los individuos homocigotos hay un solo fragmento de 1526 pb. A la otra mutación $\alpha^{\text{Nco}}\alpha$ en el codón de iniciación, se le realizó la digestión con la enzima de restricción Nco I, obteniéndose dos fragmentos de 1096 pb y 847 pb cuando se trata de un in-

dividuo normal. La presencia de la mutación provoca una abolición del sitio de corte por la enzima de restricción Nco I en el fragmento amplificado, da lugar en los individuos heterocigotos a tres fragmentos de 1943 pb, 1096 pb y 847 pb y en los individuos homocigotos hay un solo fragmento de 1943 pb. En las Figs. 1 y 2 se observan las diferentes bandas.

Los objetivos planteados en este trabajo nos permiten realizar un estudio descriptivo de la media. La evaluación de los datos obtenidos se realizó mediante un análisis automatizado por ordenador. Los valores para cada parámetro analítico, se expresan como media (X), desviación estándar (DE), valor máximo, valor mínimo, rango coeficiente de variación (CV) y error estándar de la media (EEM).

Se analizaron las distribuciones de valores para cada variable analizada, con el fin de conocer si su distribución se ajustaba a una curva normal, se le realizó el test de Kolmogorov Smirnov y se observó que en su mayoría no existe una distribución normal de variables, por lo tanto para realizar el estudio descriptivo de la media se utilizaron las pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) para los análisis comparativos posteriores. También hubo una minoría de datos que siguió una distribución de frecuencia normal y en estos casos se les aplicó la T de Student. Para estos análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17.

En las variables de reticulocitos y Hb F se observó que la DE es mayor al 50% de la media y por esta razón se utilizó para su estudio la prueba de la mediana, a diferencia de la Hb A₂ en donde se aplicó la Prueba de Mann-Whitney, igual que a todos los demás parámetros hematimétricos.

RESULTADOS

De los 517 casos de individuos con α talasemia, 477 (92,3%) se producían por

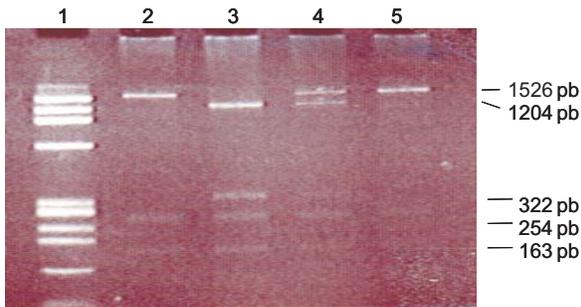


Fig. 1. Estudio de la mutación α^{Hph} en el gen α_2 mediante amplificación por PCR y posterior digestión con la enzima de restricción Hph I. Producto digerido: 1526 pb, 1204 pb, 322 pb, 254 pb y 163 pb. Carril 1: Marcador de pesos Moleculares ϕ x174 digerido con Hph I. Carriles 2 y 5: Sujeto homocigoto ($\alpha^{\text{Hph}} \alpha/\alpha^{\text{Hph}}\alpha$), Carril 3: Sujeto normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) y Carril 4: Sujeto heterocigoto ($\alpha^{\text{Hph}} \alpha/\alpha\alpha$).

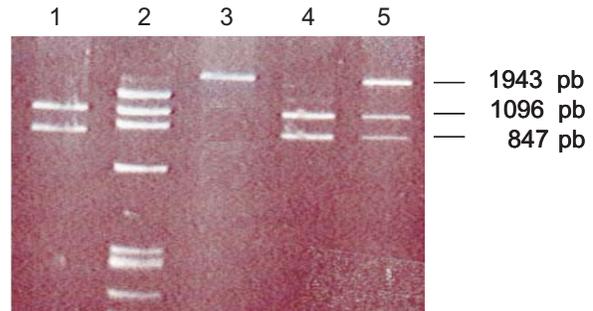


Fig. 2. Estudio de la mutación α^{Nco} en el gen α_2 mediante amplificación por PCR y posterior digestión con la enzima de restricción Neo I. Producto digerido: 1943 pb, 1096 pb y 847 pb. Carriles 1 y 4: Sujeto normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), Carril 2: Marcador de pesos Moleculares ϕ x174 digerido con Neo I., Carril 3: Sujeto homocigoto ($\alpha^{\text{Nco}} \alpha/\alpha^{\text{Nco}}\alpha$) y Carril 5: Sujeto heterocigoto ($\alpha^{\text{Nco}} \alpha/\alpha\alpha$).

