

---

---

## Fenotipo y genotipo del doble heterocigoto para Talasemia/ <sup>IVSII-849</sup> Talasemia en una familia venezolana.

Martha Bravo-Urquiola<sup>1,2,3</sup>, Anabel Arends<sup>1,2</sup>, Silvia Montilla<sup>1,2</sup>, José María Guevara- I<sup>1</sup>, Gloria García<sup>1</sup>, Maritza Álvarez<sup>1</sup> y Omar Castillo<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Servicio de Hematología “Dr. Tulio Arends”, Hospital Universitario de Caracas, <sup>2</sup>Instituto Anatómico “José Izquierdo” Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela,

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar y

<sup>4</sup>Universidad de Carabobo. Maracay, Venezuela. Correo electrónico: aarends@cantv.net

**Palabras clave:** Talasemia Mayor, talasemia

**Resumen.** El propósito es una niña de 2 años de edad, con anemia hemolítica severa, transfusión dependiente, quien presenta un cuadro clínico sugestivo de talasemia mayor. Al examen físico se constata la presencia de esplenomegalia, malformaciones óseas y retardo en el crecimiento. La presencia de las distintas hemoglobinas: Hb A, Hb F, Hb A<sub>2</sub> y su cuantificación fue determinada utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta presión, de intercambio catiónico (HPLC-CE). El ADN genómico fue aislado a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el método de *salting-out*. La detección de la mutación beta talasémica fue realizada por medio de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de *Reverse Dot Blot*. Sus parámetros hematológicos fueron: Hb: 7,0 g/dL, Hcto: 24,8%, VCM: 87,4 fl, CHCM: 27,8 fl. Los resultados de la HPLC-CE mostraron un elevado incremento en los niveles de Hb Fetal en un 97% y niveles de Hb A<sub>2</sub> dentro de los valores normales. El estudio molecular y familiar demostró la presencia de la mutación <sup>IVSII-849</sup> *en trans* con una delección talasemia. El propósito heredó de la madre la mutación -talasemia y del padre la mutación <sup>IVSII-849</sup>. Esta es la primera vez que se ha realizado este diagnóstico en una familia Venezolana, con riesgo de un heterocigoto compuesto para -talasemia y -talasemia.

## Phenotyping and genotyping studies in a family with the compound heterozygosity $\beta$ -thalassemia/<sup>IVSII-849</sup> $\delta$ -thalassemia.

*Invest Clín* 2006; 47(2): 179 - 184

**Key words:**  $\beta$ -thalassemia mayor,  $\delta$ -thalassemia.

**Abstract.** The propositus is a two year old child with a severe hemolytic anemia and increased level of Hb F. The Hbs A, A<sub>2</sub> and F were eluted and quantitated by cation exchange high-performance liquid chromatography (HPLC-CE). DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a salt-ing-out extraction procedure. The  $\beta$  globin gene was amplified and the presence of the  $\delta$ -thalassemia mutation was determined by PCR followed of *Reverse Dot Blot*. Her hematological parameters were as follows: Hb: 7.0 g/dL, Het: 24.8%, VCM: 87.4 fl, CHCM: 27.8 fl. The haemoglobin study showed an 97% increase of Hb F and Hb A<sub>2</sub> normal. The molecular study suggested the presence of <sup>IVSII-849</sup> mutation in trans to  $\beta$ -Thalassemia. The propositus inherited her mother's  $\delta$ -thalassemia gene mutation and her father's <sup>IVSII-849</sup> mutation. This is the first time the diagnosis has been performed in a Venezuelan family at-risk of compound heterozygotes for  $\beta$ -thalassemia and delta  $\delta$ -thalassemia.

*Recibido: 25-10-2004. Aceptado: 26-01-2006.*

### INTRODUCCIÓN

El estado doble heterocigoto para la talasemia/ $\delta$ -talasemia fue descrito por primera vez por Zuelzer y col. (1). Posteriormente algunos otros casos fueron publicados, especialmente en las regiones del mediterráneo y China (2, 3). Este es el primer reporte en una familia venezolana. La Beta talasemia es un tipo de anemia hemolítica congénita, caracterizada por microcitosis, hipocromía y elevados niveles de hemoglobina A<sub>2</sub>. Este tipo de trastorno es causado por mutaciones que resultan en la reducción o ausencia de la síntesis de cadenas beta globinas (4).

