

Masala, Bruno Lucio (1982) *Le Basi biochimiche e molecolari delle talassemie e la diagnosi dell'Alfa-talassemia eterozigote*. Bollettino della Società sarda di scienze naturali, Vol. 21 (1981), p. 59-77. ISSN 0392-6710.

<http://eprints.uniss.it/3332/>

# BOLLETTINO

della

SOCIETA' SARDA  
DI SCIENZE NATURALI

La Società Sarda di Scienze Naturali ha lo scopo d'incoraggiare e stimolare l'interesse per gli studi naturalistici, promuovere e sostenere tutte le iniziative atte alla conservazione dell'ambiente e costituire infine un Museo Naturalistico Sardo.

S. S. S. N.  
SOCIETÀ SARDA di SCIENZE NATURALI

Via Muroli, 25 - 07100 Sassari.

CONSIGLIO DIRETTIVO (1980-1982)

*Presidente* : Franca Valsecchi.

*Segretario* : Giovanni Cordella.

*Consiglieri*: Bruno Corrias, Franca Dalmaso, Umberto Giordano, Maria Pala, Gavino Vaira.

*Collegio Probi Viri*: Giovanni Manunta, Vico Mossa, Enzo Sanfilippo.

---

*Consulenti Editoriali per il XXI Volume:*

Prof. Pier Virgilio ARRIGONI  
Prof. Jaume BAGUNA  
Prof. Francesco CARIATI  
Prof. Arturo CERUTI  
Prof. Clara CIAMPI  
Prof. Paolo Roberto FEDERICI  
Prof. Giorgio FIORI  
Prof. Nullo Glauco LEPORI  
Prof. Fiorenzo MANCINI  
Prof. Enio NARDI  
Prof. Gianpiero PESCARMONA  
Prof. Renzo STEFANI  
Prof. Livia TONOLLI  
Prof. Fosca VERONESI

Direttore Responsabile e Redattore  
Prof. FRANCA VALSECCHI

---

*Autorizzazione Tribunale di Sassari n. 70 del 29.V.1968*

## Le basi biochimiche e molecolari delle talassemie e la diagnosi dell'Alfa-talassemia eterozigote

BRUNO MASALA

Cattedra di Chimica Biologica - Istituto di  
Fisiologia Generale e Chimica Biologica dell'Università  
Via Muroni 25, 07100 Sassari.

**The biochemical and molecular basis of thalassemic syndromes, and the diagnosis of heterozygous alpha-thalassemia.**

Recent aspects of molecular and biochemical basis of thalassemic syndromes are described together with laboratory methods suitable for diagnosis and screening of heterozygous  $\alpha$ -thalassemia.

KEY WORDS: Thalassemia syndromes, Heterozygote screening.

## LE EMOGLOBINE UMANE NORMALI

Le emoglobine umane sono formate dalla associazione di 4 globine, della lunghezza di 141-146 residui aminoacidici, ciascuna delle quali è coniugata ad un gruppo non proteico, contenente un atomo di ferro, detto eme. Il tetramero risultante ha peso molecolare di circa 68.000 e la sua funzione principale è quella di trasportare  $O_2$ ,  $H^+$  e  $CO_2$ .

I tetrameri originati dalla associazione delle catene globiniche sono rappresentati dalle tre emoglobine embrionali Gower 1 ( $\zeta_2 \epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ), Portland ( $\zeta_2 \gamma_2$ ), dalla emoglobina fetale Hb F ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) e dalle emoglobine adulte Hb A ( $\alpha_2 \beta_2$ ) e Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ). Altre emo-

---

Lezione tenuta al 2° Corso Teorico Pratico sulla Diagnosi e Screening della  $\beta$ -Talassemia organizzato dal Consiglio Nazionale delle Ricerche. Roma, Istituto Superiore di Sanità, 12-18 dicembre, 1981.

globine, presenti negli emolisati preparati di fresco, sono il prodotto di modificazioni a carico di alcune di quelle suddette: l'Hb A<sub>1c</sub> è il risultato della lenta glicosilazione della Hb A con formazione di una base di Schiff fra l'aminogruppo N-terminale della catena  $\beta$  e il glucosio; la Hb F<sub>1</sub> deriva dalla acetilazione, anch'essa post-traduzionale, dell'aminogruppo N-terminale della catena  $\gamma$  (BUNN e coll., 1977). L'interesse nelle emoglobine glicosilate è notevolmente cresciuto dopo l'osservazione che esse sono presenti in concentrazioni circa doppie del normale in pazienti con diabete mellito (TRIVELLI e coll., 1971).

Recenti esperienze di biologia molecolare hanno messo in evidenza che i geni per le globine  $\zeta$  ed  $\alpha$  sono duplicati e localizzati sul cromosoma 16 nella sequenza  $\zeta_2, \zeta_1, \alpha_2, \alpha_1$ , in direzione 5'→3', mentre sul braccio corto del cromosoma 11 sono localizzati i geni per le globine non- $\alpha$  nella sequenza  $\epsilon, G\gamma, A\gamma, \delta$  e  $\beta$  (i prodotti dei due geni  $\gamma$  differiscono esclusivamente per la presenza dell'aminoacido glicina o alanina nella posizione 136 della catena) (MANIATIS e coll., 1980).

Ciascun gene risulta distanziato dall'altro fra 3,5 e 20 kilobasi (Kb) e contiene due sequenze non codificanti dette introni. Gli introni dei geni  $\alpha$  sono localizzati fra i codoni 31 e 32 e fra i codoni 99 e 100 e contengono 95 e 125 paia di basi rispettivamente, quelli dei geni non- $\alpha$  sono localizzati fra i codoni 30 e 31 e fra i codoni 104-105 e contengono circa 150 e 900 paia di basi rispettivamente (MANIATIS e coll., 1980).

I geni per le globine non sono tutti attivi contemporaneamente, ma sono sottoposti a complicati meccanismi di regolazione e di « switches » che ne assicurano la corretta espressione. I geni  $\zeta$  sono attivi già a livello di cellule eritroidi del sacco vitellino, mentre intorno al 3° mese dall'annidamento dell'uovo vengono rimpiazzati da quelli  $\alpha$  che proseguono la loro attività per il resto della vita. La attività dei geni  $\gamma$  rimpiazza quella dei geni  $\epsilon$  pure intorno al 3° mese di gestazione per poi essere sostituiti dai geni  $\beta$  a partire dal 4°-5° mese (HUEHNS e coll., 1964). La precisa collocazione dei momenti di sintesi delle diverse globine ha reso possibile la attuazione della diagnosi prenatale delle talassemie.

