

## TALASEMIAS

### Caso Clínico: Paciente con anemia microcítica.

*PILAR CARRASCO SALAS, JUAN LÓPEZ SILES. Centro de Genética Molecular Genetaq, Málaga.*

**Palabras clave:**  $\alpha$ -talasemia,  $\beta$ -talasemia, HBB, HBA1, HBA2.

### CASO CLÍNICO

Niña de dos años que presenta palidez. El examen hematológico muestra una anemia microcítica con niveles de hemoglobina (Hb) de 8 g/dL, volumen corpuscular (VCM) de 70 fL y hemoglobina corpuscular media (HCM) de 22,4 pg. En el frotis sanguíneo se observa además poiquilocitosis y anisocitosis. A la exploración física, no se objetiva esplenomegalia, hepatomegalia ni alteraciones óseas faciales. En el estudio bioquímico, los niveles de hierro y ferritina están dentro de la normalidad y los de lactato deshidrogenasa (LDH) y bilirrubina ligeramente aumentados.

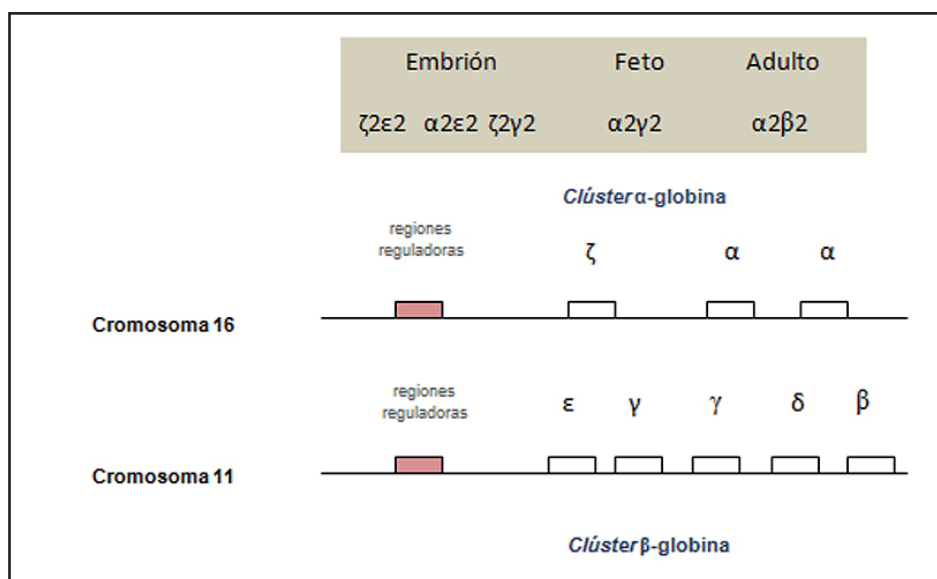
Ante la posibilidad de que se trate de un síndrome talasémico, se solicita cuantificación de Hb A<sub>2</sub> y Hb fetal (HbF) para orientar el diagnóstico.

### TALASEMIAS

Las talasemias representan un problema de salud importante, con una frecuencia alta de portadores (7 % de la población mundial). Su mayor prevalencia está centrada en las regiones que han sido endémicas para la malaria, como el área mediterránea, norte de África, Oriente Medio, India, sudeste de Asia y sur de China.

El término talasemia engloba a un grupo heterógeno de trastornos hereditarios que se caracterizan por un defecto en la síntesis de una o varias de las cadenas de la Hb. La molécula de Hb está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas tipo alfa ( $\alpha$  o  $\zeta$ ) y dos tipos beta ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  o  $\epsilon$ ), unidas cada una de ellas a un grupo hemo. Las combinaciones de estas cadenas producen seis hemoglobinas: tres embrionarias (Hb Gower-1 [ $\zeta_2\epsilon_2$ ], Hb Gower-2 [ $\alpha_2\epsilon_2$ ] y Hb Portland [ $\zeta_2\gamma_2$ ]), una fetal [ $\alpha_2\gamma_2$ ] y dos adulta (HbA [ $\alpha_2\beta_2$ ] y HbA2 [ $\alpha_2\delta_2$ ]). El tipo de Hb que se expresa depende del estadio del desarrollo. En el adulto, la HbA constituye aproximadamente el 98 % de la totalidad del contenido hemoglobínico eritrocitario. El 2 % restante está constituido por HbA<sub>2</sub> y HbF.

