

REGISTRO DE HEMOGLOBINOPATIAS EN UN HOSPITAL DE TERCER  
NIVEL E INTEGRACION DEL PERFIL MUTACIONAL

Sergio Felipe Pinzón Mariño

Y4280969Q

Trabajo de fin de Master

Master en iniciación en Investigación en Medicina

Zaragoza

2017

## Tabla de Contenidos

<i>Resumen</i> .....	3
<i>Abstract</i> .....	4
<i>Introducción</i> .....	5
<i>Marco teorico</i> .....	6
<i>Hemoglobinopatias</i> .....	7
- <i>Mecanismos moleculares</i>	
○ <i>α talasemia</i> .....	8
○ <i>β talasemia</i> .....	10
○ <i>αδ talasemia</i> .....	14
<i>Manifestaciones clínicas</i>	
<i>α talasemia</i> .....	16
<i>β talasemia</i> .....	18
<i>αδ talasemia</i> .....	20
<i>Drepanocitosis</i> .....	21
<i>Hemoglobinopatias talasemicas</i> .....	22
<i>Objetivos</i> .....	23
<i>Materiales y métodos</i> .....	24
<i>Resultados</i> .....	25
<i>Conclusiones</i> .....	30
<i>Plan de difusión y explotación de resultados</i> .....	32
<i>Bibliografía</i> .....	33

## RESUMEN

**Introducción:** Las hemoglobinopatías son los trastornos monogénicos más comunes, potencialmente mortales, en el mundo. Se estima que el 7% de la población mundial son portadores la variación regional de estas entidades en países endémicos con poblaciones migrantes han generado focos de alta prevalencia en poblaciones donde estas entidades previamente mostraban una mínima prevalencia con las consiguientes consecuencias para el cribado y la prestación de servicios

**Materiales y metodos:** Estudio analítico transversal, de pacientes con diagnóstico de hemoglobinopatías, durante el período 2016-2017, el estudio molecular se realizó en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, se realizó estudio de las mutaciones más prevalentes mediante Gap-PCR y en caso de no ser detectadas, se realizó cribado genético de los genes HBA1/HBA2 o HBB.y la técnica MLPA que permite el estudio de los exones de los genes HBB y HBA1/HBA2, se revisaron informes de las consultas de pacientes con drepanocitosis para la recopilación de datos y el análisis de los mismos.

**Resultados:** 40 pacientes (53,3%) presentan una talasemia, 11 pacientes (14,6%) presentan una hemoglobinopatía 6 de estos asociados a una talasemia y 22 pacientes (30,6%) presentan drepanocitosis, se identificaron 4 diferentes tipos de mutaciones para  $\alpha$  talasemia, la más frecuente es la delección  $-\alpha_{3,7}$  (88,2%) ,para  $\beta$  talasemia se identificaron 6 tipos de mutaciones, una diferente en cada paciente. Para  $\delta\beta$  se identificó la delección DE 90-110KB en el Cluster B y para  $\alpha 0$  se identificó la delección de pseudozeta;  $\alpha 1-\alpha 2$ . Los pacientes con hemoglobinopatía, la más frecuente ES la hemoglobinopatía E y Sendegi, en 2 casos de pacientes con drepanocitosis se asocio a  $\alpha$ -talasemia. En el caso de drepanocitosis, se presentó de manera más frecuente el genotipo HbSS con un total de 8 casos (38,1%) 4 casos se presentaron asociados a beta talasemia.

**Conclusiones:** Partiendo de esta serie de pacientes, se identifica la  $\alpha$  - talasemia como la más prevalente y  $-\alpha_{3,7}$  la delección más frecuente encontrada en estos, presentan mutaciones distintas en cada caso, demostrando una prevalencia variable con respecto a otros estudios de prevalencia, el estudio de estas mutaciones tiene importancia para el diagnóstico, pronóstico clínico individual y planificación futura del manejo de posibles complicaciones, siendo estos registros el camino para desarrollar futuros estudios de cohortes y la posibilidad de comparación o integración a otros registros.

## ABSTRACT

**Introduction:** Hemoglobinopathies are the most common, potentially deadly, monogenic disorders in the world. It is estimated that 7% of the world population bear the regional variation of these entities in endemic countries with migrant populations have generated high prevalence foci in populations where these entities previously showed a minimum prevalence with the consequent consequences for the screening and the provision Of services

**Materials and methods:** A cross-sectional study of patients diagnosed with hemoglobinopathies during the period 2016-2017, the molecular study was carried out at the Hospital Clínico San Carlos in Madrid, a study was carried out on the most prevalent mutations by Gap-PCR and in If not detected, genetic screening of the HBA1 / HBA2 or HBB genes was performed and the MLPA technique allowing the study of the exons of the HBB and HBA1 / HBA2 genes, we reviewed reports of patients with depreanocytosis for The collection of data and the analysis of them.

**Results:** 40 patients (53.3%) had a thalassemia, 11 patients (14.6%) had hemoglobinopathy, 6 had thalassemia and 22 patients (30.6%) had sickle cell disease. Mutations for  $\alpha$  thalassemia, the most frequent deletion  $-\alpha_{3,7}$  (88.2%), for thalassemia  $\beta$  6 types of mutations were identified, one for each patient. For  $\delta\beta$ , the deletion DE 90-110KB was identified in Cluster B and for  $\alpha 0$  the pseudozeta deletion was identified; A1- $\alpha 2$ . Patients with hemoglobinopathy, the most frequent is hemoglobinopathy E and Sendegi, in 2 cases of patients with sickle cell disease was associated with  $\alpha$ -thalassemia. In the case of sickle cell disease, the HbSS genotype was more frequently present, with a total of 8 cases (38.1%), 4 cases were associated with beta thalassemia.

