

Beta talasemia intermedia: características clínicas y estudio molecular. Serie de casos clínicos

Beta thalassemia intermedia: clinical characteristics and molecular analysis.

Case series

Bioq. Silvia Eandi Eberle^a, Bioq. Carolina Pepe^a, Bioq. Fernando Aguirre^a, Bioq. Berenice Milanesio^a, Bioq. Diego Fernández^a, Bioq. Adrián Mansini^a, Lic. Alejandro Chávez^a, Dra. Gabriela Sciuccati^a, Dra. Lilian Díaz^a, Dra. Andrea Candás^a, Dra. Vanesa Avalos Gómez^a, Dra. Mariana Bonduel^a y Dra. Aurora Feliú Torres^a

RESUMEN

La beta talasemia intermedia es una hemoglobinopatía de amplio espectro clínico, que surge de la presencia de una o dos mutaciones en el gen *HBB*, asociada a modificadores genéticos secundarios y/o terciarios. Analizamos las características clínicas y de laboratorio de 29 pacientes con beta talasemia intermedia, evaluados en un período de 23 años. La edad mediana fue de 10,8 años (rango: 0,34-60,4). El 100% de los pacientes mostró anemia microcítica hipocrómica, y solo el 17,2% presentó esplenomegalia y requerimiento transfusional esporádico. El análisis molecular de los pacientes detectó 3 con los dos genes *HBB* afectados; 2 con un gen *HBB* afectado y genes alfa cuadruplicados/triplicados; 23 con un gen *HBB* afectado y genes alfa triplicados; y 1 con dos genes *HBB* afectados y polimorfismos de genes gama. La correcta identificación de estos pacientes aseguró un adecuado consejo genético y la implementación de controles clínicos regulares.

Palabras clave: beta talasemia intermedia, modificadores genéticos, análisis molecular.

ABSTRACT

Beta thalassemia intermedia is a quantitative haemoglobinopathy covering a broad clinical spectrum, that results from the presence of one or two *HBB* gene mutations associated with secondary and/or tertiary genetic modifiers. We analyze the clinical and laboratory features of 29 patients with beta thalassemia intermedia, assessed over a period of 23 years.

Median age was 10.8 years (range: 0.34-60.4). Hypochromic microcytic anemia was seen in 100% of the patients, while only 17.2% had splenomegaly and occasional transfusion requirement. The molecular analysis of patients detected: 3 with two *HBB* affected genes; 2 with one *HBB* affected gene and alpha quadruplicate/triplicate genes; 23 with one *HBB* affected gene and alpha triplicate genes and 1 with two *HBB* affected genes and polymorphisms of gamma genes. The adequate identification of these patients enables us to give

appropriate genetic counseling and implementation of regular clinical follow up.

Key words: beta thalassemia intermedia, gene modifiers, molecular analysis.

<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2015.e294>

INTRODUCCIÓN

La hemoglobina es un tetrámero formado por dos cadenas tipo α y dos cadenas tipo no α . En los individuos normales mayores de un año de edad, aproximadamente el 95% de la hemoglobina es hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), con menos de 3,5% de hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) y menos de 1% de hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$).¹

Las hemoglobinopatías abarcan un grupo diverso de trastornos causados por la alteración del patrón normal de expresión de los genes de globina. Estos trastornos se caracterizan por la síntesis reducida o ausente de una o más cadenas de globina (*talasemias*) o por la síntesis de una hemoglobina estructuralmente anormal (*hemoglobinopatías estructurales*). Se estima que el 7% de la población mundial es portadora de alguno de estos desórdenes.² La β talasemia (BT) es causada por mutaciones en el gen *HBB*, que se localiza en el cromosoma 11. Las mutaciones pueden suprimir completamente (mutaciones β^0) o disminuir (mutaciones β^+ y β^{++}) la producción de cadenas β globina, lo que resulta en un desequilibrio en la síntesis de cadenas de globina α/β . La magnitud de este es la determinante principal del fenotipo de la enfermedad, que abarca desde los individuos asintomáticos (BT menor o portador) hasta los que dependen de transfusiones regulares para vivir (BT mayor). Entre ambos extremos, se encuentran los pacientes con β talasemia intermedia (BTI), en los cuales las manifestaciones clínicas son el resultado de la interacción de modificadores genéticos y ambientales.³

El objetivo de este trabajo es presentar las características clínicas y de laboratorio de los

a. Servicio de Hematología y Oncología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. J. P. Garrahan", Buenos Aires.