A nivel molecular, la síntesis de las cadenas de la Hb es controlada por dos agrupamientos de genes o clúster (Figura 1). El clúster de la globina  $\alpha$  se sitúa en el cromosoma 16 y comprende tres genes funcionales: *HBZ* (OMIM: 142310), *HBA2* (OMIM: 141850) y *HBA1* (OMIM: 141800), que codifican las cadenas  $\zeta$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ , respectivamente. El clúster de la  $\beta$ -globina, localizado en el cromosoma 11, consiste en cinco genes funcionales: *HBE1* (OMIM: 142100), *HBG2* (OMIM: 142250), *HBG1* (OMIM: 142200), *HBD* (OMIM: 141900) y *HBB* (OMIM: 142000) que codifican las cadenas  $\epsilon$ ,  $\gamma_G$ ,  $\gamma_A$ ,  $\delta$  y  $\beta$ , respectivamente. La expresión de ambos clúster depende de regiones reguladoras situadas en la región promotora en 5'. En el adulto, los dos genes que se transcriben en mayor proporción son *HBA2* y *HBA1* en el cromosoma 16 y *HBB* en el cromosoma 11, formando la hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ).



**Figura 1.** Estructura de los clúster de la  $\alpha$ -globina y  $\beta$ -globina.

Los diferentes tipos de talasemia se clasifican según las cadenas de globina cuya síntesis esté afectada, siendo las más comunes y de mayor importancia clínica la  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta\beta$ -talasemia y la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF).

Exceptuando algunos casos, tanto la talasemia  $\alpha$  como la talasemia  $\beta$  presentan una herencia autosómica recesiva. La talasemia  $\alpha$  se produce por mutaciones que afectan a los genes *HBA1* y *HBA2*. Mientras que los individuos normales presentan 4 alelos funcionales, dos en cada cromosoma (genotipo  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), la mayoría de los pacientes con talasemia  $\alpha$  presentan deleciones que afectan a uno ( $\alpha^-$ ) o a ambos genes ( $--$ ). Entre las primeras, la deleción  $-\alpha^{3.7}$  es la alteración molecular más frecuente en las talasemias  $\alpha$ . Supone la desaparición de un fragmento de 3,7 kb que elimina parte del gen *HBA1* y del *HBA2*, dejando un gen híbrido. Menos frecuente es la deleción  $-\alpha^{4.2}$ , propia de los países del Sudeste Asiático, que supone la pérdida de un fragmento de 4,7 kb que afecta al gen *HBA2*. Deleciones más amplias, como  $-\text{MED}$ , de 17,4 Kb frecuente en el Mediterráneo o  $-\text{SEA}$ , típica en las poblaciones asiáticas, de 20 kb, delecionan los genes *HBA2* y *HBA1*. Ocasionalmente, la talasemia  $\alpha$  se puede deber a mutaciones puntuales en alguno de los genes o en zonas reguladoras.