**Conclusions:** Based on this series of patients,  $\alpha$  - thalassemia is identified as the most prevalent and  $-\alpha_{3,7}$  the most frequent deletion found in these patients, they present different mutations in each case, showing a variable prevalence with respect to other prevalence studies , The study of these mutations is important for diagnosis, individual clinical prognosis and future planning of the management of possible complications, these records being the way to develop future cohort studies and the possibility of comparison or integration with other registries.

## **INTRODUCCIÓN**

Las hemoglobinopatías son enfermedades hereditarias, caracterizadas por alteraciones funcionales y estructurales, categorizadas como drepanocitosis y talasemias, Se estima que el 7% de la población mundial son portadores y que entre 300.000 y 400.000 niños afectados nacen cada año (2) La mayoría de estos tienen enfermedad de células falciformes. La variación regional de la frecuencia de la hemoglobina S (HbS) en los países endémicos de origen conduce a su vez, a través del asentamiento de poblaciones inmigrantes en grupos localizados(1)(2), a focos de alta prevalencia en poblaciones que previamente carecían de estas entidades, por ejemplo, Londres, Birmingham, París, Bruselas, Madrid y Copenhague (2), generando así consecuencias para el cribado y la prestación de servicios.

El primer registro de drepanocitosis realizado en España en 2003, demostró el gran cambio de la prevalencia de los rasgos falciformes, llevando a la implementación de programas de detección neonatal(3).

La escases de datos precisos sobre las diferentes hemoglobinopatías en España y los crecientes cambios en alternativas terapéuticas, necesidad de pruebas diagnósticas especiales, indica la necesidad de registros nacionales y locales de prevalencia de estas patologías, no solo con el objetivo de obtener registros demográficos si no como el punto de partida de estudios a nivel local y nacional.

## MARCO TEÓRICO

La hemoglobina es una proteína localizada en los eritrocitos, cada uno de estos últimos contiene aproximadamente 300 millones de moléculas de esta proteína.(1) Formada por 2 cadenas  $\alpha$   $\beta$ , cada una de las cuales contiene un grupo Hem formado por hierro y protoporfirina IX(2), cada una de las cadenas de globina difiere en su secuencia de aminoácidos, la  $\alpha$ -globina tiene 141, y las cadenas de globina  $\beta$ - $\delta$ - $\gamma$  contienen 146 aminoácidos. La codificación de la  $\alpha$ -globina tiene lugar en el cromosoma 16 del cual hay 4 genes idénticos, y en el cromosoma 11, donde hay 5 genes que codifican para las cadenas restantes. Las cadenas de hemoglobina parecen en forma secuencial, formando 4 tipos principales de hemoglobina(2).

Tabla 1. Tipos de hemoglobina humana

HEMOGLOBINA	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN	
		ADULTOS	NEONATOS
Hemoglobina A <sub>2</sub>	A $\beta$	97%	20%
Hemoglobina A	A $\delta$	2,5%	0,5%
Hemoglobina F	A $\gamma$	<1%	80%

- Hemoglobinopatías

Las hemoglobinopatías constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades secundarias a un defecto en la estructura, función o síntesis de las cadenas de globina por mutaciones. Existen hemoglobinopatías congénitas, así como hemoglobinopatías adquiridas que pueden aparecer durante el transcurso de ciertas enfermedades (2)(3).

Las hemoglobinopatías congénitas obedecen a mutaciones en los genes que codifican la síntesis de cadenas de la globina (1), las cuales se transmiten de forma hereditaria con carácter autosómico dominante o recesivo dependiendo de cada patología. (2)

Los síndromes talasémicos presentan una gran diversidad todo esto dado por su correspondiente heterogeneidad molecular (2), estos síndromes se denominan según su alteración en la cadena de globina afectada, las formas mejor caracterizadas son las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta\beta$  talasemias, cada una de estas se subclasifican según sus síntesis parcial o inexistente de cadena de globina involucrada (2)(4).

Tabla 2. Principales síndromes talasémicos

CADENA AFECTADA	SÍNDROME TALASEMICO
$\alpha$	$\alpha^0$ $\alpha^+$ Deleccional y no deleccional
$\beta$	$\beta^0$ $\beta^+$
$\Delta\beta$	$\delta\beta^0$ $\delta\beta^+$

La  $\alpha$  talasemia constituye la forma más frecuente de talasemia, ésta, es el resultado de la disminución de las cadenas de  $\alpha$ -globina de la hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) y la hemoglobina A adulta ( $\alpha_2\beta_2$ ). Las formas de  $\alpha$  talasemia más frecuentes son las que se expresan como una anemia microcítica e hipocrómica, con metabolismo de hierro normal sin expresividad electroforética, y la forma más grave de esta enfermedad con la hemoglobinopatía H y la hidropesía fetal, las cuales son el resultado de la presencia de hemoglobina H y Hemoglobina Bart, respectivamente (2)(3)(4).

La  $\beta$  talasemia es el resultado de una disminución de la producción de cadenas de  $\beta$  globina, los portadores heterocigotos de la  $\beta$ -talasemia, muestran una anemia microcítica e hipocrómica, junto con un aumento de la hemoglobina A2 y un índice de biosíntesis bajo de las cadenas de globina  $\beta/\alpha$ .(2)(3).

