

Diagnóstico diferencial de anemias microcíticas

► Alejandra Larregina^{1*}, Enrique Reimer^{2*}, Niels Suldrup^{3*}, Sebastián Luis^{4*}, Jorge Zavatti^{5**}, Nelida Nora Polini^{6***}.

1. Médica Hematóloga.
2. Licenciado en Bioquímica.
3. Bioquímico.
4. Técnico de Laboratorio.
5. Doctor en Ciencias.
6. Doctora en Bioquímica.

* IACA Laboratorios. Bahía Blanca.

** Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco". Puerto Madryn.

*** Cátedra de Análisis Clínicos II. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS. Bahía Blanca.

Resumen

La anemia microcítica se define comúnmente por la disminución en el volumen corpuscular medio (VCM). Las formas más frecuentes se deben a deficiencia de hierro y a síndromes talasémicos. En este trabajo, fueron seleccionados 250 hemogramas de un total de 8.738 cuyo VCM era menor a 80 fL y que correspondían a una población formada por 76% de mujeres con una edad promedio de 37,5 años. En cada muestra se determinó la ferrremia, se realizó una electroforesis de hemoglobina (Hb) y se investigó la presencia de las mutaciones IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110 y del codón 39 del exón 2. La frecuencia de distribución de los pacientes con microcitosis mostró dos poblaciones bien definidas, una constituida por pacientes ferropénicos (n= 152) y otra, por pacientes talasémicos menores (n = 81). Los pacientes con un área de distribución eritrocitaria (ADE) mayor al 20% no presentaban mutación y sí resultaron ferropénicos. Los valores hallados de HbA₂ mayores a 3,5% coinciden con la presencia de algunas de las mutaciones citadas. La mutación más común fue la IVS1-110 que alcanzó un valor del 12%, que coincidió con otros estudios realizados en la Argentina.

Palabras clave: anemia microcítica * ferropenia * talasemia.

Summary

MICROCYTIC ANEMIA DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC

Microcytic anemia is usually defined as a result of a reduced mean corpuscular volume (VCM). The most frequent forms are due to iron deficiencies or thalassemic syndromes. In this work series of 250 blood counts with VCM values under 80 fL were chosen (over a total of 8.738 analysed). The pattern of distribution was 76% for women and the mean age was 37.5 years old. On these samples were also performed: serum iron, hemoglobin electrophoresis (Hb), and the occurrence of IVSI-1, IVSI-6, IVSI 110 mutations and codon 39 of exon 2. Two well defined populations were obtained: ferropenic patients (n = 152) and minor thalassemic patients (n = 81). Patients with an Erythrocytic Distribution Area (ADE) higher than 20% did not present mutations by they were ferropenic. Measured values of HbA₂ above 3.5% were related with the occurrence of one of the mentioned mutations. The most common one was IVSI-110 with a value of 12% in good agreement with other studies for Argentina.

Key words: microcytic anemia * ferropenia * thalassemia.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud se define como anemia a la disminución en la concentración de la hemoglobina intraeritrocitaria. La misma varía según el sexo, la edad y las condiciones ambientales (1) (2). El correcto diagnóstico requiere de una buena historia clínica y del hallazgo de parámetros específicos de laboratorio (3).

Con la aparición de los contadores hematológicos se introdujeron nuevos parámetros complementarios de los índices hematimétricos ya conocidos, tal como el área de distribución eritrocitaria (ADE) que mide el grado de anisocitosis. Diferentes estudios clasifican a las anemias según el VCM y ADE. En el caso de las anemias microcíticas en las que el VCM es menor de 80 fL, el ADE contribuye al diagnóstico diferencial entre las anemias ferropénicas y las β -talasémicas heterocigotas (4).

La talasemia se considera la alteración genética más común del mundo. Aproximadamente el 3% de la población mundial (150 millones de habitantes) es portadora de alguna de las mutaciones. Son particularmente prevalentes en el área del Mediterráneo en donde alcanza una incidencia del 34% (5). Los cambios étnicos surgidos de las distintas migraciones hacen que la distribución a lo largo de todo el mundo esté cambiando (6). Distintos autores señalan que en Estados Unidos existe 1,4% de portadores entre la población adulta sana (7) (8). La Argentina tuvo un importante caudal inmigratorio, en especial de Italia y España (9) (10).