deleciones de genes α y 40 por α talasemia no deleción, lo que supone un 7,7% de los casos estudiados, que distribuidos en frecuencia y según el genotipo se observa que la mayoría de los casos de α talasemia deleción son por la mutación $-\alpha^{3.7}$ con un valor de 64,8% en estado heterocigoto y 20,3% en estado homocigoto y de las α talasemias no deleción la mutación α^{Hph} en estado heterocigoto con una frecuencia de 4,6% y la mutación α^{Nco} en estado heterocigoto con un valor de 1,9%, tal como se refleja en la Tabla I.

La correlación de los genotipos con mayor frecuencia de α talasemia en esta investigación y los parámetros hematológicos se observan en la Tabla II.

En la comparación del estudio hematómico de los sujetos heterocigotos con α^+ talasemia deleción (335 casos) y no deleción (34 casos), se presenta que el VCM y HCM están más bajos en los casos de α talasemia no deleción con valores de 76,9 fL ($p=0,013$) y 25,12 p μ g ($p=0,002$) respectivamente, notándose una gran diferencia significativa para estos dos parámetros. Con respecto a los individuos con los genotipos

TABLA I
DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DE LOS GENOTIPOS ESTUDIADOS EN PACIENTES CON PATOLOGÍA EN EL CLUSTER α . HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS. MADRID. ESPAÑA 2001-2003

Genotipos	Frecuencia (N°)	Porcentaje (%)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	335	64,8
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	5	1,0
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	105	20,3
$\alpha^{\text{Nco}}\alpha/\alpha\alpha$	10	1,9
$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$	24	4,6
$\alpha^{\text{Nco}}\alpha/\alpha^{\text{Nco}}\alpha$	1	0,2
$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha^{\text{Hph}}\alpha$	1	0,2
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1	0,2
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{\text{Hph}}\alpha$	3	0,6
$-\alpha\alpha$	28	5,4
$-\alpha^{4.2}/\alpha^{\text{Nco}}\alpha$	1	0,2
$-\alpha^{3.7}$	3	0,6
Total	517	100,00

TABLA II
CORRELACIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y LOS GENOTIPOS MÁS FRECUENTES ESTUDIADOS CON α TALASEMIA. HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS. MADRID. ESPAÑA. 2001-2003

Genotipos	Hb g/dL	Hto %	VCM fL	HCM pg	RDW %
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	13,19 \pm 1,7	40,08 \pm 5,1	78,19 \pm 5,1	25,75 \pm 1,9	14,37 \pm 2,4
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	12,78 \pm 1,2	40,13 \pm 3,9	71,71 \pm 3,2	22,87 \pm 1,1	14,69 \pm 0,92
$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$	13,55 \pm 1,1	41,70 \pm 3,5	75,70 \pm 3,75	24,62 \pm 0,99	14,51 \pm 0,87
$\alpha^{\text{Neo}}\alpha/\alpha\alpha$	13,98 \pm 1,4	42,31 \pm 4,1	79,81 \pm 8,0	26,32 \pm 3,0	13,77 \pm 0,8
$-\alpha\alpha$	12,44 \pm 1,3	39,27 \pm 4,2	66,08 \pm 3,85	20,97 \pm 1,4	15,53 \pm 1,4

$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$ (24) y $\alpha^{\text{Neo}}\alpha/\alpha\alpha$ (10) de α talasemia no deleción, se confirma que los valores de VCM y HCM son inferiores en la mutación α^{Hph} , aunque solo existe diferencia significativa para el parámetro de HCM con una media de 24,6 pg (p= 0,046), también en esta comparación los valores de RDW están ligeramente más elevados en esta mutación α^{Hph} con valores medios de 14,5% (p= 0,023), con diferencia significativa.