El déficit de cadenas  $\alpha$ - $\beta$ , tiene varias consecuencias, la disminución de hemoglobina en el eritrocito, eritropoyesis ineficaz y disminución del tiempo de vida media de los eritrocitos circulantes, estos dos últimos eventos son secundarios al exceso de cadenas libres llevando a la formación de precipitados de la globina secundario en el interior de los eritroblastos, facilitando su eliminación precoz, antes de terminar el proceso madurativo y disminuyendo su tiempo de supervivencia en la circulación. (2) Todo esto llevando a una anemia que estimula la absorción de hierro, produciendo un estado de sobrecarga férrica y finalmente una hemocromatosis secundaria, este último incrementado por el frecuente uso de hemoderivados, también estimulando la síntesis de eritropoyetina que conlleva a un estado de hiperplasia eritroide permanente (2).

### **Mecanismos moleculares**

Las talasemias son secundarias a las alteraciones genéticas, a deleciones totales o parciales de uno o más genes de globina, formas no delecionales debidas a trastornos de la transcripción o maduración del ARN mensajero, que disminuyen o anulan la síntesis de globina, en el caso de anulación de la síntesis de globina es por una sustitución de uno o varios nucleótidos del propio gen de la globina, cabe destacar que en  $\alpha$  y  $\delta\beta$ - talasemia predominan las deleciones, en la  $\beta$  talasemia lo hacen las formas no delecionales. (6)(7)

## **$\alpha$ talasemia**

Los defectos moleculares en  $\alpha$  talasemia son secundarios a deleciones relacionadas con la estructura del clúster  $\alpha$ -globina, cada gen  $\alpha$  se localiza en una región de 4 kb la cual se divide en tres regiones no homologas, los segmentos Z duplicados se encuentran a una distancia de 3,7 Kb y los X a 4,2 Kb.

La recombinación entre los segmentos Z da lugar a dos tipos de cromosomas, uno que contiene la triplicación de genes  $\alpha$  ( $\alpha \alpha \alpha$  -3,7) y el que contiene solo un gen  $\alpha$ , el portador de la deleción ( $-\alpha$ 3,7) que da lugar a la talasemia.

La recombinación entre los segmentos X da a lugar al fenotipo de la  $\alpha$ -talasemia, esto se da por el resultado de la pérdida de un gen  $\alpha$  en un cromosoma y su integración en el otro.(2)(3)

También se han descrito otras deleciones poco frecuentes asociadas a variaciones estructurales de la hemoglobina, siendo las hemoglobinas más frecuentes asociadas con  $\alpha$  talasemia son la hemoglobina S y E.(1)(2)

La  $\alpha^0$  talasemia, se presenta por deleciones más grandes, donde se eliminan los dos genes de la  $\alpha$  globina de forma parcial o completa, siendo esto último lo más frecuente, y por lo tanto no existe síntesis de la cadena de  $\alpha$  globina en el cromosoma afectado. Los individuos con herencia heterocigota para esta alteración sobreviven, incluso sin expresión clínica de la enfermedad, totalmente lo contrario ocurre en los individuos con herencia homocigota, quienes presentan

producción de hemoglobina Bart (2), cuya expresión clínica será la hidropesía fetal.

Las formas de  $\alpha$  talasemia no delecionales suelen ir acompañadas de una producción disminuida de las cadenas de  $\alpha$  globina más profundas en comparación a las formas delecionales. Se presentan por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en regiones codificadoras o en secuencias reguladoras de la expresión génica. (1)(2)

Las formas no delecionales que se deben a mutaciones, son secundarias de forma más frecuente a defectos de la maduración y defectos de la transcripción.

Los defectos de maduración descritos son 5, siendo la más frecuente la deleción de 5 pb en el intrón 1 del gen  $\alpha 2$ , esta mutación involucra la región invariable GT, activando una secuencia de consenso en el exón 1 que elimina la región en la que se produce el splicing del ARN mensajero, estas mutaciones también presentan una incorrecta transcripción que interfiere con la adecuada expresión del gen  $\alpha 1$ -globina. (1)(2)

Los defectos de la traducción descritos más importantes son 4, de estos, tres son defectos puntuales, que anulan el codón de iniciación y el otro corresponde a una deleción que modifica la secuencia adyacente a la señal de activación, llevando así a una reducción del 50% de la traducción. De todas ellas la más frecuente es la que afecta el codón de iniciación del gen  $\alpha 2$  globina (ATG por ACG). (1)

Existen mutaciones en el codón de terminación que llevan al cese de la traducción del ARN mensajero, dando lugar a un alargamiento de la cadena de  $\alpha$  globina, este tipo de mutación lleva a la producción de hemoglobina CS, Icaria, Koya Dora y Seal Rock, estas variantes se caracterizan por una inestabilidad en el ARN mensajero, llevando así, no solo a alargamiento de la cadena de  $\alpha$  globina si no también disminución de la síntesis de cadenas de  $\alpha$  globina y fenotipo de  $\alpha$  talasemia, lo que se denomina hemoglobinopatías talasemicas.

(1)(2)(3)

### **$\beta$ talasemia**

El principal mecanismo molecular involucrado en el desarrollo de la  $\beta$  talasemia es el no delecional, se produce por mutaciones puntuales secundarias a sustituciones de bases nitrogenadas únicas. También se presenta su desarrollo por alteraciones en el ARN mensajero, disminuyendo o impidiendo su capacidad de traducción. (2)

Las mutaciones puntuales son debidas a sustituciones de bases nitrogenadas en regiones del gen de la  $\beta$  globina involucradas en el proceso regulador de la transcripción, se conocen 4 defectos que son, los de transcripción, de maduración, de poliadenilación y mutaciones de la región CAP.(4)

Los defectos de la transcripción son mutaciones en CAP y UTR, Las mutaciones de la región CAP lateral la etapa de capping de la transcripción del ARN

mensajero llevando a una disminución de la misma, llevando así a la generación de moléculas de ARN mensajero inestables, capaces de generar solo un 25% de traducción como máximo. (1)(2)