A diferencia de las talasemias  $\alpha$ , las mutaciones más frecuentemente descritas en las talasemias  $\beta$  son mutaciones puntuales en el gen *HBB* del clúster de la  $\beta$ -globina. Hasta el momento, se han descrito más de 200 diferentes (disponibles en la base de datos *Globin Gene* <http://globin.cse.psu.edu>), si bien estudios poblacionales indican que el número es mucho más limitado en función de la población de riesgo estudiada, lo que facilita el diagnóstico molecular. Los alelos mutados que producen una ausencia total de cadenas  $\beta$  se conocen como alelos  $\beta^0$  y normalmente contienen mutaciones sin sentido (*nonsense*) o mutaciones que alteran el marco de lectura (*frameshift*). Los alelos  $\beta^+$  son capaces de sintetizar una pequeña cantidad de cadenas  $\beta$  y en la mayoría de los casos son el resultado de mutaciones en las zonas reguladoras o en los sitios de *splicing* del clúster de la  $\beta$ -globina.

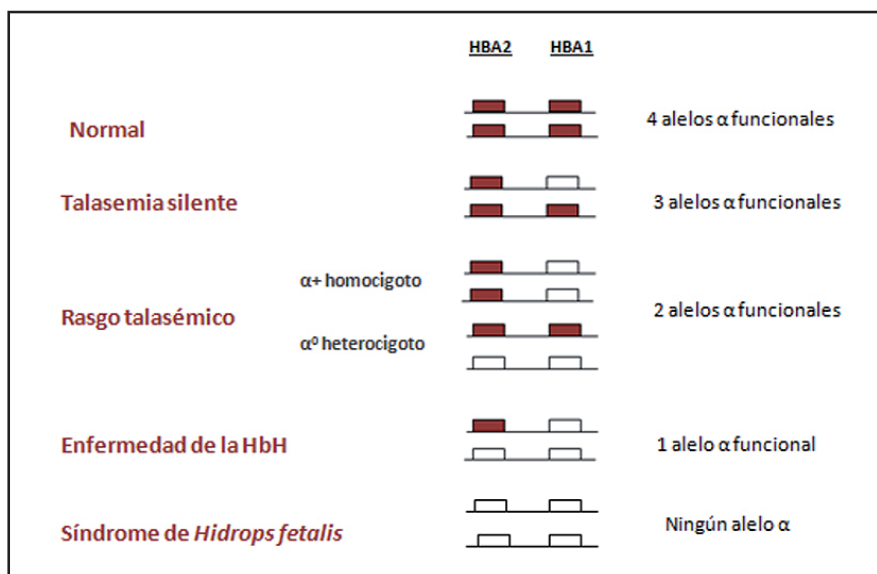
La  $\delta\beta$ -talasemia y la PHHF son condiciones benignas en las que se mantienen altas concentraciones de HbF. La expresión de los genes *HBG1* y *HBG2*, que codifican las cadenas  $\gamma$  que forman la HbF, es normalmente suprimida después del nacimiento y reemplazada por la expresión de los genes *HBB* y *HBD*, que codifican las cadenas  $\beta$  y  $\delta$ , respectivamente, y que forman la hemoglobina adulta. Los individuos con  $\delta\beta$ -talasemia o PHHF no presentan otros rasgos fenotípicos, además del aumento de HbF. La  $\delta\beta$ -talasemia está causada por deleciones de más de 10 kb, que afectan a los genes  $\delta$  y  $\beta$  ( $\delta\beta^0$ -talasemia), pudiendo afectar también al gen  $\gamma A$  ( $\gamma A\delta\beta$ -talasemia). En la PHHF las alteraciones más frecuentes son mutaciones puntuales en el promotor de los genes *HBG1* o *HBG2* o deleciones en el clúster de la  $\beta$ -globina, que eliminan los genes *HBB* y *HBD*.