El diagnóstico de Beta talasemia tradicionalmente ha sido realizado por la determinación de los índices hematimétricos (VCM < 75 pg, HCM < 25 pg), elevados niveles de hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub> > 4%) y en algunos casos de hemoglobina fetal (HbF >

2%) (5), utilizando los métodos de electroforesis de hemoglobina a pH alcalino y a pH ácido, el método de desnaturalización por álcalis y la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión de intercambio cationico (HPLC-CE). Esta última técnica, permite la cuantificación rápida y precisa de las hemoglobinas A, A<sub>2</sub> y F (5). Asimismo, permite la determinación de un gran número de variantes hemoglobínicas, entre las cuales se encuentran las Hemoglobinas S, C, D y E. Por otro lado, el estudio molecular de las mutaciones causantes de  $\delta$ -Talasemia, puede ser realizado utilizando técnicas de biología molecular, tales como: Amplificación refractaria del sistema de mutaciones (ARMS-PCR) (6), *Reverse dot Blot* (7), PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (8) y secuenciación del ADN genómico (9).

Las manifestaciones clínicas de pacientes con talasemia pueden ser variables, se han observado tres fenotipos: Talasemia Menor, Talasemia Intermedia y Talasemia Mayor, siendo esta última la forma clínica más severa de la enfermedad. La Talasemia Mayor generalmente se presenta como una anemia hemolítica microcítica congénita, muy severa, transfusión dependiente con elevados niveles de Hemoglobina A<sub>2</sub> y un incremento de Hemoglobina Fetal, en niveles entre 10 a 90% (4). Esto es debido, a la ausencia (- Talasemia) o reducción (+ Talasemia) de la síntesis de cadenas  $\alpha$ , lo cual influye directamente en la severidad de la enfermedad. En este trabajo se presentan los estudios hematológicos y moleculares de una paciente con anemia hemolítica severa, transfusión dependiente, esplenomegalia, deformaciones óseas y retardo en el crecimiento y de su grupo familiar.

### PRESENTACIÓN DEL CASO

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas, siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki y del Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT.

### Historia clínica

El propósito, es una niña de 2 años de edad, natural y procedente del Estado Bolívar, Venezuela. Producto de un embarazo eutósico de 9 meses de gestación. Durante sus primeros seis meses de vida no presentó ninguna manifestación clínica. Consulta a los nueve meses de edad con un cuadro clínico sugestivo de anemia hemolítica severa, con antecedentes de dos transfusiones antes del primer año de vida y dos hospitalizaciones por probable neumonía. Al examen físico: niña de 24 meses de edad con retardo pondo estatural, hepato-esplenomegalia, palidez cutánea mucosa acentuada, malformaciones óseas y retardo en el crecimiento. El estudio de las células rojas indicó la presencia de una anemia severa, microcítica e hipocrómica (Tabla I). La determinación de las diferentes hemoglobinas, mediante la técnica de Cromatografía líquida de alta presión, de intercambio catiónico (HPLC-CE), de acuerdo a los procedimientos descritos por Tan y col. (5) y utilizando el *Tal Short Program*<sup>®</sup> de BioRad (Hércules, California, USA) demostraron que la paciente en estudio presentaba niveles de Hb F en un 97% y niveles de Hb A<sub>2</sub> en un 2,3%. El estudio familiar demostró que la madre de la paciente es Talasemia heterocigoto y el

**TABLA I**  
PORCENTAJE DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS Y VALORES HEMATOLÓGICOS DEL PROPÓSITO Y SU GRUPO FAMILIAR

Sujetos	Genotipo	Hb A (%)	Hb A <sub>2</sub> (%)	Hb F (%)	Hb S (%)	Hb (g/dL)	Hcto (%)	VCM (fl)	CHCM (fl)
Propósito	IVSII-849/ tal	0,2	2,3	97,4		7,0	24,8	87,4	27,8
Madre	tal/N	59,4	1,7	32,9		12,5	38,0	84,9	32,8
Padre	IVSII-849/N	84,0	5,8	1,1		12,9	41,3	61,7	31,1
Abuela materna	tal/N	58,1	2,0	21,9		11,8	37,4	79,0	31,5
Abuelo Paterno	IVSII-849/N	84,0	5,5	0,6		11,5	34,0	79,6	33,7
Tía materna	tal/ HbS	3,7	4,0	32,8	59,1	12,5	38,1	83,5	32,8

padre presenta Talasemia en estado heterocigoto. Seis familiares de la rama materna fueron portadores de la Talasemia (Fig. 1). Esta es una familia de cuarta generación de descendencia de la isla de Trinidad. La rama paterna es de origen indígena, desconocen ningún ancestro extranjero.

La extracción del ADN genómico fue realizado usando el protocolo *salting-out* a partir de leucocitos de sangre periférica (10). La detección e identificación de la mutación talasémica, realizada mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de *Reverse Dot Blot* (7), permitió determinar que el tipo de mutación talasémica presente en el propósito y en su padre fue la IVSII-849 (A/G) (Fig. 2).

La mutación IVSII-849 (A/G) fue descrita por primera vez en una paciente de origen africano por Antonarakis y col. (11). Esta es una mutación localizada en el segundo intrón, en la posición 849, afecta el procesamiento del ARN y es del tipo  $\delta\beta$ , debido a que suprime totalmente la expresión de las cadenas globinas. Es por esto que esta paciente no presenta Hb A ni Hb A<sub>2</sub> elevada, sólo un 97% de Hb F.