Las mutaciones de la región UTR disminuyen en menor cuantía la síntesis de globina llegando incluso a pasar desapercibidas en estado heterocigoto, sin producir microcitosis ni producir aumento de la Hemoglobina A2, estas últimas son las denominadas  $\beta$  talasemias silentes. La sustitución -101 C por T, es la causa más frecuente de talasemia silente. Los portadores heterocigotos son siempre asintomáticos y solo los homocigotos cursan con rasgo talasémico. (1)

Los defectos de maduración e el ARN mensajero dan lugar a una disminución o síntesis de las cadenas de  $\beta$  globina, este se debe a una alteración en el splicing del ARN mensajero que conlleva a la acumulación de las secuencias de intervención o IVS. (1)

Los defectos de la maduración se dan a consecuencia de mutaciones que anulan o crean nuevas señales del proceso de escisión o mutaciones que generan señales tríplicas de este mismo proceso. (2)

Las mutaciones que anulan el proceso de escisión, se dan en las regiones situadas entre exones e intrones, llevando a generar señales que bloquean las escisión de las secuencias de intervención y un cese de la traducción del ARN mensajero llevando a una  $\beta^0$  talasemia o en contraste a esta última, las mutaciones situadas en las secuencias de consenso llevan a disminución de la

eficacia de la maduración llevando a disminución de la síntesis de cadenas de  $\beta$  globina sin anularla produciendo una  $\beta^+$  talasemia. (2)

Las mutaciones que generan nuevas señales de escisión, se presentan por sustituciones en los intrones de las secuencias de intervención, sin afectar a las secuencias de consenso, llevando así a una maduración anómala del ARN mensajero, este es el caso de una de las mutaciones más frecuentes de  $\beta$  talasemia, la mutación 110 g por A del IVS-1. (4)

Las mutaciones que activan señales crípticas de escisión se presentan en el exón 1, dando lugar a la activación de secuencias trípticas que alteran las escisiones del ARN mensajero. En un porcentaje importante de casos, estas mutaciones van acompañadas de alteraciones estructurales de la cadena  $\beta$  de globina, por ello, la presencia de las hemoglobinas E y Knossos constituyen el típico ejemplo de hemoglobinopatías talasémicas, ya que la alteración estructural va acompañada de una disminución de la síntesis de cadenas de  $\beta$  globina, dando lugar a una  $\beta^+$  talasemia. (1)

Las mutaciones de la región de poliadenilación, se hallan situadas al final del exón 3 llevando a la eliminación de un punto de escisión de la molécula de ARN mensajero llevando a la traducción parcial de las cadenas, generando una  $\beta^+$  talasemia. (1)

Los defectos de traducción se presentan por mutaciones en los codones de iniciación o traducción del ARN mensajero, llevando a una falla en este proceso.

Las mutaciones más conocidas en este proceso son las del codón e iniciación ATG que anulan por completo el proceso de traducción del ARN mensajero, conociéndose estas como mutaciones sin sentido, la más frecuente de estas es la CD39 llevando a un reemplazo de C por T, observada en el 50% de las talasemias. (14)

En la  $\beta$  talasemia son más frecuentes las deleciones, pero no todas se acompañan de una ausencia completa de la síntesis de globina,  $\beta^0$  talasemia. En cuanto a deleciones, existen 3 formas, la de la región promotora, la del gen de  $\beta$ -globina y de inserción del retro transposón L1 en IVS-2. (12)

En las deleciones de la región promotora, el gen de  $\beta$  globina se encuentra estructuralmente normal, pero sin actividad funcional en contraste a las deleciones de este mismo gen que lleva a su desaparición, pero ambas presentan el mismo fenotipo de  $\beta^0$  talasemia. (11)

La  $\beta$  talasemia delecional más conocida es la alteración del intrón IVS-2, que es la  $\beta^0$  talasemia India, caracterizada por grandes aumentos de hemoglobina A2 y hemoglobina F en estado heterocigoto, que compensan en parte la ausencia total de cadenas de  $\beta$  globina. (1)

### **$\alpha\delta$ Talasemia**

Al igual que las anteriores se clasifican en  $\alpha\delta^+$  y  $\alpha\delta^0$  talasemias según su grado de síntesis de estas cadenas por parte del cromosoma afecto, las primeras

subclasificándose en otros dos grupos, las que ocurren como resultado del intercambio de material genético no homólogo, siendo esto último secundario a la fusión de cadenas  $\alpha\delta$ , dando lugar a diferentes clases de hemoglobinas donde destaca la Lepore. (1)(2)

El segundo grupo corresponde a dos mutaciones en el clúster de la  $\beta$  globina, inactivando de forma parcial o total el gen  $\delta$  o  $\beta$ , dando lugar a formas delecionales de  $\alpha\delta^0$  talasemia. (1)

$\alpha\delta^0$  talasemia se presenta por deleciones en el clúster de la  $\beta$  globina, eliminando los dos genes  $\delta$  o  $\beta$ , produciendo una síntesis compensadora de cadenas  $\gamma$ , llevando a así a un aumento de la hemoglobina F. (1)

Existen gran variedad de  $\alpha\delta$  talasemias, variantes como la  $\alpha\delta$  talasemia india, Japón y Española, esta última variante es la más extensa de las mutaciones, llegando a 114 Kb, carece de expresividad clínica, acompañado de una anemia microcítica e hipocrómica muy leve, cuya característica más común es la producción de hemoglobina F durante la vida adulta. (2)

Existen mutaciones que generan disminución de la síntesis de cadenas de globinas y a su vez, variantes moleculares de la hemoglobina, generando así las denominadas hemoglobinopatías talasémicas. Las más frecuentes entre estas son las que expresan hemoglobina E y Lepore, estas hemoglobinopatías se caracterizan por presentar alargamiento de las cadenas de globina volviéndose muy inestables. (2)