### 1.1. Rasgos clínicos

La gravedad de la talasemia  $\alpha$  (OMIM: 604130) depende del número de alelos afectados. Así, la pérdida de un solo alelo o talasemia  $\alpha^+$ , tiene escasas repercusiones hematológicas, considerándose estas formas como talasemias silentes. La pérdida de dos alelos o rasgo talásémico, conocido como talasemia  $\alpha^0$  si los dos genes inactivos están en el mismo cromosoma ( $--/\alpha\alpha$ ) o talasemia  $\alpha^+$  homocigota, si están en distintos cromosomas ( $-\alpha/-\alpha$ ), ocasiona una clínica moderada que se traduce en un cuadro de anemia microcítica más o menos leve. La deleción de tres alelos causa un cuadro clínico grave conocido como enfermedad de la hemoglobina H que cursa con anemia hemolítica grave y esplenomegalia. Finalmente, la pérdida de los cuatro alelos  $\alpha$ , una de las causas del *síndrome del hydrops fetalis*, es incompatible con la vida y ocasiona la muerte del feto (figura 2).

En los pacientes con talasemia  $\beta$  (OMIM: 613985), debido a la variedad de mutaciones descritas, el fenotipo depende del número y del tipo de defecto molecular encontrado (alelos  $\beta^+$  o alelos  $\beta^0$ ). Los pacientes en los que sólo se detecta una mutación en heterocigosis en el gen *HBB* presentan talasemia *minor*, caracterizada por anemia hemolítica asintomática. Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos pueden presentar, dependiendo de la naturaleza de las mutaciones encontradas, talasemia intermedia o talasemia mayor. Ésta última, también conocida como anemia de Cooley, es la forma más grave y se caracteriza por esplenomega-

lia, hepatomegalia, anemia severa y la necesidad de transfusiones sanguíneas regulares desde los primeros años de vida. Sin tratamiento, los niños afectados presentan un grave retraso en el crecimiento y una esperanza de vida corta. La exploración física muestra además, alteraciones óseas, que se aprecian sobre todo en el cráneo, que originan deformaciones de su configuración debido a una expansión compensadora de la médula ósea, en especial en cara, configurando unos rasgos faciales característicos. Transfusiones regulares y terapia quelante de hierro (para reducir la sobrecarga férrica de las transfusiones), permiten conseguir un crecimiento normal y un aumento en la esperanza de vida desde la tercera hasta la quinta década de la vida.



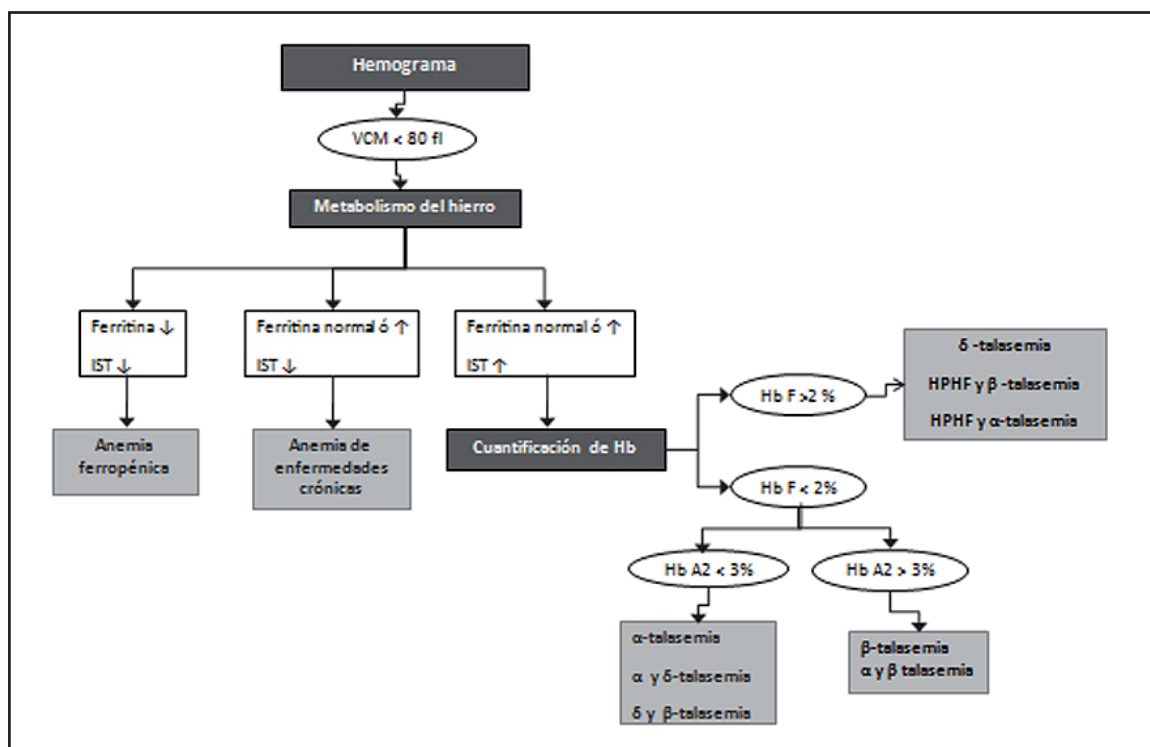
**Figura 2.** Clasificación de los defectos moleculares y fenotipos asociados en la talasemia  $\alpha$ .