### DISCUSIÓN

El estudio molecular y familiar de este caso clínico resulta interesante, debido a que se determinó la presencia de la mutación IVSII-849 *en trans* con la delección talasemia en el propósito, explicándose así la ausencia de HbA, el bajo nivel de Hb A<sub>2</sub> y el nivel elevado de Hb F en la paciente. El diagnostico de la talasemia en el propósito y sus familiares estuvo basado solamente en el análisis hematológico. La distribución de la Hb F fue heterocelular.

A pesar de que la literatura reporta que el heterocigoto compuesto para  $\delta$ -talasemia y  $\beta$ -talasemia usualmente cursa con un cuadro clínico moderado, la condición  $\delta$  talasemia/  $\beta$  talasemia, reportada en este estudio manifiesta una clínica de talasemia mayor, esto quizás se podría explicar por la presencia de la mutación tipo  $\delta$ , la cual suprime totalmente la producción de hemoglobina A, esto coincide con lo reportado por Liz Mo y col. (12) en una familia con el heterocigoto compuesto  $\delta$ -talasemia/  $\beta$ -talasemia.

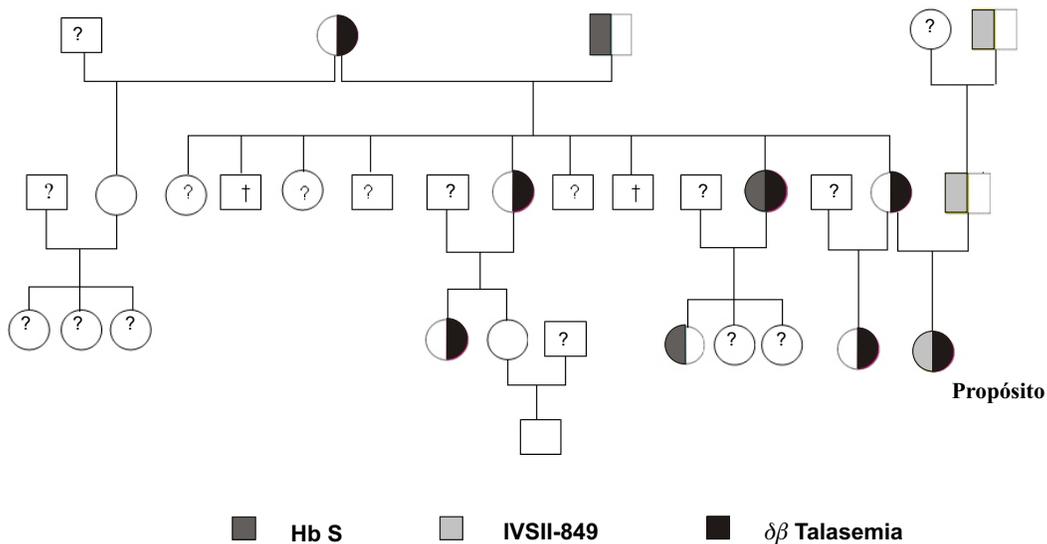


Fig. 1. Árbol genealógico del propósito y su grupo familiar.

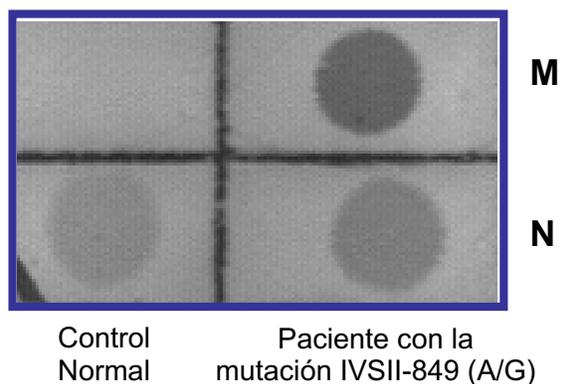


Fig. 2. Detección de la mutación IVSII-849 (A/G) por medio de la técnica de *Reverse dot blot*. (N) Alelo normal, (M) alelo mutado. Control normal: Negativo para la mutación IVSII-849 (A/G). Paciente: Propósito portador de la mutación IVSII-849 (A/G).

Esta es la primera vez que se hace este diagnóstico en una familia venezolana con riesgo de un heterocigoto compuesto para  $\alpha$ -talasemia y  $\beta$ -talasemia. Posiblemente esta mutación <sup>IVSII-849</sup> A/G previamente descrita en un paciente africano (11) no tenga ese mismo origen en nuestro paciente por ser la rama paterna de extracción indígena. Entre los haplotipos del gen beta globina estudiados en la familia con esta mutación no se observo ninguno de origen africano. Por lo tanto se plantea la posibilidad de estar en presencia de una mutación reciente.