Il quadro emoglobinico definitivo si stabilisce intorno all'ottavo mese dalla nascita e risulta costituito per il 97% da Hb A, per il 2-3% da Hb A<sub>2</sub> e per lo 0,2-0,5% da Hb F.

## LE EMOGLOBINOPATIE

Il DNA che costituisce i geni per le globine, o la sequenza di eventi che dal DNA stesso conducono alla sintesi di esse possono peraltro subire danni che alterano la composizione in aminoacidi o la capacità di sintesi proteica. Attualmente sono conosciute oltre 325 varianti della struttura emoglobinica, gran parte delle quali scoperte mediante elettroforesi di campioni di sangue raccolti durante studi popolazionistici o durante l'esame di soggetti con anemie emolitiche, cianosi, eritrocitosi ecc. Fra queste si possono ricordare le emoglobine S e C diffuse fra le popolazioni di origine africana e la E diffusa fra gli asiatici, tutte varianti della catena  $\beta$ ; le emoglobine G Philadelphia e J Sardegna, varianti della catena  $\alpha$ , e la emoglobina F Malta, variante della catena  $\gamma$ , tutte diffuse in Sardegna.

Nella gran parte dei casi le globine mutate vengono prodotte nelle stesse quantità di quelle normali e spesso la emoglobina anomala che ne risulta non provoca patologie di rilievo. In altri tipi di difetti invece, le globine mostrano la normale sequenza aminoacidica ma vengono sintetizzate in quantità ridotte: tali difetti prendono il nome di talassemie. Poiché qualunque gene può subire danni che ne riducono la capacità di sintesi, si definiscono  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta\beta$  o  $\alpha\beta$ -talassemie a seconda del gene, o dei geni, interessati (WEATHERALL e CLEGG, 1979 e 1981).

Poiché i geni per le globine vengono ereditati secondo le leggi mendeliane relative a caratteri autosomici recessivi, gli eterozigoti per le emoglobinopatie strutturali della catena  $\beta$  possiedono un gene  $\beta$  mutato ed uno normale  $\beta^+$ , mentre gli eterozigoti per la  $\beta$ -talassemia possiedono un gene  $\beta$  malfunzionante ed uno  $\beta$  normale. Gli omozigoti hanno invece ambedue i geni mutati o malfunzionanti. Con gli stessi meccanismi, complicati però dal fatto che i geni sono duplicati su ogni cromosoma 16, vengono trasmesse le mutanti della catena  $\alpha$  o i geni  $\alpha$ -talassemici.

A differenza degli omozigoti per le varianti emoglobiniche, che producono quasi esclusivamente l'emoglobina mutata, gli omozigoti  $\beta$ -talassemici si manifestano con la sola Hb F ( $\beta^0\beta^0$ ) o Hb F in presenza di quantità variabili di Hb A ( $\beta^+\beta^+$ ,  $\beta^+\beta^0$ ) mentre gli omozigoti  $\alpha$ -talassemici si manifestano, alla nascita, con soli tetra-

meri di globine non- $\alpha$  ( $\gamma_4$ , Hb Bart e  $\beta_4$ , Hb H) oltre a circa il 10% di Hb Portland. L'esistenza di omozigoti per la  $\beta$ -talassemia caratterizzati da assenza di Hb A o dalla presenza di questa in quantità variabili (ma comunque piccole), suggeriva l'esistenza di una certa variabilità ed eterogeneità del danno molecolare.

## BASI MOLECOLARI DELLE TALASSEMIE

Mentre le basi molecolari dei difetti strutturali delle emoglobine sono ben comprese e dimostrabili, le precise ragioni molecolari alla base di molte delle talassemie non sono state ancora stabilite a causa della complessità dei meccanismi della sintesi proteica a livello di qualunque dei quali può verificarsi un danno.

Recentemente la disponibilità di metodi di indagine estremamente sofisticati e precisi, quali la ibridazione molecolare in fase liquida DNA-DNA e DNA-RNA, ed il mappaggio genico mediante enzimi di restrizione, DNA ricombinante, clonaggio genico eccetera, hanno comunque chiarito non solo diversi degli aspetti più oscuri, ma anche aperto uno spiraglio ad interventi fino a qualche tempo fa impensabili. Il recente successo ottenuto da COSTANTINI e LACY (1981) nella introduzione di un gene per la  $\beta$ -globina nel genoma di topo ne rappresenta un chiaro esempio.

Come già detto la sequenza di basi del DNA che codifica per le globine, e per altri geni di eucarioti, è discontinua ed intercalata da tratti detti « intercorrenti » o anche « introni », non codificanti. Sebbene la funzione degli introni sia ancora sconosciuta, è stato proposto che essi abbiano un ruolo molto importante nella evoluzione, ruolo che si esplicherebbe unendo diverse combinazioni di tratti di DNA codificanti sequenze proteiche strutturali (CRICK, 1979). Gli introni, unitamente agli « esoni » codificanti, vengono trascritti in un grosso precursore, colineare al DNA, di RNA che nel nucleo subisce modifiche di varia natura quali l'aggiunta di un « cappuccio » di metil-guanosina all'estremo 5' e una coda poliadenosilica all'estremo 3' (« processing »), seguite dall'allontanamento delle sequenze complementari agli introni e dalla saldatura del restante RNA (« splicing »). L'mRNA così accorciato e maturato, viene trasportato nel citoplasma nel quale, associandosi all'apparato traduzionale, viene tradotto in globina. La globina si associa in se-

guito all'eme ed alla globina controparte formando il tetramero funzionale (NIENHUIS e coll., 1979; COUTELLE, 1981). La biosintesi del gruppo prostetico eme è invece interamente citoplasmatica e sotto il controllo di una serie di enzimi che, a partire dalla condensazione di succinil-CoA e glicina, portano alla sintesi della protoporfirina IX via acido  $\delta$ -aminolevulinico (ALA) e porfobilinogeno. L'eme-sintetasi catalizza infine la inserzione dello ione Fe nella molecola della protoporfirina (GRANICK e LEVERE, 1964).