La talasemia intermedia aparece más tardíamente, con hepatomegalia y anemia moderada o grave, y los requerimientos de transfusiones son menos regulares.

Además del número y tipo de defecto molecular encontrado, gran parte de la variabilidad fenotípica encontrada en la talasemia  $\beta$  se explica por otros determinantes genéticos capaces de reducir el desequilibrio de cadenas  $\alpha$ /no  $\alpha$ . Las mutaciones de la  $\beta$ -globina reducen la cantidad de cadenas  $\beta$  sintetizadas, lo que resulta en un exceso de cadenas  $\alpha$ , que precipitan en los precursores eritroides de la médula ósea, provocando la muerte prematura de éstos y una eritropoyesis ineficaz. Cualquier condición, heredada o adquirida que reduzca el desequilibrio de cadenas  $\alpha$ /no  $\alpha$  en las talasemias  $\beta$  conduce a una menor precipitación de las cadenas de la globina y lleva a un fenotipo moderado de talasemia. Por ejemplo, los pacientes con talasemia  $\beta$  homocigota que además presentan un rasgo talasémico  $\alpha$ , tienen fenotipos más moderados. Lo mismo sucede con aquellos que, además de mutaciones en el gen *HBB*, presentan alguna alteración molecular que aumente la síntesis de cadenas  $\gamma$  ((PHHF o  $\delta\beta$ -talasemia), la cual puede unirse a las cadenas  $\alpha$  excedentes para formar HbF, disminuyendo el ratio de cadenas  $\alpha$ /no  $\alpha$ . Se han descrito también varios polimorfismos fuera del clúster de la globina  $\beta$  que aumentan las concentraciones de HbF y que por tanto contribuyen a un fenotipo moderado de talasemia  $\beta$ .

## 1.2. Criterios de inclusion

La mayoría de los síndromes talasémicos se caracterizan por una anemia microcítica hipocrómica, aunque los valores de los índices eritrocitarios varían en función del tipo de talasemia. El VCM en general está disminuido, siendo normalmente inferior a 72 fL. No hay que olvidar que existen otras condiciones frecuentes como la anemia ferropénica o la anemia de los trastornos crónicos, que se caracterizan también por anemia microcítica. Por ello, ante VCM disminuidos, es importante estudiar el metabolismo del hierro y hacer el diagnóstico diferencial (Figura 3).



**Figura 3.** Algoritmo de laboratorio en los síndromes talasémicos.

Las concentraciones de Hb se encuentran también típicamente disminuidas en los pacientes talasémicos, aunque los valores dependen del tipo de talasemia. En la talasemia menor se observan descensos mínimos, mientras que en la talasemia mayor (Hb <7 g/dL) e intermedia (Hb 7-10 g/dL) se producen descensos importantes en la concentración de Hb. El recuento de eritrocitos, sin embargo, es elevado para el grado de anemia existente. Esto lo diferencia de otras causas de anemia microcítica, como la deficiencia de hierro y la anemia de las enfermedades crónicas, que típicamente se asocian con un descenso en el recuento eritrocitario proporcional a la disminución de la concentración de hemoglobina.

