

SÍNDROME DREPANOCÍTICO. ASOCIACIÓN DE HEMOGLOBINA S Y  $\beta$  TALASEMIA

NEHUEN P. GASPARINI<sup>1</sup>, EVANGELINA E. AGRIELLO<sup>1,2</sup>, M. J. LORENA ZANELLA<sup>1</sup>, MARÍA P. IOMMI<sup>1</sup>,  
JUAN MARADEI<sup>3</sup>, MARISA J. SANDOVAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Especialidades Bioquímicas, <sup>2</sup>Cátedras de Hematología Clínica y Bioquímica, Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, <sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital Municipal Dr. Emilio Ferreyra, Necochea, Buenos Aires, Argentina

**Resumen** El síndrome drepanocítico HbS/ $\beta$  talasemia responde a la herencia de tipo mendeliana en simultáneo de un alelo  $\beta^s$  de la hemoglobina S (HbS) y un alelo de  $\beta$  talasemia. Vinculado fundamentalmente a individuos que comparten ascendencia africana y de países del Mediterráneo. La mutación responsable de la HbS es puntual, mientras que para la  $\beta$  talasemia existen más de 200 mutaciones que causan diferentes grados de deficiencia de síntesis de la cadena de  $\beta$  globina, lo cual justifica la heterogeneidad clínica y genética de este síndrome. Se presenta el caso clínico de un adulto joven de escasos recursos que consulta por dolores óseos de larga data. Registra hemogramas con anemia y marcada microcitosis. Se le realizó electroforesis de Hb detectándose un pico anómalo en posición de HbS y elevada fracción de HbA2. El resultado de la electroforesis de hemoglobina indica dos posibles alteraciones moleculares en simultáneo, por tal motivo se realizó el estudio molecular de las mutaciones más frecuentes en nuestra población de  $\beta$  talasemia y de la mutación puntual responsable de la hemoglobinopatía S. A partir de la clínica y datos del laboratorio bioquímico se diagnosticó el síndrome drepanocítico y se confirmó por biología molecular la portación de las mutaciones IVS-Int 110 G > A ( $\beta$  talasemia) y del codón 6 A > T (GAG→GTG: Glu→Val) responsable de la hemoglobinopatía S. Dado que es una enfermedad de alto impacto sanitario, es importante un adecuado asesoramiento genético a toda la familia.

**Palabras clave:** hemoglobinopatías, síndrome drepanocítico,  $\beta$  talasemia, biología molecular

**Abstract** *Sickle cell syndrome. Association between hemoglobin S and  $\beta$  thalassemia.* Sickle cell syndrome HbS/ $\beta$  thalassemia is an inheritable mendelian type disease where two affected alleles are simultaneously present, one from HbS ( $\beta^s$ ) and the other from  $\beta$  thalassemia. That situation is mainly linked to individuals who share African and Mediterranean ancestors. The mutation responsible for HbS is a point mutation, whereas for  $\beta$  thalassemia, there are more than 200 mutations that cause different degrees of deficiency synthesis of  $\beta$  globin chain, which justifies the clinical and genetic heterogeneity of this syndrome. It is presented a clinical case of a young adult man with limited resources that consulted by longstanding bone pain. The patient presented anemia with a marked microcytosis. Hemoglobin electrophoresis was performed, an abnormal peak in position of HbS and high HbA2 fraction were detected. These last results indicated two possible molecular alterations simultaneously, for this reason the molecular study was performed looking for the most common  $\beta$  thalassemia mutations in our population and, the point mutation responsible for S hemoglobinopathy. Clinical data and biochemical laboratory allowed the diagnosis of sickle cell syndrome. The molecular study confirmed the syndrome carrying mutations IVS-I nt 110 G > A, responsible for  $\beta$  thalassemia and, codon 6 A > T (GAG → GTG: Glu → Val) responsible for S hemoglobinopathy. Since it is a disease of high health impact, it is important to provide genetic counseling to the whole family.

**Key words:** hemoglobinopathies, sickle cell syndrome,  $\beta$ -thalassemia, molecular biology

Existen más de 200 diferentes mutaciones que afectan al gen  $\beta$  globina y con ello, la síntesis de la cadena  $\beta$  globina, dando origen a las llamadas hemoglobinopatías. Si bien esas alteraciones cuantitativas o cualitativas suelen presentarse en forma heterocigota y por ende un alelo permanece normal, cuando ocurren en forma homocigota

o doble heterocigota no se advierte alelo  $\beta$  globina normal, como es el caso del síndrome drepanocítico HbS/ $\beta$  talasemia<sup>1</sup>. En esta enfermedad, se hereda el alelo  $\beta^s$  de la HbS y un alelo de  $\beta$  talasemia ( $\beta$  tal).

Este síndrome afecta mayoritariamente a individuos que comparten ascendencia africana y de países del Mediterráneo. Países latinoamericanos como Argentina, con una gran corriente inmigratoria de la cuenca mediterránea, heredaron su diversidad genética, de allí que exista una casuística similar entre Argentina, Italia y España en cuanto a las mutaciones más frecuentes en  $\beta$  tal<sup>1,2</sup>. La  $\beta$  tal responde a diversas mutaciones distribuidas a lo largo

Recibido: 9-V-2016

Aceptado: 12-IX-2016

**Dirección postal:** Dra. Marisa J. Sandoval, Cátedra de Hematología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, 8000 Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

e-mail: msandova@criba.edu.ar

del gen  $\beta$  globina, dichas alteraciones genéticas pueden provocar desde ausencia total de cadenas  $\beta$  globina ( $\beta^0$ ) hasta su síntesis parcial ( $\beta^+$ )<sup>3</sup>.