La hemoglobina E es el resultado de la sustitución de ácido glutámico en posición 36 por lisina en la cadena  $\beta$ . (2)

### **Drepanocitosis**

La Drepanocitosis es un defecto de herencia autosómico recesivo que se caracteriza por la presencia de hemoglobina S en el eritrocito, todo esto producto de la sustitución de un nucleótido, se produce GTG por GAG, en el codón 6 del gen de la B globina que se encuentran en el cromosoma 11, llevando a la sustitución de ácido glutámico por valina. Esta hemoglobina S, la cual, por las alteraciones descritas, sufre desoxigenación, lo cual altera su solubilidad y se deposita en la membrana eritrocitaria, generando sustitución de aminoácidos hidrófobos de la hemoglobina S, deformándolo y volviéndolo rígido, impidiendo la microcirculación y favoreciendo la destrucción y hemólisis. El proceso de alteraciones de la membrana eritrocitaria, es denominado falciformación, el cual puede precipitarse por hipoxia, bajo niveles de pH y deshidratación. (2)(6)

## **Manifestaciones clínicas**

### **$\alpha$ talasemia**

La gravedad de su presentación clínica dependerá de la intensidad del déficit de la cadena de  $\alpha$  globina y también dependerá de la naturaleza de la mutación.

La expresividad clínica derivada de los diferentes tipos de mutaciones da lugar a una gran heterogeneidad clínica, que oscila desde la ausencia total de sintomatología hasta la incompatibilidad con la vida, dividiéndose en tres categorías, el rasgo talasémico, enfermedad de la hemoglobina h o hemoglobinopatía h y la hidropesía fetal.

#### **- Rasgo talasémico**

Es el resultado de la interacción entre haplotipo normal y un  $\alpha^0$  o  $\alpha^+$ . La principal característica clínica de esta entidad es la anemia microcítica hipocrómica, pero debido a su poca especificidad y posible coexistencia con otras entidades, su valor diagnóstico es escaso. La gran heterogeneidad genotípica da lugar a una gran expresividad fenotípica, presentándose diferentes subclasificaciones como son el rasgo silente la alfa talasemia menor. (1)(2)

el rasgo talasémico es el resultado de un defecto en un único gen alfa, detectado generalmente en estudios familiares.

La alfa talasemia menor, se caracteriza por anemias microcíticas hipocromicas, con una electroforesis capilar de hemoglobinas normal, la determinación de la síntesis in vitro de cadenas de globina muestra una relación  $\alpha/\beta$  menor de 1.

- Hemoglobinopatía H

Se manifiesta principalmente como una anemia microcítica e hipocrómica de intensidad moderada, acompañándose de ictericia y hepatoesplenomegalia, la electroforesis de hemoglobinas presenta una migración rápida correspondiente a cantidades cercanas al 40% de esta hemoglobina y en ocasiones hemoglobina Bart., la gran inestabilidad de la hemoglobina lleva a dificultades en los análisis convencionales, la incubación de eritrocitos permite la detección de precipitados hemoglobínicos o cuerpos de Heinz. (2)

El principal mecanismo fisiopatológico es la hemolisis siendo superior a la diseritropoyesis (1), la complicación más frecuente es la esplenomegalia con hiperesplenismo. La expresividad clínica se relaciona con el grado de deficiencia de la cadena  $\alpha$  globina, por lo tanto las interacciones con formas no delecionales que afectan el gen  $\alpha 2$  tienden a ser más graves que el gen  $\alpha 1$ . (2)

- Hidropesía fetal

Se trata de un síndrome incompatible con la vida que produce la muerte fetal a las 30 o 40 semanas de gestación o en la vida neonatal temprana, caracterizado por anemia intensa, anasarca, signos de insuficiencia cardíaca, prolongada hipoxia intrauterina y hepatoesplenomegalia. (1)(2)

Citológicamente se observa intensa anisopoiquilocitosis, macrocitosis e hipocromía y presencia de eritoblastos circulantes, la electroforesis evidencia hemoglobina Bart cerca de un 80% y hemoglobina H en un 2% y ausencia de cadenas de  $\alpha$  globina. (2)

**$\beta$  talasemia.**

Su expresión clínica dependerá de la mutación involucrada, de la intensidad en el déficit de las cadenas de  $\beta$  globina, su carácter hetero u homocigoto y factores modificadores de su expresividad clínica, como pueden ser la coexistencia de mutaciones del gen alfa, la sobrecarga de hierro secundario a un aumento de la absorción de hierro atribuida a un aumento en la actividad de hepcidina e incluso trombofilias asociadas como el factor v de Leyden y protrombina, todo esto llevando a una expresiva clínica muy extensa, desde asintomático hasta muy grave. (2)

El gran polimorfismo de la B talasemia permite describir cuatro grandes síndromes  $\beta$  talasemicos, la talasemia silente, talasemia menor, talasemia intermedia y la talasemia mayor.