En el frotis sanguíneo, se pueden observar cambios morfológicos en los eritrocitos: microcitosis, hipocromía, anisocitosis, poiquilocitosis y eritroblastos. Lógicamente, los portadores de talasemia presentan cambios morfológicos menos graves que los individuos afectados.

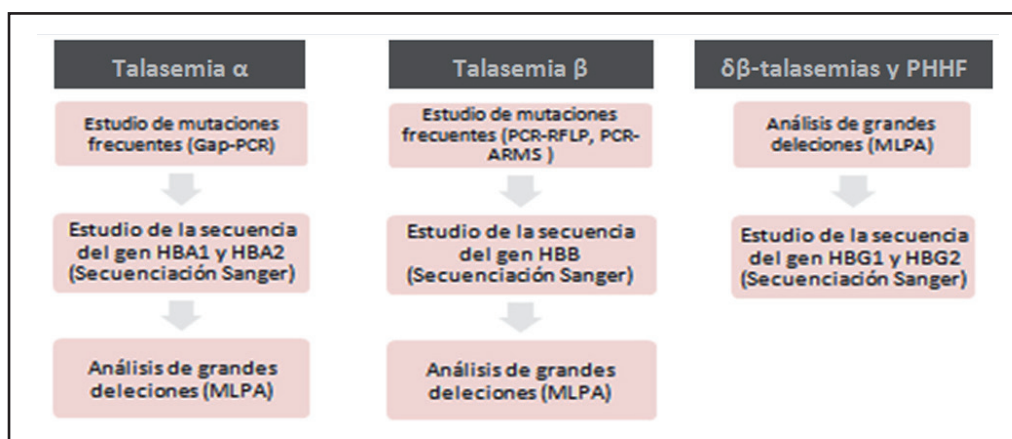
La cuantificación de Hb es también importante para orientar el diagnóstico molecular de los síndromes talasémicos. La cromatografía líquida de intercambio catiónico (HPLC-CE) es el mé-

todo más rápido y más preciso disponible actualmente. Permite analizar simultáneamente la concentración de Hb A, Hb A<sub>2</sub> y Hb F, así como de otras variantes. Un VCM disminuido junto con niveles de HbF del 3 al 30 %, sugiere la presencia de  $\delta\beta$ -talasemia heterocigota. Esta condición puede distinguirse de la PHHF por los hallazgos hematológicos. La PHHF normalmente se caracteriza por índices eritrocitarios normales, mientras que los pacientes con  $\delta\beta$ -talasemia heterocigota muestran hipocromía y microcitosis.

En la talasemia  $\beta$ , aumenta la concentración de Hb A<sub>2</sub>. Sin embargo, en la talasemia  $\alpha$ , los niveles de HbA<sub>2</sub> son normales y el exceso de cadenas  $\beta$  forma HbH, que puede visualizarse al microscopio con azul de cresilo brillante.