Correspondencia:
Dra. Aurora Feliú Torres: afeliu@garrahan.gov.ar

Financiamiento: Ninguno.

Conflicto de intereses: Ninguno que declarar.

Recibido: 11-3-2015
Aceptado: 22-4-2015

pacientes con BTI diagnosticadas en el Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan".

OBSERVACIÓN

Se realizó el estudio retrospectivo, descriptivo, longitudinal de 29 individuos (12 varones y 17 mujeres) pertenecientes a 19 familias no relacionadas, con diagnóstico de BTI, que consultaron entre marzo de 1991 y marzo de 2014 (Tabla 1).

El diagnóstico se basó en el estudio de patología eritrocitaria, al propósito y su grupo familiar, que incluyó la historia clínica, el hemograma completo (Sysmex XS 800i, Sysmex Corporation, Kobe, Japan), el examen del frotis de sangre periférica, el recuento reticulocitario, la electroforesis de hemoglobina semiautomatizada en gel de agarosa a pH alcalino y la electroforesis capilar (Sebia, Lisses, Évry, France), la cuantificación de hemoglobina A₂ por cromatografía de intercambio aniónico (Helena), la cuantificación de hemoglobina fetal por desnaturalización alcalina, la prueba de resistencia osmótica eritrocitaria, el metabolismo del hierro y la prueba de Brewer.⁴

Los estudios moleculares fueron realizados en ADN aislado de leucocitos de sangre periférica por el método de precipitación salina. Las mutaciones puntuales en el gen *HBB* más frecuentes en la población argentina (IVSI-6, IVSI-110, IVSI-1, IVSII-745, CD39, IVSII-1 y CD6 (-A)) fueron analizadas por reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*; PCR, por sus siglas en inglés) específica de alelo utilizando *primers* descritos previamente.^{5,6} Las mutaciones puntuales o pequeñas inserciones-delecciones no buscadas en la pesquisa inicial por PCR específica de alelo fueron estudiadas por PCR-Secuenciación utilizando *primers* descritos previamente por Roldán y col., y un secuenciador automático ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*).⁷

Las delecciones más frecuentes en el *cluster* α globina ($-\alpha^{3,7}$ y $-\alpha^{4,2}$) fueron analizadas por GAP-PCR utilizando los *primers* y la estrategia descrita previamente por Chong y col. con algunas modificaciones.^{8,9} La presencia de genes α triplicados-cuadruplicados anti-3,7 fue analizada por PCR según ha sido descrito previamente y los genes α triplicados/cuadruplicados generados por mecanismos diferentes al que da origen al alelo anti-3,7 fueron identificados por amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*;

MLPA, por sus siglas en inglés), utilizando el kit comercial Salsa MLPA P140B HBA (MRC-Holland).¹⁰

La variante genética *HBG2*: c.-211C>T (-158C>T, rs7482144) fue analizada por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), utilizando la enzima de restricción *XmnI*.¹¹ Las variantes genéticas *HBS1L-MYB* rs9399137 T>C y *BCL11A* rs11886868 T>C y rs1427407 G>T se analizaron por PCR-Secuenciación en el Ospedale Regionale Microcitemie, Cagliari, Italia.

En el período mencionado, se estudiaron 5802 individuos. Los síndromes talasémicos representaron el 25,9% de los diagnósticos efectuados, de los cuales un 2% fueron BTI. La mediana de edad de los 29 individuos fue de 10,8 años (rango: 0,34-60,4).