La talasemia menor sólo puede presentar alteraciones en la morfología del glóbulo rojo. Resulta de mutaciones que disminuyen la producción del ARNm con el consiguiente descenso en la síntesis normal de la globina (11). Actualmente se han detectado más de 100 mutaciones en el gen de la β -globina. Las más frecuentemente descriptas son IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110 en el primer intrón y el codón 39 en el segundo exón; y en menor proporción IVS2-1 e IVS2-745 en el segundo intrón. Los síndromes beta talasémicos resultan de la sustitución o delección de uno o más nucleótidos, lo que se refleja en la gran heterogeneidad clínica (12). Los individuos heterocigotas presentan dos formas de acuerdo a los alelos mutados: beta + y beta 0; en ambos casos, hay un aumento de la HbA₂ (3,5 - 8%) y la HbF puede estar normal o ligeramente aumentada (13).

Los objetivos de este trabajo fueron: i) posibilitar el diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas por medio del estudio de la utilidad del ADE; ii) analizar el valor predictivo de la determinación de hemoglobina A₂ para identificar individuos beta talasémicos; iii) estimar la frecuencia de las mutaciones presentes en la población estudiada.

Materiales y Métodos

Se extrajeron muestras de sangre (anticoaguladas con EDTA) y se obtuvo suero, de 8.738 pacientes que concurren, en los últimos 6 meses, al Laboratorio de Hematología de IACA Laboratorios.

A las muestras de sangre se les realizó la determinación del hemograma con un autoanalizador hematológico Cell Dyn 3500-R (Abbott, USA), con control interno y externo. Posteriormente, fueron seleccionados del total, 250 pacientes que presentaron microcitosis (VCM < 80 fL). A cada una de estas muestras se les determinó: ferremia, electroforesis de Hb con cuantificación de HbA₂ y a 245 de ellas, la presencia de las siguientes mutaciones puntuales: IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110 y codón 39 del exón 2.

Las ferremias fueron determinadas por el método ferrozine sin desproteinización (Roche, Mannheim, Alemania) empleando un autoanalizador Hitachi 912 (Japón) según la metodología descrita por el fabricante (14).

La electroforesis de hemoglobina fue realizada sobre gel de agarosa tamponada en medio alcalino (tampón barbital B-2, pH = 8,6, fuerza iónica 0,05) con el sistema Paragon de Beckman (Fullerton, CA92835, USA) con control interno. La hemoglobina A₂ fue cuantificada con resinas de intercambio iónico (15). Se visualizó con un colorante específico y se cuantificó por densitometría.

Se determinó la presencia de mutaciones puntuales ubicadas en el intrón 1 nucleótido (G → A), 6 (T → C) y 110 (G → A) y en el exón 2 codón 39 (C → T) del gen de la β -globina. Para ello se aisló el ADN proveniente de 100 mL de sangre por un método comercial no orgánico (Wizard, Promega, Madison, USA). Se amplificó un segmento de 536 pares de bases por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos obtenidos fueron analizados por Dot Blot e hibridación con sondas alelo-específicas para las mutaciones IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110 y codón 39 del exón 2. Los *primers* y las sondas fueron sintetizadas por Gibco BRL (California, USA) según secuencias halladas en la bibliografía (16).

Los resultados obtenidos se procesaron estadísticamente empleando tablas de contingencia de 2 x 2, dentro de las cuales las pruebas de hipótesis se realizaron mediante la prueba de Chi Cuadrado (17). En algunas de las figuras se utilizaron gráficos tipo "Box & Whiskers" (18) que permiten visualizar una buena descripción del rango de valores que toma la variable estudiada.

Resultados

La edad promedio de los 250 pacientes analizados en este estudio fue de 37,5 años. La distribución por sexos fue de 191 mujeres (76%) y 59 varones (24%).

La Tabla I muestra que, en general, los pacientes ferropénicos no fueron beta-talasémicos y viceversa. Al realizar el *test* de Chi cuadrado éste resultó significativo ($X^2 = 51,24$ $p < 0,01$). Es decir, las frecuencias en cada casillero de la tabla (36, 57, 128 y 24, respectivamente) fueron significativamente distintas a las frecuencias que resultarían de una asignación aleatoria de los 245 pacientes. No obstante, hay que señalar que 36 de los 245 no fueron ferropénicos ni beta-talasémicos pero poseían un VCM < 80 fL y, además, 24 de los 245 fueron ferropénicos y talasémicos al mismo tiempo.