Los casos homocigotos de α^+ talasemia deleción (106) y no deleción (6) y su estudio hematimétrico, al compararlo reflejan una gran diferencia significativa para VCM y HCM resultando valores más bajos en la α talasemia no deleción con medias de VCM = 63,90 fL (p=0,000) y HCM = 19,95 pg (p=0,000) en contraste con la α^+ talasemia deleción cuyas medias de VCM = 71,69 fL (p=0,000) y HCM = 22,87 pg. También se destaca una diferencia significativa en la determinación de RDW con una media de 16,43 % para la α talasemia no deleción y de 14,70 % para la α talasemia deleción con una p=0,002.

Un último análisis comparativo del estudio hematimétrico fue el de los genotipos $-\alpha\alpha$ con los homocigotos α^+ talasemia deleción (106) y no deleción (6), en el cual se determinó que no existe diferencia significativa entre el estudio hematológico de $-\alpha\alpha$ y α^+ talasemia no deleción, en contraste con los sujetos de α^+ talasemia deleción

que al compararse con los $-\alpha\alpha$ si se observó diferencia significativa para los parámetros de VCM, HCM y RDW cuyas medias en este genotipo $-\alpha\alpha$ son de VCM = 66,08 fL (p= 0,000), HCM = 20,97 pg (p= 0,000) y RDW = 15,53% (p= 0,001) y las de α^+ talasemia deleción son de VCM = 71,69 fL, HCM = 22,87 pg y RDW = 14,70%.

DISCUSIÓN

Todos los pacientes de esta investigación se caracterizan por haber heredado de sus progenitores alelos normales y/o alelos mutados a nivel de los genes α de globina. Alelos que se ponen de manifiesto mediante el empleo de técnicas de Biología Molecular, ya que los parámetros hematológicos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y Hb A₂ normal o baja, en ausencia de anemia ferropénica, son herramientas útiles en el diagnóstico de los síndromes talasémicos, pero no son capaces de discernir entre los genotipos de α talasemia.

Los resultados de los estudios realizados en España incluyendo los nuestros reflejan que en la actualidad existe una prevalencia de la α talasemia detectada mediante procedimientos moleculares de 4%, muy similar a la encontrada en los países o comarcas de la cuenca mediterránea (16, 17,

23-26). De los 517 casos de α talasemia analizados en esta investigación, se observa que un 92,3% se producían por deleciones de genes α y una minoría 7,7% por la α talasemia no deleción, que según la revisión bibliográfica de los últimos trabajos realizados en Europa, sobre la prevalencia de la α talasemia deleción y α talasemia no deleción en una población de pacientes con α talasemia, reflejan que existe una discrepancia cuando se compara con nuestros datos, como son los reportes de los estudios realizados en Israel (27) en donde un 70% presentaba α talasemia deleción y un 30% α talasemia no deleción, en Irán el 80% es α talasemia deleción y 20% α talasemia no deleción (28) y también podemos unir a estos datos el trabajo realizado en Chipre (24) de los cuales el 85% fue α talasemia deleción y 15% no deleción, presentándose en estos estudios valores más elevados para los casos de α talasemia no deleción que los encontrados en España, esta discrepancia nos permite inferir que la situación geográfica de estos países los hace tener mayor frecuencia de estos genotipos, además que son poblaciones más heterogéneas desde el punto de vista genético, debido a su mezcla con otras etnias africanas y asiáticas de su antiguo imperio colonial.

La incidencia de las dos α talasemia no deleción analizadas, fue de 5,4% para el haplotipo α^{Hph} y 2,3% para el haplotipo α^{Nco} y en la comparación de las mismas, desde el punto de vista de expresión fenotípica y genotipo se confirma que las anomalías hematológicas asociadas a la α talasemia no deleción por la mutación α^{Hph} son más manifiestas que las presentadas en los casos con la mutación α^{Nco} , igual como se ha determinado en otros trabajos por diferentes autores (5, 27) hecho que hace suponer que la expresión proteica a nivel del cluster α esta minimizada en la mutación $\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$, ya que existe una menor expresión del gen α_2 , se disminuye la síntesis de

cadenas α y a su vez se produce menos Hb A, por ello la severidad de las manifestaciones clínicas en las α talasemia no deleción varían dependiendo de la característica y ubicación de la mutación en el cluster α . Para estudiar el efecto de la mutación α^{Hph} a nivel del intrón que cambia la secuencia de la región consenso del empalme que se produce en el *splicing*, es necesario aislar el ARN para saber los niveles de ARNm que se producen, lo cual sería un objetivo para estudios futuros.