Todos los pacientes consultaron por anemia microcítica hipocrómica y, a excepción de la #29, presentaron hemoglobina A₂ aumentada con concentraciones variables de hemoglobina fetal y metabolismo del hierro normal. El 17,2% de los pacientes (del #1 al #5) presentaron, además de la anemia microcítica hipocrómica, requerimiento transfusional esporádico y esplenomegalia. El análisis molecular del gen *HBB* en 3 de los 5 pacientes (del #1 al #3) evidenció ambos alelos afectados, mientras que los dos pacientes restantes (el #4 y el #5) presentaron un solo alelo β afectado en presencia de genes α cuadruplicados (paciente #5) y de genes α triplicados/cuadruplicados (paciente #4). El 79,3% de los pacientes (23) presentaron un único alelo β afectado asociado a genes α triplicados.

La paciente #29 presentó anemia microcítica moderada con 0,9% de hemoglobina A₂ y 88% de hemoglobina fetal. El estudio molecular del gen *HBB* identificó la mutación β^0 (CD 39) en homocigosis y el *cluster* α normal. Ante la ausencia de esplenomegalia, anomalías óseas y requerimiento transfusional, se planteó la búsqueda de modificadores genéticos secundarios fuera del *cluster* de β globina y asociados a la producción aumentada de hemoglobina fetal.

Se estudió un marcador genético localizado en la región intergénica *HBS1L-MYB* y dos marcadores genéticos localizados en el gen *BCL11A*, y se observó, en dicha paciente, la presencia heterocigota y homocigota, respectivamente, de los genotipos asociados a síntesis aumentada de cadenas γ y de hemoglobina fetal.

DISCUSIÓN

La BT presenta fenotipos clínicos y hematológicos de gravedad variable. Así, se reconocen

individuos con BT menor, que presentan solo anemia microcítica hipocrómica leve sin manifestaciones clínicas y, en el otro extremo, se en-

TABLA 1. Características clínicas y de laboratorio

# Paciente (flia.)	Edad (años)	Clínica E. físico	Hemoglobina (g/dl)	VCM (fl)	Hemoglobina fetal (%)	Hemoglobina A ₂ (%)	Genotipo HBB	Genotipo grupo α	HGB2 158C>T	Otros
# 1 (1)	3	AMH RTGR esplenomegalia	5,8	73,8	42	3,8	I-110/I-6	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 2 (2)	3,3	AMH RTGR esplenomegalia	8,1	72,0	33,7	4,1	I(-3)/I(-3)	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 3 (3)	7,1	AMH RTGR esplenomegalia	9,6	59,2	13,5	5,7	I-2/-101	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 4 (4)	3,6	AMH RTGR esplenomegalia	7,5	64,6	18	3,9	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 5 (5)	10,4	AMH RTGR esplenomegalia	7	67,5	30	4,2	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 6 (6)	4	AMH	8,7	59,7	1,0	3,8	$\beta^A/II-1$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 7 (6)	1,9	AMH	9,3	56,3	2,2	4,2	$\beta^A/II-1$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 8 (7)	29,6	AMH	9,6	64,8	3,7	5,3	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 9 (7)	60,4	AMH	8,6	72,9	5,9	6,0	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 10 (8)	44,3	AMH	10,9	62,7	2,4	5	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 11 (8)	11,7	AMH	10,6	58,6	2,4	4,2	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 12 (8)	26,7	AMH	8,6	57,1	3,0	4,1	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 13 (8)	1,2	AMH	10,3	46,1	2,9	5,3	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 14 (9)	45,9	AMH	11,4	73,1	13,4	3,6	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 15 (10)	10,4	AMH	9,7	52,3	0,4	5,3	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 16 (10)	34,1	AMH	11,1	52,9	0,9	5,1	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 17 (11)	27,8	AMH	12,0	57,2	0,5	4,2	$\beta^A/CD39$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 18 (12)	37,5	AMH	10,0	61,9	5,4	5,1	$\beta^A/CD6-A$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 19 (13)	1	AMH	9,8	58,5	11,4	3,6	$\beta^A/I-110$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	NA	NA
# 20 (13)	35,4	AMH	11,8	63,1	0,6	5,0	$\beta^A/I-110$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	NA	NA
# 21 (14)	19	AMH	9,9	69,0	0,9	5,5	$\beta^A/I-110$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 22 (14)	25,7	AMH	11,4	67,8	0,9	4,2	$\beta^A/I-110$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 23 (15)	0,3	AMH	7,4	59,5	13,6	4,5	$\beta^A/II-745$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Ausente	NA
# 24 (16)	27,4	AMH	11,4	66,0	2,7	4,3	$\beta^A/I-110$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	NA	NA
# 25 (17)	13,6	AMH	9,8	61,4	0,25	5,0	$\beta^A/c.44delT$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 26 (17)	10,8	AMH	10,7	60,6	1,7	5,7	$\beta^A/c.44delT$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Hetero-	NA
# 27 (17)	2,9	AMH	10,3	54,5	14,4	4,4	$\beta^A/c.44delT$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	Homo-	NA
# 28 (18)	2,1	AMH	8,7	54,4	0,9	6,1	$\beta^A/I-1$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	NA	NA
# 29 (19)	1,5	AMH	9,7	69,9	88,4	0,9	CD39/CD39	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Ausente	HBS1L- MYB rs9399137 T>C:T/C; BCL11A rs11886868 T>C:C/C BCL11A rs1427407 G>T:T/T