Tralasciando gli eventuali danni a carico della biosintesi dell'eme, che non provocano come risultato sindromi talassemiche, le cause finora dimostrate che si esprimono con le numerose forme talassemiche, possono essere così riassunte:

1. Delezione dell'intero gene, di porzioni più o meno estese di esso e/o di DNA fiancheggiante il gene intatto;
2. Delezione di frammenti di DNA estendentesi dall'interno del gene a zone di DNA contigue;
3. Mutazioni determinanti triplette « non-sense » con conseguente arresto precoce della trascrizione. Ne rappresentano esempi la mutazione a carico della tripletta 17 codificante lisina, AAG, nell'mRNA della  $\beta$ -globina, in UAG codificante « fine sintesi » scoperta in un omozigote di origine cinese (CHANG e KAN, 1979), e la mutazione a carico della tripletta 39 codificante glutamina, CAG, ancora nell'mRNA per la catena  $\beta$ . in UAG « fine sintesi », descritta in omozigoti sardi (TRECARTIN e coll., 1981) ed in un altro omozigote pure di origine italiana (MOSCHONAS e coll., 1981). In questi casi le quantità di mRNA prodotte sono irrilevanti (1-5% del normale);
4. Mutazioni di varia entità a carico degli introni, che determinano la produzione di mRNA maturo in quantità abnormemente scarse;
5. Presenza di fattori inibenti la traduzione (CONCONI e coll., 1979).

(per una rassegna completa della bibliografia riguardante le mutazioni e i danni suddetti vedere: ORKIN e coll., 1979; NIENHUIS e coll., 1979; WEATHERALL e CLEGG, 1979; BANK e coll., 1980; MANIATIS e coll., 1980; WEATHERALL e CLEGG, 1981).

In tutti i casi la diretta conseguenza della riduzione della sintesi di una globina è la presenza di un eccesso della globina controparte che continua ad essere sintetizzata in quantità normali.

## FISIOPATOLOGIA DELLE TALASSEMIE

La fisiopatologia delle talassemie è essenzialmente determinata dalla continua sintesi della globina controparte che viene in tal modo a trovarsi in eccesso. Naturalmente la quantità di globina spaiata dipende dalla condizione di etero- o omozigosi o dalla presenza di difetti interagenti: così gli effetti dovuti alla  $\beta$ -talassemia (presenza di un *eccesso* di catene  $\alpha$ ) possono essere in parte annullati dalla concomitante presenza dell' $\alpha$ -talassemia (presenza di un *difetto* di catene  $\alpha$ ) (KAN e NATHAN, 1970; MASALA e coll., 1979; LONGINOTTI e coll., 1981).

Non tutte le catene globiniche eventualmente presenti in eccesso, comunque, determinano la stessa fisiopatologia: come è evidente dallo studio comparato della  $\beta$ - e dell' $\alpha$ -talassemia, i maggiori danni sembrano quelli causati dall'eccesso di catene  $\alpha$  libere nella  $\beta$ -talassemia. In effetti le catene  $\alpha$  si accumulano formando aggregati particolarmente instabili che precipitano prontamente nei precursori eritroidi in attiva fase di sintesi, mentre le catene  $\beta$  e quelle  $\gamma$  sono più stabili e riescono a formare per un certo periodo di tempo omotetrameri ( $\beta_4$ , HbH e  $\gamma_4$ , Hb Bart) solubili, anche se fisiologicamente inutili a causa della eccessiva affinità per l'ossigeno (la loro curva di dissociazione è quasi sovrapponibile a quella della mioglobina). Per queste ragioni il feto  $\alpha$ -talassemico omozigote non riuscirebbe a sopravvivere in utero, o per qualche ora dopo la nascita, se non disponesse di percentuali di Hb Portland intorno al 10%.

Le inclusioni insolubili dovute alle globine precipitate determinano la morte prematura della cellula eritroide o danni irreversibili a carico della membrana cellulare. Le poche emazie che emergono dal midollo, ipocromiche per la scarsa emoglobina formata, determinano l'instaurarsi di uno stato anossico che stimola la produzione di altri precursori eritroidi anch'essi destinati a morire prematuramente nell'organo ematopoietico (eritropoiesi inefficace). Ovviamente questi fenomeni sono imponenti nell'omozigosi  $\beta$ -talasse-

mica e nella malattia da Hb H, quando cioè la quantità di catene libere è di grosse proporzioni.

Nell'eterozigote invece, i danni sono modesti ed asintomatici ma comunque presenti e tali da poter essere riconosciuti senza eccessiva difficoltà. Inoltre essi sono, entro limiti abbastanza ristretti, caratteristici per ogni tipo di talassemia, come si vedrà nel dettaglio più oltre.

Le modificazioni indotte dalla presenza di globine libere sono essenzialmente morfologiche, fisiologiche e biochimiche, queste ultime a carico soprattutto dei lipidi e delle proteine di membrana (RACHMILEWITZ e KAHANE, 1980). Le emazie appaiono, a causa della scarsa emoglobinnizzazione, più o meno distorte e di forma insolita (anisocitosi, poichilocitosi, cellule a bersaglio ecc.). Al microscopio elettronico tali modificazioni appaiono determinate da bizzarre invaginazioni, reduplicazioni o riavvolgimenti della membrana plasmatica (WINTROBE, 1974). Alle anomalie morfologiche sono associate una serie di alterazioni fisiologiche quali un aumentato efflusso di ioni  $K^+$  ed altri cationi (VETTORE e TEDESCO, 1974; KNOX-MACAULAY e WEATHERALL, 1974); la perdita di materiale intracellulare osmoticamente attivo determina l'accartocciamento della emazia con aumento della rigidità di membrana ed aumento della capacità da parte del globulo rosso di assumere acqua in ambiente ipotonico (aumento delle resistenze globulari osmotiche) (GUNN e coll., 1972), un tempo utilizzata come criterio diagnostico, per una probabile perdita di gruppi SH attivi nella pompa dei cationi (KAHANE e RACHMILEWITZ, 1976).

Le catene globiniche intracellulari in eccesso subiscono, con la loro precipitazione, una serie di fenomeni auto-ossidativi che comportano l'introduzione di una molecola di acqua nella tasca dell'eme, la trasformazione dell'ossiemoglobina e la precipitazione di questa in emicromi insolubili. La metaemoglobina libera una serie di radicali ad alta energia, quali il radicale superossido, il perossido, l'idrossilico e l'ossigeno singoletto, definibili col termine generale di « ossigeno attivato », che sono i responsabili più o meno diretti della evidente aumentata perossidazione dei lipidi di membrana e delle proteine (CARREL e coll., 1975; RACHMILEWITZ e KAHANE, 1980). In particolare tali perossidazioni si sono dimostrate a carico delle sialoglicoproteine (con riduzione dei residui di acido sialico) e delle proteine della faccia interna, dei lipidi (con

aumento ponderale dei lipidi e del colesterolo) e della vitamina E che, date le sue funzioni antiossidanti, diminuisce sensibilmente (RACHMILEWITZ e KAHANE, 1980).