El cuadro clínico del propósito está basado en el desbalance de la síntesis de cadenas globinas. En este sentido, la severidad del síndrome es debido a que la síntesis de cadenas betas está totalmente ausente, conduciendo esto a un exceso de cadenas alfa libres que no pueden formar el tetrámero de hemoglobina A estable y precipitan en los precursores de las células rojas formando cuerpos de inclusión (4, 13). Estos precursores de células rojas con cuerpos de inclusión insolubles son destruidos dentro de la médula ósea, resultando en una eritro-

poyesis inefectiva (14, 15). Las células que sobreviven tienen disminuida hemoglobini-zación y aparecen como hipocrómicas y microcíticas. El nivel elevado de Hb F, que caracteriza este síndrome, es debido a la producción de cadenas globinas, las cuales se combinan con las cadenas globinas para formar la Hb F, esto disminuye la precipitación de las cadenas  $\alpha$  y las células son menos propensas a la hemólisis extravascular.

La profunda anemia en esta paciente es complicada por la elevada afinidad de la Hb F por el oxígeno, lo cual contribuye a la hipoxia en los tejidos, las cuales conducen a la producción de eritropoyetina y al estímulo adicional de la producción de células eritroides en la médula ósea. Este estímulo en la producción de células rojas conduce a la expansión de la médula hematopoyética causando deformaciones faciales y craneales y la incrementada porosidad de los huesos largos, lo cual explica la presencia de marcada malformación ósea en los huesos de la cara y cráneo, a pesar de la corta edad de la paciente. Además, el incrementado recambio de células rojas contribuye a la presencia de una esplenomegalia progresiva, la cual exacerbase la anemia por secuestro de los glóbulos rojos.

#### AGRADECIMIENTO

Al Dr. Frank Ramírez del Centro de Transplante de Médula ósea (FUNDAMENTULA), por la referencia del caso en estudio. Este trabajo fue financiado por el CODECIH-UC 2005-011 y el FONACIT proyectos S1-200200539, FONACIT-ECOS NORD, No. PI 2005000758.

#### REFERENCIAS

1. Zuelzer WW, Robinson AR, Booker CR. Reciprocal relationship of Hemoglobins A<sub>2</sub> and F in beta chain thalassemia, a key to the genetic control of hemoglobin F. *Blood* 1961; 17: 393-408.

2. **Wolf JA, Ignatov VG.** Heterogeneity of thalassemia major. *Am J Dis Child* 1963; 105: 234-242.
3. **Atweh GF, Zhu DE, Forget BG.** A novel basis for delta beta-thalassemia in a Chinese family. *Blood* 1986; 68(5):1108-1113.
4. **Weatherall DJ, Clegg JB.** *The Thalassemia Syndromes.* 4<sup>a</sup> Ed. London. Blackwell Science Publications; 2001, p 133-191.
5. **Tan GB, Aw TC, Dunstan RA, Lee SH.** Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A<sub>2</sub> and F. *J Clin Pathol* 1993; 46: 852-856.
6. **Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ.** Rapid detection and prenatal diagnosis of  $\delta$ -thalassaemia: studies in Indian and Cypriot population in the UK. *Lancet* 1990; 336:834-837.
7. **Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kann YW, Chehab FF.** Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, Hemoglobin C and seven Mediterranean Beta thalassemia mutation by covalent reverse dot blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 1993; 81:239-242.
8. **Gottardi E, Losekoot M, Fodde R, Saglio G, Camaschella C, Bernini LF.** Rapid identification denaturing gradient gel electrophoresis of mutations in the  $\delta$ -globin gene promoters in non-deletion type HPFH. *British J Haematol* 1992; 80:533-538.
9. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with Caín termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
10. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Reserch* 1988; 16:1215.
11. **Antonarakis SE, Orkin SH, Cheng TC, Scott AR, Sexton JP, Trusko S, Charache S, Kazazian HH.** Beta Thalassemia in American Black: novel mutations in the TATA box and IVS-2 acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:1154-1158.
12. **Liz Mo Q, Zhong X, Liu L, Xu X.** Phenotyping and genotyping studies in a family with the compound heterozygosity for a deletional delta beta-thalassemia and a beta-thalassemia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001; 18(4):310-313.
13. **Fessas P.** Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. *Blood* 1963; 21:21-32.
14. **Crosby WH y Akeroyd JH.** The limit of hemoglobin synthesis in hereditary hemolytic anemia. *Am J Med* 1952; 13:273-283.
15. **Erlandson ME, Schulman I, Stern G, Smith CH.** Studies of congenital hemolytic syndrome. I. Rates of destruction and production of erythrocytes in thalassemia. *Pediatric* 1958; 22:910-922.