β^A : alelo normal; NA: no analizado; Hetero-: heterocigota; Homo-: homocigota; AMH: anemia microcítica hipocrómica; RTGR: requerimiento transfusional de glóbulos rojos esporádico; VCM: volumen corpuscular medio.

cuentran los pacientes con BT mayor, con anemia grave desde el primer año de vida y la necesidad de transfusiones regulares y tratamiento quelante para sobrevivir.³ En 1955, Sturgeon acuñó el término BTI para incluir a aquellos pacientes en los cuales las manifestaciones clínicas y hematológicas eran de gravedad intermedia entre la BT menor y la mayor. Dicha variabilidad resulta de la combinación de mutaciones en el o los genes de β globina (modificadores primarios), asociada a otras mutaciones (modificadores secundarios) que aumentan o disminuyen el desequilibrio en la producción de las diferentes cadenas de globina, lo que altera el grado de eritropoyesis ineficaz y sus consecuencias (anemia, visceromegalias, sobrecarga de hierro).¹²

Las mutaciones de los genes β (modificadores primarios) se clasifican en β^0 , β^+ y β^{++} dependiendo del grado de síntesis residual de globina β y, consecuentemente, de la posibilidad de síntesis de hemoglobina A.

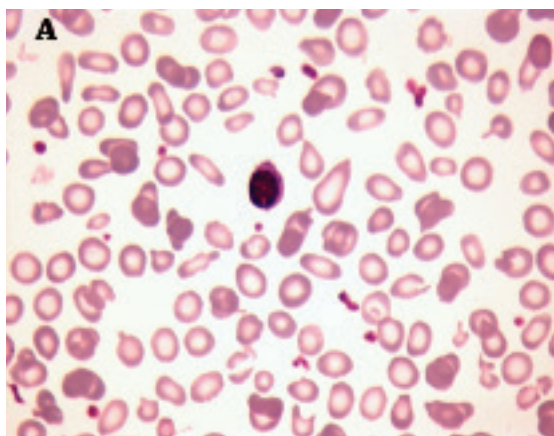
Entre los modificadores genéticos secundarios que aumentan el desequilibrio α/β , se destaca la presencia de genes α triplicados o cuadruplicados; mientras que la co-herencia de α talasemia y de las variantes genéticas que aumentan la producción de hemoglobina fetal disminuyen tal desequilibrio.

En nuestra experiencia de 23 años, los síndromes β talasémicos representaron el 25,9% de los diagnósticos realizados; las BTI fueron el 2% de ellos. En la población estudiada, es necesario resaltar las diferencias clínicas entre los