### 1.3. Estrategia metodológica

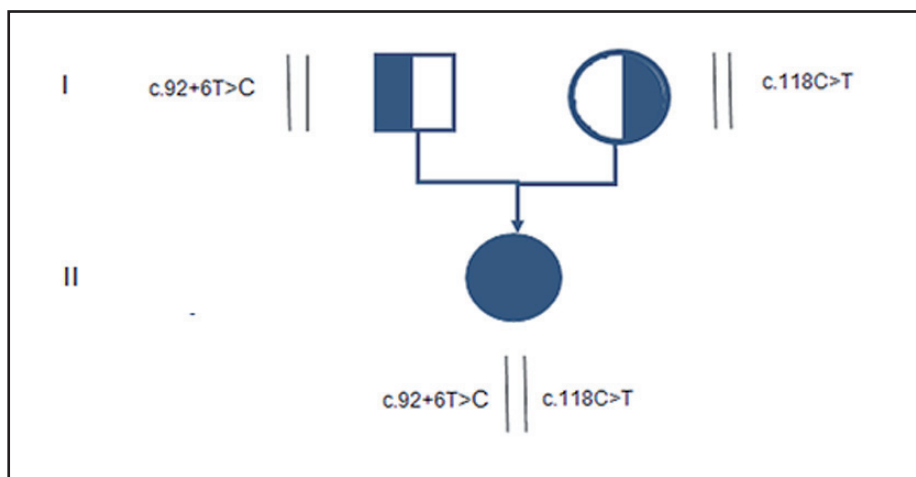
Tanto en la talasemia  $\alpha$  como en la talasemia  $\beta$ , se recomienda empezar con el estudio de las mutaciones recurrentes. En ambos casos se suelen utilizar distintas variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Gap-PCR, para las deleciones de la talasemia  $\alpha$  o PCR-ARMS y PCR-RFLP, entre otras, para la talasemia  $\beta$  (Figura 4). Si en este primer cribado, no se detecta ninguna de estas mutaciones o sólo una, y ésta por sí sola no explica la clínica del paciente, es aconsejable realizar la secuenciación completa de los genes *HBA1/HBA2* o *HBB*.



**Figura 4.** Esquema metodológico en las talasemias  $\alpha$ , en las talasemias  $\beta$  y en las talasemias que cursan con aumento de HbF ( $\delta\beta$ -talasemias y PHHF). Entre paréntesis, se indica la técnica más utilizada.

Por último, debido a que un porcentaje de pacientes (normalmente pequeño, aunque variable en función del grupo étnico estudiado) presenta deleciones/duplicaciones no detectables por PCR o secuenciación, se recurre a kits comerciales de MLPA (del inglés *Multiplex Ligation Probe Amplification*). Esta técnica permite analizar el número de copias de los exones de los genes *HBB* y *HBA1/HBA2*.

En la  $\delta\beta$ - talasemia y en la PHHF la estrategia metodológica es distinta dado que las mutaciones más frecuentes son deleciones extensas que afectan al clúster de la globina  $\beta$ .



**Figura 5.** Árbol genealógico del caso clínico.

## RESULTADOS CASO CLÍNICO

En la cuantificación de Hb mediante HPLC-CE, se observaron porcentajes de HbA<sub>2</sub> del 12 % y de HbF del 2 %. El aumento de la concentración de HbA<sub>2</sub>, junto con la clínica que presentaba la paciente, hizo sospechar de un fenotipo intermedio de talasemia β.

En primer lugar, se solicitó el estudio de las mutaciones puntuales más frecuentes en el gen HBB mediante PCR-ARMS. Se identificaron dos mutaciones patogénicas:

- **c.118C>T, p.Gln39Ter**, mutación que introduce un codón de parada prematuro, provocando la pérdida de un 73 % de la proteína. Esta mutación aparece descrita en la base de datos *Globin Gene*, asociada a un fenotipo de talasemia β grave cuando se detecta en homocigosis.

- **c.92+6T>C**, mutación intrónica que afecta al proceso de *splicing* produciendo una reducción en la síntesis de cadenas β del 10 al 20 %, según los estudios funcionales realizados hasta la fecha por otros grupos. Este cambio también aparece en *Globin Gene*, asociado a un fenotipo de talasemia, y cuando se hereda junto con una mutación β<sup>0</sup> o β<sup>+</sup> en el otro alelo, da lugar un fenotipo de talasemia mayor.

Sin embargo, la paciente no presentaba un fenotipo típico de talasemia mayor. Había dos posibilidades:

1. Las dos mutaciones identificadas estuvieran en el mismo alelo.
2. La paciente portara algún factor que atenuara el fenotipo.