- Talasemia silente

Presente en individuos con alteración de un solo gen, sin expresividad clínica alguna y su diagnóstico suele deberse a estudios en familiares de pacientes afectados. (1)

- Talasemia menor

También conocida como rasgo talasemico, resultado de estados heterocigotos para los genes  $\beta^+$  o  $\beta^0$ , esta es la forma más frecuente, su presentación clínica se caracteriza por una anemia leve microcítica e hipocromica, pudiendo llegar acompañarse de esplenomegalia en casos muy infrecuentes. Su diagnóstico se basa en la electroforesis en pH alcalino de hemoglobinas, observándose un aumento de la hemoglobina A2, llegando a un 7%, y hemoglobina fetal normal. (1)

- Talasemia intermedia

Esta entidad corresponde a estados homocigotos o doble heterocigotos para los genes  $\beta^+$  o  $\beta^0$ , se caracteriza por anemias moderadas o intensas que en general no requiere transfusiones, su presentación clínica corresponde a un síndrome hemolítico crónico con palidez, ictericia intermitente, esplenomegalia y alteraciones óseas discretas sin retraso puberal asociado, acompañándose ocasionalmente de complicaciones propias de la hemolisis crónica, como es la microlitiasis biliar o la hemosiderosis secundaria. (12)

Se observa generalmente anemia microcítica e hipocrómica, con anisopoiquilocitosis e incluso eritroblastos circulantes, el diagnóstico se realiza mediante electroforesis de hemoglobinas, pero mostrando una gran variabilidad en los patrones electroforéticos.

- Talasemia mayor

También conocida como anemia de Cooley, es la forma más grave, correspondiendo a estado homocigotos, también en formas doble heterocigotas y en presencia de doble hemoglobina Lepore. Se manifiesta como una anemia a partir de los 6 meses de gravedad, con régimen transfusional periódico,

acompañado de esplenomegalia e incluso hepatomegalia, llegando al hiperesplenismo y sus complicaciones asociadas. (13)

Adicionalmente presentan malformaciones oseas, en cráneo se puede observar braquicefalia, turricefalia y rasgos mongoloides, también expansiones de la cavidad medular con deformaciones, trabeculación medulas y expansión del cuerpo vertebral. (1)

Además de caracterizarse como un síndrome hemolítico crónico, se acompaña de retraso ponderal por la acusada anemia e hipoxia secundaria. La citología permite observar una anemia microcítica e hipocromica, acompañada de anisopoiquilitosis, punteado basófilo, dacriocitos y eritroblastos, los reticulocitos suelen verse aumentados todo esto secundario a una eritropoyesis ineficiente. (1)

La electroforesis de hemoglobinas evidencia siempre un aumento de hemoglobina fetal llegando incluso a valores del 90% y en algunos casos se observan variaciones en la hemoglobina A2, el aumento corresponde a una variedad moderada de la talasemia mayor, mientras que la ausencia de esta hemoglobina corresponde a las formas más graves.

### **$\alpha\delta$ talasemia**

La expresividad clínica depende de si es un estado hetero u homocigoto, el primero siempre es asintomático, presentándose con anemia microcítica e hipocrómica leve, con aumento de hemoglobina F entre un 7 a un 15% y hemoglobina A2 normal.

El rasgo homocigoto suele presentarse como una talasemia intermedia sin requerimientos transfusionales y una hemoglobina F cercana al 100% con desaparición de la hemoglobina A normal. (1)

### **Drepanocitosis**

Se manifiesta como una anemia hemolítica, volumen corpuscular medio normal o disminuido, reticulocitosis y en el extendido de sangre periférica se pueden observar eritrocitos en forma de hoz. La electroforesis de hemoglobina en pH alcalino. Los heterocigotos con rasgo drepanocítico presentaran una electroforesis con elevados niveles de hemoglobina S y hemoglobina A. Los que expresan la enfermedad pueden ser homocigotos o doble heterocigotos (10), cuando el gen anormal de la hemoglobina S se une a otro gen anormal que forme parte de la cadena de B globina, dando a lugar a una hemoglobina S y C o una drepanocitosis con hemoglobina S con beta talasemia asociada, las formas más graves de enfermedad son la drepanocitosis con genotipo SS y  $S\beta^0$ ,

mientras que la drepanocitosis con hemoglobina SC y S $\beta$ + que cursan de forma leve.

Tabla 3. Principales genotipos en drepanocitosis

GENOTIPO	ELECTROFORESIS	HBA2
Hb SS	S	<3,5%
Hb SC	SC	-
Hb S $\beta$ <sup>o</sup>	S	>4 %
Hb S $\beta$ +	SA	>3,5 %

## HEMOGLOBINOPATIAS TALASEMICAS

Existen mutaciones que generan disminución de la síntesis de cadenas de gloina, generando variates moleculares d ela cadena hemoglobina con un fenotipo talasemico, algunas generadas por alteración en la solubilidad comoo son la hemoglobina S, C, J y D, asociadas a alteración de la estabilidad como la Hb kholn, alteración por la afinidad del oxigeno como puede ser la Hb Kansa.

- Hemoglobina E

Resultado de la sustitución del acido glutámico en positiocn 26 por lisina en la cedna B, llevnado a una alteración del splicing llevnado a defectod de maduración del ARN emnsajero y por consiguiente a disminución de cadenas de B globina, los heterocigotos solo presentan microcitosis y los homocigotos se

caracterizan por una anemia mayor intensidad pero sin llegar a presentar gravedad clínica. (1)

- Hemoglobina C

Resultado de la sustitución de ácido glutámico en posición 6 por lisina en la cadena de B globina, se caracteriza por ser una anemia hemolítica crónica, microcitosis y dianocitos, asociada a esplenomegalia, en estado heterocigoto no presenta manifestación de la enfermedad. (1)

## **OBJETIVO**

Realizar un registro y descripción del espectro mutacional de talasemias y hemoglobinopatías en Zaragoza, en un hospital de tercer nivel.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio es de carácter Descriptivo analítico transversal, partiendo de una muestra de 76 pacientes con diagnóstico de talasemia y drepanocitosis, que asisten en seguimiento en la consulta de Eritropatología y Oncopediatria del Hospital Universitario Miguel Servet, el estudio molecular se realizó en el Hospital Clínico San Carlos.