Una conferma indiretta delle ragioni che determinano la fisiopatologia delle talassemie, ed in particolare della  $\beta$ -talassemia, viene dallo studio della persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH) e da alcune, circoscritte, forme di  $\delta\beta$ -talassemia tutte caratterizzate dalla presenza di livelli elevati di emoglobina fetale anche nella vita adulta in assenza delle caratteristiche talassemiche. I danni molecolari che caratterizzano queste forme consistono solitamente di delezioni che, a partire dal DNA in 3' al gene  $\beta$ , si spingono in 5' fino a determinare la delezione del gene  $\delta$ , di segmenti della zona intergenica e, qualche volta, del gene  $\alpha$ ; talvolta i danni molecolari che caratterizzano alcune di tali forme sono invece di entità talmente modesta da non essere svelabili nemmeno con la pur sofisticata metodologia del DNA ricombinante (OTTOLENGHI e coll., 1979; BERNARDS e FLAVELL, 1980). I soggetti omozigoti sono facilmente riconoscibili per la presenza di sola Hb F nel sangue periferico, praticamente in mancanza di patologia di rilievo. Ciò in virtù della produzione di quantitativi di catene  $\gamma$  che in qualche caso equivalgono a quelle  $\alpha$  a causa di meccanismi, non ancora chiariti nel dettaglio, che impediscono il verificarsi dello « spegnimento » dei geni  $\gamma$ . In tal modo, mancando la presenza di globine in largo eccesso, manca praticamente la causa prima della sintomatologia talassemica.

#### METODI DI LABORATORIO PER LA DIAGNOSI DELLE TALASSEMIE

Tutti i metodi impiegati per svelare la presenza di un gene talassemico si basano sulle conoscenze riassunte nelle righe precedenti. Poiché la ridotta emoglobinizzazione riduce volume e contenuto cellulare, la determinazione dei più comuni parametri ematologici fisici mediante un moderno contatore elettronico di particelle costituisce un primo, ed essenziale, approccio. Generalmente il numero di globuli rossi aumenta mentre diminuiscono emoglobina percentuale, volume medio (MCV) ed emoglobina corpuscolare media (MCH).

L'elettroforesi, in assenza di anomalie concomitanti, non è qualitativamente diversa dal normale e deve perciò essere utilizzata esclusivamente per evidenziare, od escludere, la presenza di geni per la  $\delta\beta$ -talassemia, per la HPFH, per la emoglobinopatia Lepore e varianti in genere o la presenza di Hb H nell'adulto e Hb Bart nel neonato. L'aumento percentuale della Hb A<sub>2</sub> nella  $\beta$ -talassemia, non sempre evidenziabile alla elettroforesi, è l'unico parametro realmente discriminante per cui la sua determinazione merita una attenzione del tutto particolare. Il metodo microcromatografico di HUISMAN e coll. (1975), adattato e modificato in diversi laboratori (GALANELLO e coll., 1977) rappresenta per la sua semplicità di esecuzione, precisione e accuratezza il metodo più indicato che consente l'esame di un gran numero di campioni per volta. Per i laboratori meno attrezzati inoltre, sono disponibili colonne microcromatografiche pronte per l'uso distribuite da diverse ditte.

Nel caso dell' $\alpha$ -talassemia l'elettroforesi di per sé può dare indicazioni precise solo in presenza di concentrazioni discrete di Hb H nell'adulto o di Hb Bart nel neonato, come già accennato.

La presenza di globine libere intracellulari, mentre non è evidenziabile nella  $\beta$ -talassemia, è invece abbastanza facilmente riconoscibile nella eterozigosi per l' $\alpha$ -talassemia. Secondo MELIS e coll. (1980) nel 70% dei sardi sospetti portatori del carattere, la presenza dei corpi inclusi da Hb H è sempre facilmente evidenziabile. Praticamente tali corpi inclusi vengono messi in evidenza inducendone la precipitazione mediante incubazione a 37° per 1 ora di una parte di sangue ed una parte di Brilliant Cresyl Blue all'1% in soluzione fisiologica.

Lo sbilancio di sintesi globinica può essere dimostrato determinando la capacità di incorporare aminoacidi marcati da parte di reticolociti in presenza degli opportuni substrati. Le globine neosintetizzate vengono separate, insieme a quelle già presenti nelle emazie, mediante cromatografia a scambio ionico, e la radioattività incorporata espressa in termini di rapporto  $\alpha/\beta$  (HEYWOOD e coll., 1964; WEATHERALL e coll., 1965; BANK e MARKS, 1966). In condizioni normali tale rapporto è intorno a 1, mentre in presenza di un gene  $\beta$ -talassemico è teoricamente uguale a 2. Nella  $\alpha$ -talassemia il rapporto di sintesi  $\alpha/\beta$  dipende dal numero di geni deleti o malfunzionanti ed è comunque teoricamente pari a 0,75 in mancanza di un gene su 4, 0,5 in mancanza di 2 geni, e 0,25 nella ma-

lattia da Hb H in mancanza di 3 geni. I rapporti teorici sono piuttosto sovrapponibili a quelli pratici solo nell' $\alpha$ -talassemia delle popolazioni thailandesi il cui difetto dipende quasi esclusivamente da delezioni. I reperti globino-sintetici relativi ad altre popolazioni sono tuttora in fase di interpretazione.

La presenza di Hb F in concentrazioni visibili alla elettroforesi e stimabili in oltre il 5%, in presenza di valori normali di Hb A<sub>2</sub>, devono far sospettare la presenza di un gene per la  $\delta\beta$ -talassemia o per la HPFH. La esatta determinazione quantitativa della Hb F con uno dei diversi metodi a disposizione e lo studio della sua composizione in termini di catene G $\gamma$  e A $\gamma$  consentono, con una certa approssimazione in mancanza di altri metodi più sofisticati, di distinguere fra i due genotipi. La determinazione quali-quantitativa delle due catene  $\gamma$ , mentre nel passato presentava grosse difficoltà a causa delle metodologie applicabili soltanto in laboratori altamente specializzati, può essere oggi eseguita con diversi metodi elettroforetici relativamente semplici (COMI e coll., 1979; RIGHETTI e coll., 1979; ALTER e coll., 1980).

Altri metodi, oltre a quelli qui trattati sommariamente, sono disponibili per il laboratorio di ricerca ed analisi o screening e consentono di giungere ad una diagnosi precisa e puntuale (HUISMAN e JONXIS, 1977).

Semplici determinazioni biochimico-cliniche, quali la determinazione del ferro sierico, consentono di appurare la eventuale presenza di altra patologia con manifestazioni simil-talasseemiche, mentre nel caso di interazioni a volte veramente complicate fra diverse talassemie e fra talassemie ed emoglobinopatie qualitative, lo studio genetico-familiare ortodosso rappresenta spesso il miglior mezzo ausiliario alla diagnosi.