En el resto de los estudios comparativos entre los casos de α^+ talasemia deleción y α^+ talasemia no deleción se presenta que aunque el VCM y el HCM fueron los parámetros más significativos, llevar a cabo el diagnóstico de una α talasemia heterocigota basándose únicamente en la relación VCM-HCM resulta poco sensible, al presentarse α talasemia silentes que pasen desapercibidas, ya que los índices hematológicos en sujetos heterocigotos de α talasemia están alterados de una forma muy ligera y suelen coincidir considerablemente con los individuos normales. Un diagnóstico real puede por lo tanto ser implementado solo por análisis de ADN. Con respecto a los valores hematológicos nuestros resultados coinciden con todos los reportes realizados en este tema, indicando que los casos heterocigotos de α^+ talasemia no deleción presentan cuadros clínicos más severos que por deleciones en el gen α , caracterizada por una anemia microcítica más acentuada, esto es debido a que existe una menor expresión proteica en las mutaciones de α^+ talasemia no deleción aquí estudiadas. En vista que el mayor N° de casos de no deleciones fue por la mutación α^{Hph} , los individuos con estas mutaciones presentan una microcitosi e hipocromía algo mayor a la hallada en individuos con pérdida de un gen α por deleción de 3.7 kb, lo cual se explica porque la expresión del gen α_2 afectado es tres veces superior al del gen α_1 .

Un hecho resaltante es la similitud de la expresión fenotípica al comparar los sujetos α^0 ($-/\alpha\alpha$) con α^+ talasemia no deleción homocigotos ($\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$), confirmándose la importancia que tiene los cuadros de α^+ talasemia no deleción cuando se encuentran en el gen α_2 y más aún en estado homocigoto. La caracterización molecular realizada en los sujetos con α talasemia no deleción nos determina que en este tipo de investigación existen datos trascendentales para emitir un adecuado consejo genético y establecer un diagnóstico prenatal, reservando en mente que el fenotipo clínico de los pacientes con la enfermedad de Hb H con genotipo de no deleción son usualmente más severos que aquellos que tienen genotipo deleción.