La distribución de valores de ADE (Fig. 1) no pareció señalar dos o más conjuntos diferenciados de datos. En cambio, si se observan las Figuras 2 y 3, queda claro que los pacientes con ADE $> 20\%$ no tuvieron mutación y sí fueron ferropénicos.

Para estudiar el valor predictivo de la HbA2 en los pacientes β talasémicos con un VCM menor de 80 fL, que presentaban o no mutaciones, a 249 de los 250 se les determinó simultáneamente la HbA2 y la presencia de mutaciones IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110 y codón 39 del exón 2. La Tabla II muestra que los valores de HbA2 mayores de 3,5% estaban significativamente ligados a la presencia de algunas de las mutaciones citadas ($X^2 = 152,64$, $p < 0,01$). Sin embargo, 4 de los 81 pacientes que presentaron alguna mutación tuvieron un valor de HbA2 menor de 3,5%.

Finalmente se estudió la frecuencia de las mutaciones más comunes en el intrón 1 (IVS1-1, IVS1-110, IVS1-6) y en el exón 2 (codón 39), observándose que el IVS1-110 alcanzó un valor del 11,2% (Tabla III). Un 67,6% no pudo ser identificado dentro de las mutaciones estudiadas.

Discusión

La anemia microcítica se debe, generalmente, a la deficiencia de hierro y a los síndromes talasémicos (19) (20).

Tabla I. Distribución de la frecuencia de pacientes entre las categorías (ferropénicos: sí/no y beta talasémicos: sí/no) comprendidas en este estudio.

		Beta-Talasémico (SÍ/NO)		Total
		NO	SÍ Mutación Presente	
Ferropénico (SÍ/NO)	NO	36	5	93
	SÍ	128	24	152
	Nd	5		5
Total		169	81	250

Nd = No determinado.
Chi-cuadrado = 51,94 ($p < 0,01$).

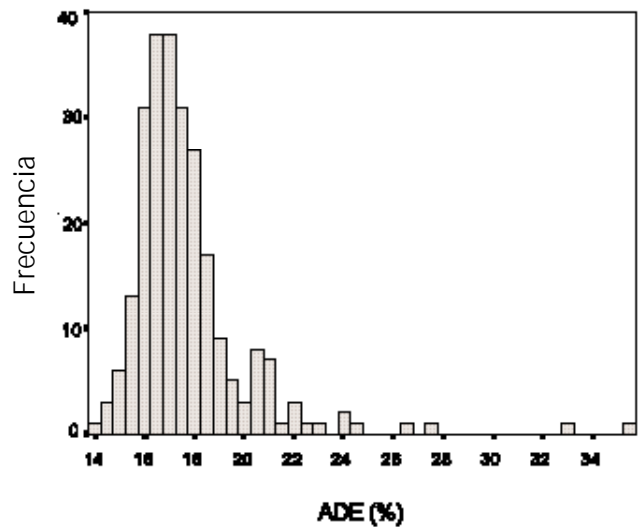


Figura 1. Distribución de frecuencia absoluta de los valores de ADE.

En la Argentina existe una alta prevalencia de anemias de origen nutricional, pero debido a las corrientes migratorias que la poblaron, hay también una fracción de la población portadora de beta talasemia menor, la cual predomina significativamente sobre las otras alteraciones estructurales de la hemoglobina capaces de causar microcitosis.

En este trabajo, los pacientes con volumen corpuscular medio bajo fueron divididos en ferropénicos y β -talasémicos menores. La mayor parte de los mismos correspondió al grupo de ferropénicos, y un poco menos de la tercera parte (81 pacientes) fueron talasémicos menores, constituyendo el 0,9% de la población total estudiada (8.738 pacientes). Estos resulta-