Nella pratica routinaria di diagnosi e screening delle talassemie, i metodi e gli interventi sopra descritti sono « allineati » secondo un flusso organico, il cui diagramma è mostrato nella Fig. 1, in cui mediante una serie successiva di livelli decisionali, si giunge alla formulazione della diagnosi differenziale.

Poiché al primo livello decisionale del diagramma di flusso, che si basa sulla determinazione accoppiata dell'MCV e dell'MCH e della Hb A<sub>2</sub>, i soggetti con valori di MCV superiori a 79, MCH superiore a 27 ed Hb A<sub>2</sub> inferiore a 3,5% vengono considerati normali ed esclusi da successivi accertamenti, un certo numero di

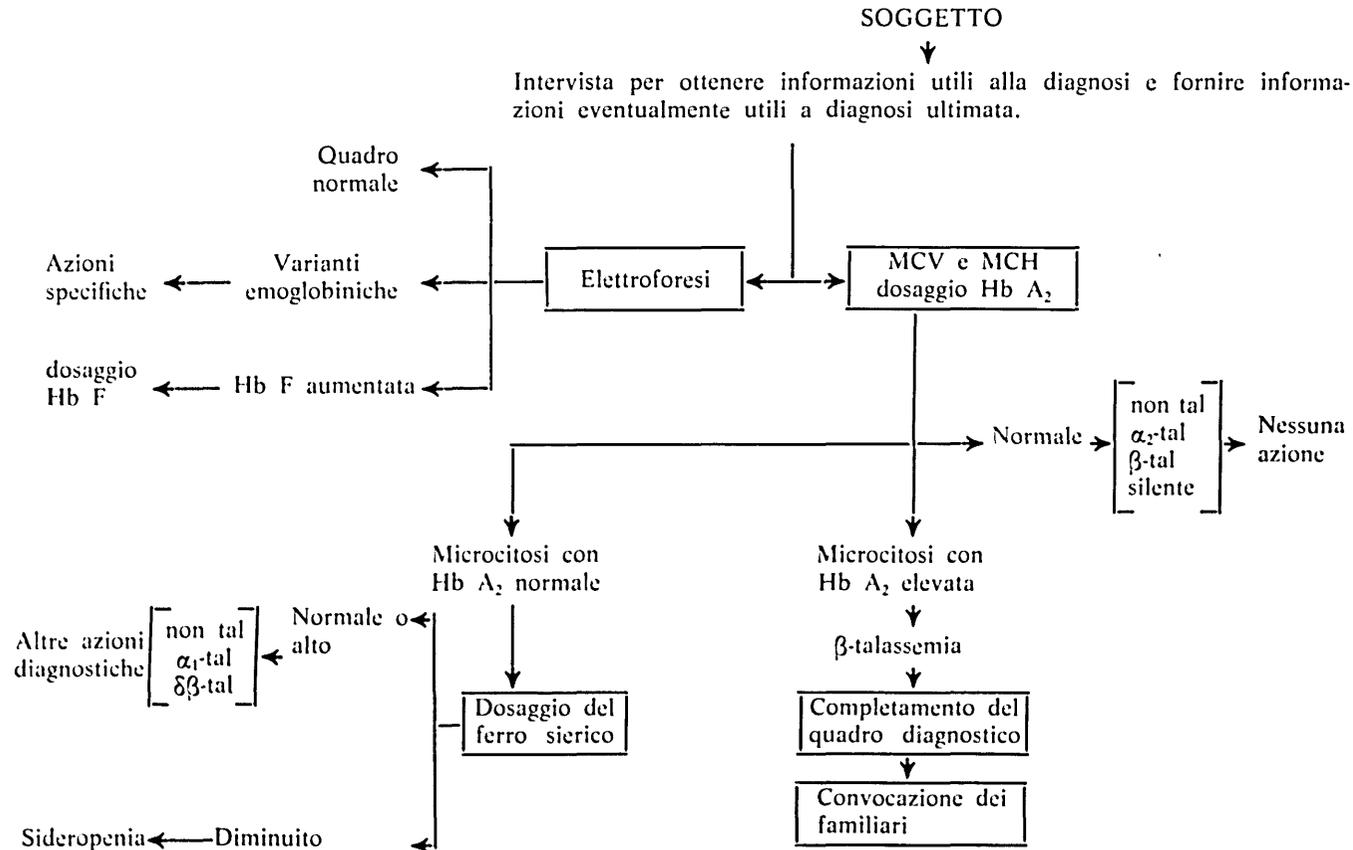


Fig. 1 - Diagramma di flusso degli interventi che consentono la formulazione della diagnosi differenziale delle talassemie eterozigoti (modificato da TEXTORI e coll., 1980).

$\alpha_2$ -talassemici e di  $\beta$ -talassemici cosiddetti « silenti », possono sfuggire alla diagnosi. Se il mancato riconoscimento dell'eterozigote  $\alpha_2$ -talassemico non rappresenta un vero inconveniente, come si vedrà più oltre, può invece essere di rilievo in regioni ad alta incidenza di  $\beta$ -talassemici, la presenza del gene «  $\beta$ -silente », falso negativo in senso stretto, la cui incidenza non è stimata né, probabilmente stimabile.

#### LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELL'ALFA-TALASSEMIA

La conoscenza del fenotipo ematologico caratteristico dell' $\alpha$ -talassemia non è fondamentale, come nel caso della  $\beta$ -talassemia, per la prevenzione della malattia allo stato omozigote poiché essa non è mai stata descritta nelle nostre popolazioni e sono stati segnalati solo due casi nell'area del Mediterraneo. La malattia da Hb H, inoltre, ha un decorso clinico solitamente favorevole e compatibile con una vita normale. Peraltro l'incidenza di questa forma nelle popolazioni nelle quali è diffusa la  $\beta$ -talassemia, è piuttosto elevata e tale da costituire un serio problema diagnostico e di consultorio quando non venisse effettuata, o non fosse possibile effettuare, la sua precisa identificazione.