La planificación temporal del trabajo empezó en febrero de 2017 con el planteamiento del trabajo, se recopilaron datos correspondientes a la identificación del paciente, año de nacimiento, edad de diagnóstico, resultado de electroforesis de proteínas, HPLC y espectro mutacional, posterior análisis de los datos y finalizando el 25 de agosto de 2017 con la entrega para sustentación del mismo.

Los pacientes con diagnóstico de talasemia  $\alpha$  y  $\beta$ , se realizó un estudio de las mutaciones más prevalentes mediante reacción en cadena de la polimerasa, mediante diferentes técnicas Gap-PCR, para deleciones de la talasemia  $\alpha$  y  $\beta$  y si no existen resultados que permitan detectar estas alteraciones se pasara al cribado genético de los genes HBA1/HBA2 o HBB, debido a que un porcentaje de pacientes alteraciones no detectables por PCR se recurre a la realización de técnica MLPA que permite el estudio de los exones de los genes HBB y HBA1/HBA2. En la  $\delta\beta$ - talasemia se realizó el estudio al clúster de la globina  $\beta$ .

Los pacientes con diagnóstico de Drepanocitosis se realizó una revisión de informes de la consulta de eritropatología y los resultados de electroforesis capilar de hemoglobinas en pH alcalino.

Posterior recopilación de datos y tabulación en Excel 2017 se realizó el análisis de los mismos en SPSS Versión 22 para Windows (San Diego, CA, USA), variables cuantitativas fueron reportadas como mediana y rangos mientras que variables categóricas fueron expresadas como valores absolutos y porcentajes.

## RESULTADOS

De la población total estudiada que corresponde a 75 pacientes, 40 pacientes (53,3%) presentan una talasemia, 11 pacientes (14,6%) presentan una hemoglobinopatía 6 de estos asociados a una talasemia y 22 pacientes (30,6%) presentan diagnóstico de drepanocitosis

### Talasemias.

En los pacientes con diagnóstico de Talasemia, se observó que la más frecuente en esta muestra es la  $\alpha$  talasemia, con una mayor prevalencia en el sexo femenino, 14 pacientes (51.8%). Situación similar se ve en las demás talasemias, excepto en la  $\beta$  talasemia, donde el 100% de la población era de sexo masculino.

HEMOGLOBINOPATIA	NUMERO DE PACIENTES	EDAD DE DIAGNOSTICO	RATIO H:M
Talasemia	40		
- $\alpha$	30 (75%)		
- $\beta$	7(17,5%)		
- $\alpha\beta$	2 (2%)		
- $\delta\beta$	1(1%)	8,6	
Hemoglobinopatías	11	12,5	
Drepanocitosis	22	11	

Pacientes con hemoglobinopatías

En cuanto el espectro mutacional se identificaron 4 diferentes tipos de mutaciones para  $\alpha$  talasemia, la más frecuente es la delección  $-\alpha_{3,7}$  en un 88,2% de los casos, para  $\beta$  talasemia se identificaron 6 tipos de mutaciones, una diferente en cada paciente.

ALTERACIÓN MOLECULAR	FRECUENCIA
$-\alpha_{3,7}$	27
Delecciones amplias	1
$\alpha^{\text{HPH}}\alpha$	2

Mutaciones asociadas a  $\alpha$ -talasemia

Alteración molecular	Frecuencia
CD39 (C-T)	1
IVS1-110 (G-A)	1
IVS-1 NT1 (G>T)	1
IVS-1-NT6 (C>T)	1
CODON 19 (A>G)	1
3'UTR (A>G)	1

Mutaciones asociadas a  $\beta$  talasemia

Para  $\delta\beta$  se identificó la delección DE 90-110KB en el Cluster B y para  $\alpha_0$  se identificó la delección de pseudozeta;  $\alpha_1\text{-}\alpha_2$ .

### Hemoglobinopatías

Los pacientes con hemoglobinopatía, se presentó una mayor prevalencia en el sexo femenino, 7 pacientes (57%), siendo la más frecuente de estas la

hemoglobinopatía E y Sendegi, en 2 casos de pacientes con drepanocitosis se asocio a  $\alpha$ -talasemia

HEMOGLOBINOPATÍA	FRECUENCIA
C	1 (9%)
C + S	1 (9%)
E	4 (36,3%)
S	1 (9%)
Sendegi	4 (36,3%)

### Drepanocitosis

Los pacientes con drepanocitosis, se presentó de manera más frecuente el genotipo HbSS con un total de 8 casos (38,1%), con una distribución similar entre sexos, 4 casos se presentaron asociados a beta talasemia, y el diagnostico se realizó con una edad media de 11 años.

Genotipo	Frecuencia	Sexo
Hb S	2 (9,52%)	H-1 M-1
Hb SC	7 (33,3%)	H-4 M-3
Hb SS	8 (38,10%)	H-4 M-4
Hb S $\beta$ +	4 (19,05%)	H-2 M-2

## CONCLUSIONES

Se realiza un reporte del registro de hemoglobinopatías en el hospital Miguel Servet, para determinar el número de pacientes afectados y la prevalencia de cada entidad. La incidencia de hemoglobinopatías en España es más baja que en otro país del mediterráneo, talasemia en España se presenta con una prevalencia de 0,16 por cada 1000.000 habitantes y drepanocitosis con un 1,34 por cada 100.000 habitantes, siendo España hoy en día una población multiétnica, con movimientos migratorios variables que conlleva a modificación de la prevalencia de diferentes entidades, partiendo de una muestra de 73 pacientes se identifica la  $\alpha$  - Talasemia como la más prevalente y  $-\alpha_{3,7}$  la delección más frecuente encontrada en estos, esto último corresponde con estudios de prevalencia realizados en España donde esta mutación corresponde al 85%, con una mayor prevalencia en el sexo femenino.