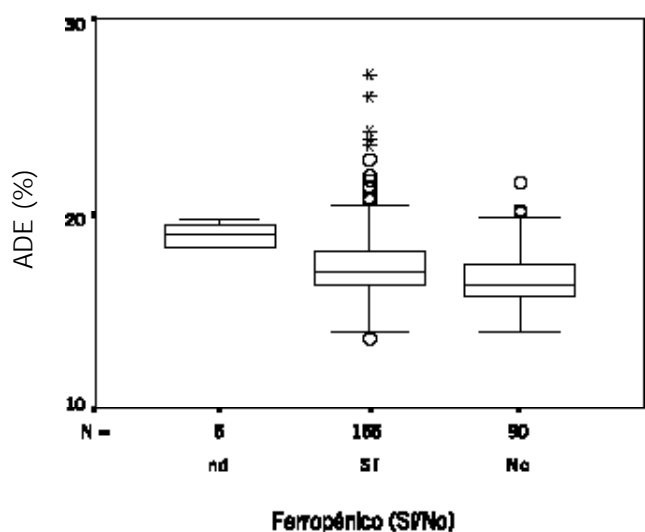


Figura 2. Distribución de los valores de ADE en individuos con o sin ferropenia. La línea central de cada rectángulo corresponde al valor de la mediana de la distribución de datos.

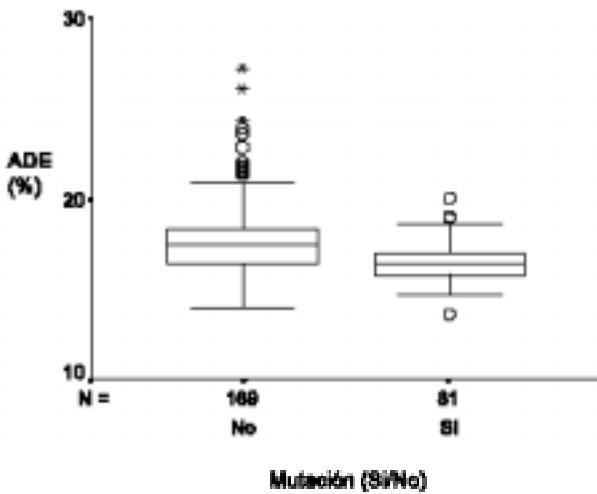


Figura 3. Distribución de los valores de ADE en individuos con o sin mutación. La línea central de cada rectángulo corresponde al valor de la mediana de la distribución de datos.

Tabla II. Distribución de la frecuencia de pacientes entre las categorías (Hemoglobina A₂ > 3,5%: sí/no y beta talasémicos: sí/no) comprendidas en este estudio.

		Beta-Talasémico. Mutación Presente (SÍ/NO)		
		NO	SÍ	Total
HbA ₂ > 3,5% (SÍ/NO)	NO	147	4	151
	SÍ	21	77	98
	Fe < 0,6 µg/mL			
	Nd	1		1
Total		169	81	250

Nd = No determinado.
Chi-cuadrado = 152,64 (p < 0,01).

Tabla III. Distribución de las mutaciones identificadas en los pacientes.

Tipo de mutación	Número de pacientes	Porcentaje
IVS1-1	20	8
IVS1-110	28	11,2
Codón 39	14	5,6
IVS1-6	19	7,6
Nd	169	67,6
Total	250	100

Nd = No determinado.

dos coinciden con lo publicado en otras regiones de este país (20). Existió un número reducido de pacientes con ambas patologías, lo cual podría atribuirse a un déficit nutricional marcado. Por otra parte, se hallaron 36 pacientes con microcitosis sin las mutaciones y con hierro normal; estos casos se explicarían por otras anomalías de la hemoglobina, que no fueron estudiadas.

El ADE fue distinto para ambos grupos; fue característico el aumento del mismo en los pacientes ferropénicos, lo cual contribuyó al diagnóstico diferencial de las microcitosis.

El diagnóstico de β-talasemia menor se realiza de acuerdo con los resultados obtenidos por electroforesis de hemoglobinas en pH alcalino. En sus formas más habituales se observa un aumento característico de la fracción HbA₂ con HbF normal o ligeramente aumentada (21). En este caso se hallaron 81 pacientes con alguna mutación presente y 77 de estos con HbA₂ superior al 3,5%. Los 4 restantes, con hemoglobina normal, podrían definirse como β-talasemia silente.