L'analisi del DNA mediante enzimi di restrizione ha dimostrato la notevolissima eterogeneità dei danni molecolari alla base della riduzione totale o parziale della sintesi della globina  $\alpha$ . Sono state infatti descritte delezioni da 1 a 4 geni  $\alpha$  senza danni a carico dei geni embrionali  $\zeta$  (delezioni tipo thailandese); delezioni che si spingono in 5' fino a provocare anche la delezione di geni  $\zeta$  (delezioni tipo mediterraneo); difetti da non-delezione o con delezione di piccoli frammenti di DNA. Sono state inoltre descritte associazioni fra genotipi da delezione e non-delezione e diverse non-delezioni fra loro (WEATHERALL e CLEGG, 1981 per una bibliografia completa). E' stata infine suggerita la ragione della mancanza della omozigosi in certe popolazioni (KATTAMIS e coll., 1980; PRESSLEY e coll., 1980; DOZY e coll., 1979). Essa si spiegherebbe con la delezione contemporanea dei geni  $\alpha$  e  $\zeta$ , con conseguente impossibilità di formazione della Hb Portland e delle altre emoglobine embrionali nel caso delle popolazioni mediterranee, e con la mancanza di casi di delezioni di ambedue i geni  $\alpha$  in *cis* nelle popolazioni negre.

Recentemente (ORKIN e GOFF, 1981) è stata osservata una diversa capacità di produrre mRNA da parte dei due geni  $\alpha$  (la capacità del gene  $\alpha_2$  in 5' starebbe a quella del gene  $\alpha_1$  in 3' come 60:40). Tale interessante osservazione consentirà probabilmente di chiarire aspetti ancora piuttosto oscuri quali le descritte discrepanze fra i rapporti di sintesi globinica nelle varie forme  $\alpha$ -talasemiche eterozigoti, e renderà nel contempo obsoleta l'attuale classificazione dei trait basata sui caratteri fenotipici.

Limitatamente al genotipo orientale, schematizzando con  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  l'assetto normale dei geni sui due cromosomi, si possono distinguere genotipi la cui espressione è correlata col numero di geni deleti: l' $\alpha_2$ -talassemia ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) con lieve riduzione della globinosintesi in  $\alpha$  e parametri ematologici talvolta indistinguibili da quelli normali;  $\alpha_1$ -talassemia ( $--/\alpha\alpha$  o anche  $-\alpha/-\alpha$ ) con sbilancio del rapporto di sintesi  $\alpha/\beta$  più consistente essendo compreso fra 0,6 e 0,7, parametri eritrocitari alterati (MCV intorno a 70 fl ed MCH intorno a 23 pg) con Hb A<sub>2</sub> normale e corpi inclusi da Hb H presenti nella gran parte dei casi; malattia da Hb H (composto genetico fra  $\alpha_2$ - e  $\alpha_1$ -talassemia,  $--/-\alpha$ ) con forte riduzione dei parametri eritrocitari, corpi inclusi presenti in quasi tutte le cellule rosse e Hb H in quantità rilevanti nel tracciato elettroforetico; idrope fetoplacentare ( $--/--$ ) omozigosi per l' $\alpha_1$ -talassemia con assetto  $--/\alpha\alpha$  (KAN e coll., 1975; WASI e coll., 1969).

I genotipi da non-delezione vengono rappresentati in modo simile sulla base delle caratteristiche mostrate dal DNA sottoposto alla azione delle endonucleasi di restrizione: 22,5 kb e 2,6 kb rappresentano due genotipi, presenti nei non-asiatici, evidenziabili con l'enzima Eco RI, producenti ambedue un fenotipo ematologico assegnabile all' $\alpha_1$ -talassemia (con microcitosi, ipocromia, anisopoichilocitosi, Hb A<sub>2</sub> ed F normali, resistenze globulari aumentate, corpi inclusi presenti ma non numerosi) la cui interazione non produce l'idrope fetale ma la malattia da Hb H in forma lieve (KAN e coll., 1977; ORKIN e coll., 1979; GALANELLO e CAO, 1979).

Il notevole grado di sovrapposibilità esistente fra i caratteri fenotipici dell' $\alpha_2$ - e  $\alpha_1$ -talassemia non-orientali (esistente anche nella determinazione degli mRNA) è comunque tale da non consentire discriminazioni precise talvolta nemmeno nei confronti dei soggetti normali. Date queste difficoltà è possibile stabilire parametri ematologici medi solo a carico di soggetti identificati per la presenza di

corpi inclusi da Hb H, o per l'esistenza di un rapporto di sintesi globinica sbilanciata o in soggetti eterozigoti obbligati perché genitori o figli, di pazienti affetti dalla malattia da Hb H.

La tabella 1 mostra i parametri ematologici medi e la deviazione standard calcolati su 56 soggetti maschi e 89 femmine positivi per la presenza di corpi inclusi e la significatività statistica nei confronti di 117 maschi e 183 femmine normali presi a caso. Ovviamente ai valori medi calcolati in questo modo non possono essere assegnati genotipi precisi. I soggetti presi in considerazione si riferiscono ad una parte della casistica raccolta presso il Laboratorio Interdisciplinare per lo studio delle Talassemie, Emoglobinopatie e Favismo (LITEF) della Università di Sassari, sulla popolazione del Nord Sardegna.

La diagnosi e lo studio della genetica della  $\alpha$ -talassemia sembrava più agevole, e veniva consigliata, da effettuarsi su neonati data l'evidenza che l'aumento dei livelli di Hb Bart nel sangue di funicolo correla con il numero di geni  $\alpha$ -talassemici, analogamente alla alterazione dei parametri ematologici (da 1 a 3% di Hb Bart nell' $\alpha_2$ -talassemia, 5-10% nell' $\alpha_1$ -talassemia, 25% negli Hb H). In realtà l'incidenza del tratto nelle diverse regioni dell'Italia meridionale è conosciuta quasi esclusivamente sulla base di screenings neonatali (per la bibliografia vedere GALANELLO e CAO, 1979). Tuttavia tale metodo è stato messo in dubbio dalla evidenza che la percentuale di neonati portatori del tetramero in varie concentrazioni non correla col numero di portatori identificabili fra gli adulti (DEMURO e coll., 1980) né con la percentuale di anomalie rilevabili sul tratto di DNA del cromosoma 16 nel quale sono localizzati i geni  $\alpha$  (CAO, 1981).

In mancanza di metodi semplici e sicuri, la diagnosi dell' $\alpha$ -talassemia resta pertanto un problema non completamente risolto anche se, è bene ricordarlo, essa è necessaria per facilitare quella, ben più importante nella prevenzione genetica pre-probanda, della  $\beta$ -talassemia.

Tab. 1 - Parametri critrocitari medi, deviazione standard e significatività statistica di un gruppo di soggetti  $\alpha$ -talassemici, individuati sulla base della presenza di corpi inclusi intraeritrocitari da Hb H, confrontati con i parametri medi e la deviazione standard di un gruppo di soggetti normali.