La  $\beta$  Talasemia, en esta serie se presentan mutaciones distintas en cada caso, presentándose en uno solo la mutación CD39 (C-T), siendo ésta la más frecuente en España, llamativamente la  $\alpha$  – Talasemia le supera en frecuencia, siendo que en registros nacionales se ha demostrado una mayor prevalencia de esta entidad.

$\delta\beta$  y  $\delta 0$  talasemia presenta un total de 3 pacientes, dada la poca muestra estos resultados son poco extrapolables a la población general.

Las técnicas utilizadas en el estudio de estas entidades son muy diversas, partiendo desde la observación morfológica hasta el estudio genético individual, que permiten el identificar con gran precisión diagnóstica hemoglobinopatías frecuentes y su más probable alteración molecular como es el caso de  $\alpha$  - talasemia y su mutación  $-\alpha_{3,7}$  o permitiendo diagnosticar entidades infrecuentes como la hemoglobinopatía Sendegi.

Se puede concluir que el estudio de hemoglobinopatías y la inclusión del perfil mutacional en el caso de talasemias mutaciones tiene importancia para el pronóstico clínico individual y planificación futura del manejo de posibles complicaciones, y siendo estos registros el camino para desarrollar futuros estudios de cohortes y la posibilidad de comparación o integración a otros registros.

### **Plan de Difusión y explotación de resultados**

Posterior presentación de este trabajo se plantea su envío a revistas científicas como un estudio de prevalencia. Los resultados de este trabajo servirán como base del desarrollo de nuevos estudios de cohortes y el planteamiento de una tesis doctoral basada en el fenotipo y genotipo talasémico asociado a complicaciones y posibles planteamientos de cribado en entidades específicas.

## **Bibliografía**

1. Sans-Sabrafen. J. Besses-Raebel. C. Hematología clínica. Talasemias y síndromes talasémicos, capítulo 10, Editorial Harcourt, Barcelona. España.
2. Roberts I, de Montalembert M. Sickle cell disease as a paradigm of immigration hematology: new challenges for hematologists in Europe. *Haematologica*. 2007;92(7):865–871.
3. Styles LA, Vichimky EP. New Therapies and approaches to transfusion in sickle cell disease in children. *Hematology and Oncology Current Opinion in Pediatrics* 1997; 9: 41-5. 4. Rogees ZR. Clinical update on hidroxiyurea in the management of sickle cell anemia in adult and children. *Seminars in Hematology* 1997; 3
5. Embury SE, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH, editors. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. Nueva York: Raven Press; 1994.
6. Dulin Iñígueza E, Cantalejo López MA, Cela de Julián ME, et al. Early detection of sickle cell anemia and other hemoglobinopathies in neonates in the Autonomous Community of Madrid. A pilot study. *An Pediatr*. 2003;58(2):146–155.
7. Garcia Arias MB, Cantalejo López MA, Cela de Julián ME, et al. Sickle cell disease: registry of the Spanish Society of Pediatric Hematology *An Pediatr*. 2006;64(1):78–84.
8. American Academy of Pediatrics, Section on Hematology/Oncology and Committee on Genetics. Health supervision for children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 2002;109:526-35.

9. Davies SC, Cronin E, Gill M, Greengross P, Hickman M, Normand C. Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2000;4:1-99. 10. Shafer FE, Lorey F, Cunningham GC, Klumpp C, Vichisnky E, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: 4 years of experience from California's newborn screening program. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1996;18:36-41.

10. Consensus conference. Newborn screening for sickle cell disease and other haemoglobinopathies. *JAMA*. 1987;258:1205-9. 12. Leiken SL, Gallagher D, Kinney TR. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatrics*. 1989;84:500-8. 13. Rodgers DW, Clarke JM, Cupidore L. Early deaths in Jamaican children with sickle cell disease. *BMJ*. 1978;1:1515-6.

11. Nietert PJ, Abboud MR, Silverstein MC, Jackson SM. Bone marrow transplantation versus periodic prophylactic blood transfusion in sickle cell patients at high risk of ischemic stroke: a decision analysis. *Blood* 2000;95: 3057-

12. Vichhinsky EP, Neumayr LD, Earles AN et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Eng J Med* 2000; 342: 1855-65.

13. Krisnamurti L, Blazar BR, Wagner SE. Bone marrow transplantation without myeloablation for sickle cell disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 68.

14. Bernini JC, Rogers ZR, Sandler Es, Reisch JS, Quinn CT, Buchanan GR. Beneficial effect of intravenous dexamethasone in children with mild to moderately severe acute chest syndrome complicating sickle cell disease. *Blood* 1998; 92: 3082.

15. Powars D, Weidman JA, Odom-Maryon T et al. Sick cell chronic disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine* 1988; 67: 66-76.
16. Piomelli S, Seaman C, Ackerman K, et al. Planning an exchange transfusion in patients with sickle cell syndromes. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 268-76.
17. Hoppe C, Walters M. Bone marrow transplantation in sickle cell anemia. *Curr Op Oncol* 2001; 13: 85-90.
18. Platt O. The acute chest syndrome of sickle cell disease. *N Eng J Med* 2000; 342: 1904-7.
19. Adams R, McKie V, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998; 339: 5-11.
20. Harmatz P, Butensky E, Quirolo K, Williams R, Ferrell L, Moyer T et al. Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood* 2000; 96: 76-9.
21. Serjeant GR. Sick cell disease. *Lancet*. 1997;350:725-30. 7. Ballas SK. Sick cell anemia. Progress in pathogenesis and treatment. *Drugs*. 2002;62:114372.