REFERENCIAS

1. **Kazazian HH Jr** The thalassaemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990; 27: 209-228.
2. **Weatherall DJ, Clegg JB**. The Thalassaemia Syndromes. 3rd ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1981, pp 36-50.
3. **Higgs DR, Vickers AOM, Wilkie I-M, Pretorius AP, Jarman AP, Weatherall DJ**. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 1989; 73(5): 1081-1104.
4. **Higgs DR**. α -Thalassaemia. En **Higgs DR, Weatherall DJ**. (eds): *Bailliere's Clinical Haematology: The Hemoglobinopathies* Vol. 6. London W.B. Saunders 1993; pp117-151.
5. **Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gervasio SA, Costa FF, Sonati MF**. High prevalence of alpha-thalassaemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res*. 2001 34(6):759-762.
6. **Bunn HF, Forget BG**. Hemoglobin: Molecular genetic and clinical aspects. WB Saunders Company, Philadelphia. 1986.
7. **Orkin SH, Old J, Lazarus H, Altay C, Gurgey A, Weatherall DJ, Nathan DG**. The molecular basis of α -thalassaemia: Frequent occurrence of dysfunctional α -loci among non-Asians with Hb H disease. *Cell* 1979; 17: 33-39.
8. **Villegas A, Calero F, Vickers MA, Ayyub H, Higgs DR**. α -thalassaemia in two Spanish families. *Eur J Haematol* 1990; 44: 109-114.
9. **Villegas A, Sánchez J, Porres A, Calero F**. Estudio epidemiológico y datos hemocitométricos y moleculares de la α -talasemia. *Sangre* 1991; 36: 139-143.
10. **Villegas A, Sánchez J, Armada B, González FA**. Nondeletional α -thalassaemia in a Spanish population. *Am J Hematol* 1997; 54: 342-343.
11. **Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P**. Human α -Thalassaemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. *Am J Hematol* 1996; 53: 81-91.
12. **Orkin SH, Goff SC, Hechtman RL**. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5041-5045.
13. **Felber BK, Orkin SH, Hamer DH**. Abnormal RNA splicing causes one form of α -thalassaemia. *Cell* 1982; 29: 895-902.
14. **Pirastu M, Saglio G, Chang JC, Cao A, Kan YW**. Initiation codon mutation as a cause of α thalassaemia. *J Biol Chem* 1984; 259: 12315-12317.
15. **Moi P, Cash FE, Liebhaber SA, Cao A, Kan YW**. An initiation codon mutation (AUG \rightarrow GUG) of the human α_1 -globin gene. Structural characterization and evidence for a mild thalassaemic phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 1416-1421.
16. **Villegas A, Sánchez J, Sal del Río E**. α globin genotypes in a Spanish population. *Hemoglobin* 1992; 16: 427-429.
17. **Sánchez J**. Prevalencia de la alfa talasemia en la sangre del cordón umbilical. Estudio mediante Hb Bart y Biología Molecular. (Tesis Doctoral). Madrid: Univ.Complutense de Madrid; 1997.
18. **De Pablos Gallego JM**. Técnicas básicas en análisis de hemoglobinas. Ed. Menarini Diagnósticos. 1988, pp 56-87.

19. **Huisman THJ, Jonxis JHP.** The Hemoglobinopathies, Techniques of Identification, Clinical and Biochemical Analysis. Vol 6, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997.
20. **Müller H, Ziegler B, Schweitzer B.** UV-VIS spectrophotometric methods for qualitative and quantitative analysis of nucleic acids. *Int Spectr Lab* 1993; 4: 4-11.
21. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-991.
22. **Ayala S, Colomer D, Aymerich M, Pujades A, Vives Corrons JL.** Non-deletional α -thalassaemia: First description of $\alpha^{\text{HPH}}\alpha$ and $\alpha^{\text{NCO}}\alpha$ mutations in a Spanish population. *Am J Hematol* 1996; 52: 144-149.
23. **Di Rienzo A, Novelleto A, Aliquo MC, Bianco I, Tagarelli A, Brancati C, Colombo B, Felicetti L.** Molecular basis for Hb H disease in Italy: geographical distribution of deletional and nondeletional alpha-thalassemia haplotypes. *Am J Hum Genet* 1986; 39(5): 631-639.
24. **Baysal E, Kleanthous M, Bozkurt G, Kyrri A, Kalogirou E, Angastiniotis M, Ioannou P, Huisman TH.** alpha-thalassemia in the population of Cyprus. *Br J Haematol* 1995; 89(3): 496-499.
25. **Peres MJ, Romao L, Carreiro H, Picanco I, Batalha L, Magalhaes HA, Martins MC, Lavinha J.** Molecular basis of alpha-thalassemia in Portugal. *Hemoglobin* 1995; 19(6): 343-352.
26. **Fichera M, Spalletta A, Fiorenza F, Lombardo T, Schiliro G, Tamouza R, Lapoumeroulie C, Labie D, Ragusa A.** Molecular basis of alpha-thalassemia in Sicily. *Hum Genet* 1997; 99(3): 381-386.
27. **Oron-Karni V, Filon D, Shifrin Y, Fried E, Pogrebjisky G, Oppenheim A, Rund D.** Diversity of alpha-globin mutations and clinical presentation of alpha-thalassemia in Israel. *Am J Hematol* 2000; 65(3):196-203.
28. **Harteveld CL, Yavarian M, Zorai A, Quakkelaar ED, van Delft P, Giordano PC.** Molecular spectrum of alpha-thalassemia in the Iranian population of Hormozgan: three novel point mutation defects. *Am J Hematol* 2003; 74(2):99-103.