PARAMETRI	SOGGETTI ALFA-TALASSEMICI		SIGNIFICATIVITÀ	SOGGETTI NORMALI	
Hb (g/dl)	58 maschi	14,9 ± 1,55	P < 0,05	117 m.	15,9 ± 1,93
	89 femmine	13,0 ± 1,25	P < 0,05	183 f.	13,5 ± 1,41
PCV (%)	58 maschi	46,2 ± 4,99	n.s.	117 m.	45,7 ± 2,93
	89 femmine	40,9 ± 8,85	n.s.	183 f.	38,8 ± 4,32
RBC ( $10^{12}/l$ )	58 maschi	5,86 ± 0,55	P < 0,01	117 m.	5,18 ± 0,40
	89 femmine	5,41 ± 0,49	P < 0,01	183 f.	4,60 ± 0,59
MCV (fl)	58 maschi	79,4 ± 5,39	P < 0,01	117 m.	89,1 ± 5,68
	89 femmine	77,0 ± 5,88	P < 0,01	183 f.	80,9 ± 4,94
MCH (pg)	58 maschi	25,7 ± 1,96	P < 0,01	117 m.	29,4 ± 1,95
	89 femmine	24,6 ± 2,48	P < 0,01	183 f.	34,3 ± 0,76
MCHC (g/dl)	58 maschi	32,1 ± 1,41	n.s.	117 m.	38,1 ± 1,39
	89 femmine	31,7 ± 1,63	n.s.	183 f.	32,8 ± 1,48
Hb A <sub>2</sub> (%)	58 maschi	2,43 ± 0,39	n.s.	117 m.	2,55 ± 0,22
	89 femmine	2,27 ± 0,39	n.s.	183 f.	2,52 ± 0,26

#### RIASSUNTO

Vengono descritti alcuni dei recenti aspetti della conoscenza delle basi biochimiche e molecolari delle talassemie, unitamente ai metodi utilizzati per la diagnosi e lo screening delle talassemie in generale e dell' $\alpha$ -talassemia eterozigote in particolare.

## BIBLIOGRAFIA

- ALTER B.P., GOFF S., EFREMOV G.D., GRAVELY M.E., HUISMAN T.H.J., 1980 — Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the  $G_1/A_1$  ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Brit J. Haematol.*, 44: 527-534.
- BANK A., MARKS P.A., 1966 — Excess  $\alpha$  chain synthesis relative to  $\beta$  chain synthesis in thalassemia major and minor. *Nature*, 212: 1198-1200.
- BANK A., MEARS J.G., RAMIREZ F., 1980 — Disorders of human hemoglobin. *Science*, 207: 486-493.
- BERNARDS R., FLAVELL R.A., 1980 — Physical mapping of the globin gene deletion in hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH). *Nucleic Acid Res.*, 8: 1521-1534.
- BUNN H.F., FORGET B.G., RANNEY H.M., 1977 — Human hemoglobins, W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- CAO A., 1981 — Thalassemia types in southern Sardinia. *Abst. International Symposium on Recent Advances in Thalassemia*, pag. 32. S. Margherita di Pula, 7-11 giugno.
- CARRELL R.W., WINTERBOURN C.C., RACHMILEWITZ E.A., 1975 — Activated oxygen and haemolysis. *Brit. J. Haematol.*, 30: 259-264.
- CHANG J.C., KAN Y.K., 1979 —  $\beta^0$ -Thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2886-2889.
- CONCONI F., BERNARDI F., BUZZONI D., CASONI I., DEL SENNO L., MARCHETTI G., PERROTTA C.M., 1979 —  $\beta$ -Globin messenger RNA in Ferrara  $\beta^0$ -thalassemia. In: *Fourth Cooley Anemia Symposium*. New York Academy of Science. New York.
- COMI P., GIGLIONI B., OTTOLENGHI S., GIANNI A.R., RICCO G., MAZZA U., SAGLIO G., CAMASCHELLA C., PICH P.G., GIANAZZA E., RIGHETTI P.G., 1979 —  $G_1$  and  $A_1$  globin chains separation and quantitation by isoelectric focusing. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 87: 1-8.
- COSTANTINI F., LACY E., 1981 — Introduction of rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line. *Nature*, 294: 94-97.
- COUTELLE C., 1981 — The precursor to animal cell messenger RNA. *Biochem. J.*, 197: 1-6.
- CRICK F., 1979 — Split genes and RNA splicing. *Science*, 204: 264-271.
- DEMURO P., MASALA B., LONGINOTTI M., PILO G., ANGIUS G., TIDORE M., PARDINI S., OGGIANO L., 1980 — Il fenotipo ematologico dei neonati portatori di Hb Bart's. *Atti XVIII Riunione Gruppo Studio Eritrocita*, pagg. 42-45.
- DOZY A.M., KAN Y.W., EMBURY S.M., MENTZER W.C., WANG W.C., LUBIN B., DAVIS J.R., KOENIG N.M., 1979 — Globin gene organization in blacks precludes the severe form of  $\alpha$ -thalassaemia. *Nature*, 280: 605-607.