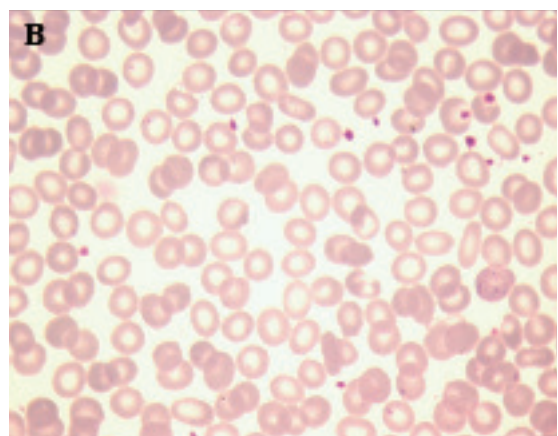
pacientes que presentaron dos mutaciones en los genes de β globina de aquellos en los cuales sólo se identificó una mutación en dicho gen, asociada a la presencia de mayor número de genes α o a modificadores de la producción de hemoglobina fetal. Este último grupo de pacientes fue derivado por presentar anemia microcítica hipocrómica sin manifestaciones clínicas excepto una leve palidez o para evaluación hematológica por el antecedente familiar de β talasemia. Las marcadas diferencias en la morfología eritrocitaria y los índices hematimétricos observadas entre estos pacientes y sus familiares permitieron sospechar la presencia de modificadores secundarios (Figura 1. A y 1. B).

La BTI, actualmente incluida dentro del grupo de las talasemias no dependientes de transfusiones, no está exenta de complicaciones serias. Los estudios realizados por Taher y col., demuestran que la morbilidad, mayor a la previamente reconocida, aumenta con el avance de la edad. La sobrecarga de hierro, subvalorada por la ferritina sérica, se desarrolla aun en pacientes no transfundidos, lo que exige la implementación de métodos diagnósticos no invasivos, tales como la resonancia magnética nuclear hepática y cardíaca. El daño óseo, los focos de eritropoyesis extramedular, las visceromegalias, las úlceras en los miembros inferiores y la predisposición a trombosis son algunas de las complicaciones observadas a lo largo de la vida de estos pacientes. Todo esto exige la identificación temprana y correcta de

FIGURA 1. Frotis de sangre periférica, tinción de May-Grünwald-Giemsa, 100X



A. Paciente con beta talasemia intermedia.



B. Paciente con beta talasemia heterocigota.

esta patología para asegurar el consejo genético e implementar los controles clínicos regulares con la correspondiente intervención terapéutica.¹³ ■

REFERENCIAS

1. Bain BJ. Chapter 1, Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis. En: *Haemoglobinopathy diagnosis*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2006. Págs.1-25.
2. Weatherall DJ. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. *Br J Haematol* 2011;154(6):736-44.
3. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2005;353(11):1135-46.
4. Roper D, Layton M. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: Lewis SM, Bain BJ, Bates I, eds. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. Págs.205-37.
5. Fortina P, Dotti G, Conant R, Monokian G, et al. Detection of the most common mutations causing beta-thalassemia in Mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *PCR Methods Appl* 1992;2(2):163-6.
6. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of beta-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in UK. *Lancet* 1990;336(8719):834-7.
7. Roldán A, Gutiérrez M, Cygler A, Bonduel M, et al. Molecular characterization of beta-thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* 1997;54(3):179-82.
8. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast asian deletion determinants of alpha-thalassemia. *Clin Chem* 2000;46(10):1692-5.
9. Pepe C, Eberle SE, Chaves A, Milanese B, et al. A new $\beta(0)$ frameshift mutation, HBB:c.44delT (p.Leu14ArgfsX5), identified in an Argentinean family associated with secondary genetic modifiers of β -thalassemia. *Hemoglobin* 2014;38(6):444-6.
10. Wang W, Ma ES, Chan AY, Prior J, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for anti-3.7 and anti-4.2 alpha-globin gene duplications. *Clin Chem* 2003;49(10):1679-82.
11. Lanclos KD, Oner C, Dimovski AJ, Gu YC, et al. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the G gamma- and A gamma-globin genes of beta S chromosomes with five different haplotypes. *Blood* 1991;77(11):2488-96.
12. Sturgeon P, Itano HA, Bergren WR. Genetic and biochemical studies of intermediate types of Cooley's anaemia. *Br J Haematol* 1955;1(3):264-77.
13. Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. *Blood Cells Mol Dis* 2006;37(1):12-20.