Dentro de la población mundial, Italia es uno de los países con mayor cantidad de pacientes talasémicos. El 80% de ellos presenta una mutación puntual en el intrón 1 o en el exón 2 (IVS1-110, codón 39 y IVS1-6) (24). La IVS1-110 fue la primera tipificada y una de las más comúnmente halladas, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

La microcitosis es un criterio de clasificación morfológica en las anemias. La incorporación de los autoanalizadores a la práctica clínica ha aportado un mejoramiento en la rapidez, confiabilidad y diagnóstico de los síndromes anémicos, si bien la observación microscópica, sigue siendo irremplazable. Las diferencias en el tratamiento de ambas formas de anemias microcíticas hacen esencial su diagnóstico diferencial debido a que el aporte de hierro en los síndromes talasémicos es iatrogénico.

CORRESPONDENCIA

DRA. ALEJANDRA LARREGINA
IACA Laboratorios
San Martín 68 - 1er Piso
8000 BAHÍA BLANCA. Prov. de Bs. As. Argentina
Tel: 54-291- 4881270
E-mail: gdomi@ciudad.com.ar

Referencias bibliográficas

1. WHO. Iron deficiency anemia. Tech Rep Sem 1959; 182: 4.
2. Vives Corrons JL, Besson I. Los valores de referencia en hematología. Sangre 1992; 38: 63-5.
3. Joan Domingo Saigí. Medicina de Tarragona. La anemia. 2003 http://www.medicadetarragona.es/aula/Laboratorio/la_anemia.htm.

4. Artaza JR, Carbia CD, Ceballo MF, Diaz NB. Índice de distribución de los glóbulos rojos (RDW): su aplicación en la caracterización de anemias microcíticas e hipocrómicas. *Medicina* 1999; 59: 17-22.
5. Kazazian H, Boehm C. Molecular basis and prenatal diagnosis of β -Thalassemia. *Blood* 1988; 72: 1107-16.
6. Olivieri N. The β -Thalassemias. *N Engl J Med* 1999; 341: 99-109.
7. Pierce HI, Kurachi S, Sofroniadou K, Stamatoyannopoulos G. Frequencies of thalassemias in American Blacks. *Blood* 1977; 49: 981-6.
8. Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Clinical experience of management of thalassemia: the sardinian experience. *Semin Hematol* 1996; 33: 66-75.
9. Varela V, Abreu S, Rossetti LC, Targovnik H. Mutaciones beta talasémicas más frecuentes en la población argentina. *Sangre* 1996; 41 (2): 137-40.
10. Roldán A, Gutiérrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Feliú Torres A. Molecular characterization of β -thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* 1997; 54: 179-82.
11. Benz EJ, Forget BG. Defect in messenger RNA for human hemoglobin synthesis in beta thalassemia. *J Clin Invest* 1971; 50: 2755-9.
12. Bank A. Genetic defects in the thalassemias. *Curr Top Hematol* 1985; 5: 1-23.
13. Kazazian HH. The thalassemias syndromes: molecular basics and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990; 27: 209-28.
14. Siedel J, Wahlefeld AW, Ziegenhorn J. A new iron ferrozine-reagent without deproteinization. *Clin Chem* 1984; 30: 975-9.
15. Huisman THJ, Schoroeder WA, Brodie AN. Microchromatography of hemoglobins. A simplified method for the determination of hemoglobin A2. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 700-6.
16. Saiki RK, Chank CA, Lenvenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH et al. Diagnosis of sickle cell anemia and β thalassemia with enzymatically amplified DNA and non radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988; 319: 537-41.
17. Siegel S, John Castellan N. Estadística no paramétrica. Editorial Trillas SA de CV. México. 1995; ISBN 968-24-5101-9.
18. Freund R, Wilson W. Statistical Methods. Academic Press. San Diego. 1997. ISBN 0-12-267472-3.
19. De Maeyer EM. Preventing and controlling Iron Deficiency anaemia through primary health care. A guide for health administrators and programme managers. Geneva. World Health Organization 1989.
20. Aixalá MTF. Prevalencia y perfil hematimétrico de β talasemia menor. *Hematología* 2003; 7: 183-6.
21. Oliva Berini E, Caladera A, Torrent M. Campaña para la detección de beta talasemia menor y prevención de la mayor en la isla de Mallorca. Experiencia de 10 años. *Med Clin* 1998; 110: 361-4.
22. Thein SL, Wainscoat JS, Old JM, Sampietro M, Fiorelli G, Wallace RB, et al. Feasibility of β -thalassemia with synthetic DNA probes in two Mediterranean populations. *Lancet* 1985; 2: 345-7.

Aceptado para su publicación el 6 de septiembre de 2004