- GALANELLO R., CAO A., 1979 — L' $\alpha$ -talassemia: eterogeneità, patologia molecolare, genetica, incidenza, aspetti clinici ed ematologici, fisiopatologia, associazione  $\alpha$ -tal/varianti emoglobiniche, prevenzione e terapia. *Riv. Ital. Ped.*, 5: 457-471.
- GALANELLO R., MELIS M.A., MURONI P.P., CAO A., 1977 — Quantitation of Hb A<sub>2</sub> with DE-52 microchromatography in whole blood as screening test for  $\beta$ -thalassemia heterozygotes. *Acta Haematol.*, 57: 32-36.
- GRANICK S., LEVERE R.D., 1964 — Heme synthesis in erythroid cells. *Progr. Hematol.*, 4: 1-47.
- GUNN R.B., SILVERS D.N., ROSSE W.F., 1972 — Potassium permeability in  $\beta$ -thalassemia minor red blood cells. *J. Clin. Invest.*, 51: 1044-1049.
- HEYWOOD J.D., KARON M., WEISSMAN S., 1964 — Amino acids incorporation into alpha- and beta-chains of hemoglobin by normal and thalassaemic reticulocytes. *Science*, 146: 530-532.
- HUEHNS E.R., DANCE N., BEAVEN G.H., HECHT F., MOTULSKY A.G., 1964 — Human embryonic hemoglobins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 29: 327-331.
- HUISMAN T.H.J., JONXIS J.H.P., 1977 — The hemoglobinopathies. Marcel Dekker Inc. New York.
- HUISMAN T.H.J., SCHROEDER W.A., BRODIE A.N., MAYSON S.M., JAKAWAY J., 1975 — Microchromatography of hemoglobins III. A simplified procedure for the determination of hemoglobin A<sub>2</sub>. *J. Lab. Clin. Med.*, 86: 700-702.
- KAHANE I., RACHMILEWITZ E.A., 1976 — Alterations in red blood cell membrane and the effect of vitamin E on osmotic fragility in  $\beta$  thalassaemia major. *Isr. J. Med. Sci.*, 12: 11-15.
- KAN Y.W., DOZY A.M., TRECARTIN R., TODD D., 1977 — Identification of a nondeletion defect in  $\alpha$ -thalassaemia. *N. Engl. J. Med.*, 297: 1081-1084.
- KAN Y.W., DOZY A.M., VARMUS H.E., TAYLOR J.M., HOLLAN J.P., LIEJNJO L.E., GANESON J., TODD D., 1975 — Deletion of  $\alpha$ -globin genes in haemoglobin H disease demonstrates multiple  $\alpha$ -globin structural loci. *Nature*, 255: 255-256.
- KAN Y.W., NATHAN D.G., 1970 — Mild thalassaemia: the result of interactions of alpha and beta thalassaemia genes. *J. Clin. Invest.*, 49: 635-642.
- KATTAMIS C., METAXOTOU-MAVROMATI A., TSIARTA E., METAXATOU C., WASI P., WOOD W.G., PRESSLEY L., HIGGS D.R., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J., 1980 — Haemoglobin Bart's hydrops syndrome in Greece. *Brit. Med. J.*, 2: 268-270.
- KNOX-MACAULAY H.H.M., WEATHERALL D.J., 1974 — Studies of red cell membrane function in heterozygous  $\beta$  thalassaemia and other hypochromic anaemias. *Brit. J. Haematol.*, 28: 277-297.
- LONGINOTTI M., MASALA B., TIDORE M., FALCHI P.P., DEMURO P., ANGIUS G., DORE F., PARDINI S., PRANZETTI P., CAMPUS S., 1981 — Hematological and biosynthetic features of  $\beta$  thalassaemia with an associated  $\alpha$  thalassaemia heterozygosity in Sardinia. *Hemoglobin*, 5: 619-625.

- MANIATIS T., FRITSCH E.F., LAUER J., LAWN R.M., 1980 — The molecular genetics of human hemoglobins. *Ann. Rev. Genet.*, 14: 145-178.
- MASALA B., LONGINOTTI M., DORE F., PARDINI S., ANGIUS G., DEMURO P., 1979 — Heterogeneity of red blood cell indices in different beta-thalassemia genotypes. *Abstract International Meeting on New Biomedical Trends in Thalassemia and Favism*. pag. 9. Stintino 21-22 settembre.
- MELIS M.A., ROSATELLI L., FALCHI A.M., ANGIUS A., FURBETTA M., GALANELLO R., CAO A., 1980 — Hematological characteristics of sardinian  $\alpha$ -thalassemia carriers detected in a population study. *Acta Haematol.*, 63: 32-36.
- MOSCHONAS N., DE BOER E., GROSVELD F.G., DAHL H.H.M., WRIGHT S., SHEWMAKER C.K., FLAVELL R.A., 1981 — Structure and expression of a cloned  $\beta^0$  thallemic globin gene. *Nucleic Acid Res.*, 9: 4391-4401.
- NIENHUIS A.W., BENZ E.J., PROPPER R., GORASH L., ANDERSON F., HENRY W., BORER J., 1979 — Thalassemia major: molecular and clinical aspects. *Ann. Internal Med.*, 91: 883-897.
- ORKIN S.H., GOFF S.C., 1981 — The duplicated human  $\alpha$ -globin genes: their relative expression as measured by RNA analysis. *Cell*, 24: 345-351.
- ORKIN S.H., OLD J., LAZARUS N., ALTAY C., GURGEY A., WEATHERALL D.J., NATHAN D.G., 1979 — The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemias: frequent occurrence of dysfunctional  $\alpha$  loci among non-Asians with Hb H disease. *Cell*, 17: 33-42.
- OTTOLENGHI S., GIGLIONI B., COMI P., GIANNI A.M., POLLI E., ACQUAYE C.T.A., OLDHAM J.H., MASERA G., 1979 — Globin gene deletion in HPFH,  $\delta^0\beta^0$  thalassaemia and Hb Lepore disease. *Nature*, 278: 654-656.
- PRESSLEY L., HIGGS D.R., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J., 1980 — Gene deletion in  $\alpha$ -thalassaemia prove that the 5'  $\zeta$  locus is functional. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3586-3589.
- RACHMILEWITZ E.A., KAHANE I., 1980 — The red blood cell membrane in thalassemia. *Brit. J. Haematol.*, 46: 1-6.
- RIGHETTI P.G., GIANAZZA E., GIANNI A.M., COMI P., GIGLIONI B., OTTOLENGHI S., SECCHI C., ROSSI-BERNARDI L., 1979 — Human globin chain separation by isoelectric focusing. *J. Biochem. Biophys. Met.*, 1: 45-57.
- TENTORI L., MARINUCCI M., MAVILIO F., 1980 — Metodi per lo screening delle talassemie in Italia. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetto Finalizzato Medicina Preventiva, sub-progetto MEE (Malattie Ereditarie dell'Eritrocita).
- TRECCARTIN R.F., LIEBHABER S.A., CHANG J.L., LEE K.Y., KAN Y.W., FURBETTA M., ANGIUS A., CAO A., 1981 —  $\beta^0$  Thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J. Clin. Invest.*, 68: 1012-1017.
- TRIVELLI L.A., RANNEY H.M., LAI H., 1971 — Hemoglobin components in patients with diabete mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 284: 353-357.
- VETTORE L., TEDESCO C.J.G., 1975 — Membrane lipid peroxidation in hypochromic red blood cells. *Haematologica*, 60: 250.

- WASI P., NA-NAKORN S., POOTRAKUL S., SOOLANEK M., DISTHASONGEAHN P., PORUPATKUL M., PANICH V., 1969 — Alpha and beta-thalassemia in Thailand. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 165: 60-82.
- WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., 1979 — Recent developments in the molecular genetics of human hemoglobin. *Cell*, 16: 467-479.
- WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., 1981 — *The thalassaemia syndromes*. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., NAUGHTON M.A., 1965 — Globin synthesis in thalassaemia :an in vitro study. *Nature*, 208: 1061-1065.
- WINTROBE M.M., 1974 — *Clinical hematology*. 7th Edn. Lea Fabiger. Philadelphia.