La primera hipótesis quedó descartada al estudiar a los padres. Se confirmó que la madre portaba la mutación c.118C>T, p.Gln39Ter en heterocigosis y el padre la mutación intrónica c.92+6T>C, también en heterocigosis. Por tanto, la niña había heredado una mutación de cada uno de sus progenitores, y las mutaciones se encontraban en distintos cromosomas.



El fenotipo moderado de la paciente podía deberse entonces a la presencia de alguna condición que reducía la síntesis de cadenas  $\alpha$  y por tanto el desequilibrio entre cadenas  $\alpha$ /no  $\alpha$ . El hecho de que las concentraciones de HbF fueran normales, excluía prácticamente la presencia concomitante de  $\delta\beta$ -talasemia. Por eso, se desestimó el estudio de deleciones del clúster de la globina  $\beta$  mediante MLPA.

Otra condición que afecta a la correlación genotipo-fenotipo en los pacientes  $\beta$ -talasémicos es la presencia de alteraciones moleculares en los genes *HBA1* y *HBA2*, que dirigen la síntesis de cadenas  $\alpha$ . Por este motivo, se estudiaron las deleciones más frecuentes de la talasemia  $\alpha$  mediante Gap-PCR. Efectivamente, la paciente presentaba en el clúster de la globina  $\alpha$  la deleción de 3.7 kb en heterocigosis (genotipo  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), que producía un fenotipo más leve de talasemia  $\beta$ .

## RESUMEN

Los síndromes talasémicos abarcan a un grupo frecuente de anemias microcíticas hereditarias caracterizadas por una disminución total o parcial en la síntesis de las cadenas proteicas de la hemoglobina. Fenotípicamente son muy heterogéneas, producen desde formas leves o asintomáticas hasta cuadros graves incompatibles con la vida.

Según las cadenas de globina cuya síntesis esté afectada, se clasifican en: talasemia  $\alpha$ , talasemia  $\beta$ ,  $\delta\beta$ -talasemia y PHHF. Los defectos genéticos subyacentes consisten en mutaciones en los clúster que codifican las cadenas de la globina.

Aunque pueden ser fácilmente identificadas mediante pruebas bioquímicas y hematológicas, el diagnóstico definitivo requiere de estudios moleculares más complejos.

## BIBLIOGRAFÍA:

**Carrocini GCS, Zamaro PJA, Bonini-Domingos, CR.** What influences Hb fetal production in adulthood?. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2011; 33: 231-6.

**Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clinical Chemistry* 2000; 46:1284–90.

**Galanello R, Origa R.** Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:11.

**Harteveld CL, Higgs DR.**  $\alpha$ -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:13

**Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G.** Thalassaemia. *Lancet* 2012; 379: 373–83.



**Moreno I, Bolufer P, Pérez ML.** Alteraciones moleculares de las talasemias en España. Revisión de los estudios existentes. *Med Clin (Barc)* 1999; 113: 789-94.

**Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN.** Molecular Diagnosis of Inherited Disorders: Lessons From Hemoglobinopathies. *Human Mutation* 2005; 26:399-412.

**Thein SL.** Genetic modifiers of b-thalassemia. *Haematologica* 2005; 90:649-660.

---

## **FORMACIÓN CONTINUADA EN GENÉTICA COMISION DE GENETICA MOLECULAR**

Josep Oriola Ambrós, Ana M<sup>a</sup> Sánchez de Abajo, Atocha Romero (*coordinadora del curso*), Begoña Ezquieta, Carmen Cañadas, Concha Alonso, Cristina Torreira Banzas, Jesús Molano, María Arruebo Muño, María Santamaría González, Orland Diez, Pilar Carrasco Salas

## **ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN**

M. Rodríguez (*presidente*), D. Balsells, R. Deulofeu, M. Gassó, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, MC. Villà

ISSN 1887-6463 - Diciembre 2013 (recibido para su publicación Octubre 2013)