En la HbS, la mutación responsable corresponde al cambio de una base (A > T) en la posición 2 del codón 6 (GAG→GTG) dentro del primer exón, originando una sustitución de ácido glutámico por valina en la cadena de  $\beta$  globina ( $\beta^S$ )<sup>4</sup>. De allí que la HbS/ $\beta$  tal se describa como un síndrome muy heterogéneo no solo desde el punto de vista genético sino clínico, dependiendo en gran parte del alelo talasémico implicado.

En este trabajo se presentan los datos clínicos, hematológicos y moleculares que permitieron realizar el diagnóstico del síndrome drepanocítico HbS/ $\beta$  tal, en un adulto joven.

### Caso clínico

Hombre de 39 años de edad de escasos recursos que consultó por cuadro de dolor óseo de varios días de evolución tratado con AINES esporádicos a demanda. Refirió dolores óseos inespecíficos desde la infancia, predominantes en región lumbar y torácica. Mencionó tener padre talasémico. En la ecografía abdominal se observó bazo disminuido de tamaño y ecoestructura heterogénea a expensas de múltiples imágenes hipoeoicas de morfología en cuña que podrían corresponder a infartos. En la tomografía axial computarizada se observaron imágenes osteoblásticas en huesos largos, cabeza femoral y acetábulos.

Los datos del hemograma (Mindray 3000) revelaron anemia moderada (Hb: 10.8 g/dl); en el frotis se observó hipocromía (HCM: 20 pg), anisocitosis (++), microcitosis (VCM: 58 fl), poiquilocitosis con células en diana y punteado basófilo; no se observaron hematíes falciformes en los campos observados. Los valores de LDH ligeramente elevados (506 U/l) y el perfil de hierro normal. Se realizaron pruebas de fragilidad osmótica eritrocitaria normal, de falciformación positiva y las de Coombs directa, Brewer e isopropanol negativas. Se cuantificaron las diferentes fracciones de Hb por electroforesis capilar (*Capillary Stain Minicap*) y además, desnaturalización alcalina para HbF. En la corrida de Hb por electroforesis capilar se observó el pico de Hb anormal en posición de HbS (82.8%) y valores de HbA2 aumentada (5.1%) (Fig.1).

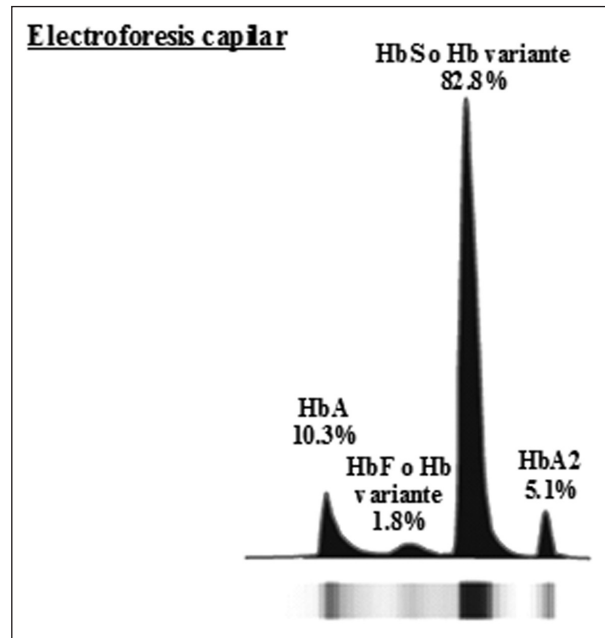
Dada la detección de dos alteraciones en simultáneo, se realizó el estudio molecular de las mutaciones más frecuentes en nuestra población de  $\beta$  tal y de la mutación puntual responsable de la hemoglobinopatía S<sup>1,2</sup>.

A partir de ADN leucocitario mediante reacción en cadena de la polimerasa, ARMS-PCR, se estudiaron las mutaciones IVS-II nt1, IVS-I nt6, IVS-I nt110 y codón 39: multiplex A (Fig. 2 A), y las mutaciones IVS-I nt1 y IVS-II nt745: multiplex B (datos no mostrados)<sup>5,6</sup>.

Para el abordaje de la mutación puntual de HbS, se realizó ARMS-PCR en el codón 6 A > T (Fig. 2 B).

De estos resultados se concluyó que el paciente es portador en estado heterocigota de la mutación IVS-Int 110 G > A, responsable de la  $\beta$  tal ( $\beta^+$ , indicador de síntesis parcial de cadena  $\beta$  globina) y la mutación puntual del codón 6 A > T del gen de  $\beta$  globina (GAG→GTG: Glu→Val), responsable de la hemoglobinopatía S (Fig. 2 B).

Se indicó tratamiento con hidroxiurea (HU) (10 mg/kg peso).



Fracciones	Valores de referencia (%)
HbA	96.8-97.8
HbA2	2.2-3.2
HbF o Hb variante	0.0-0.5

Fig. 1.- Electroforesis capilar de hemoglobina

### Discusión

La mutación talasémica que registró el paciente es una de las más comunes en las poblaciones mediterráneas. Según datos epidemiológicos, la frecuencia de distribución de la mutación IVS-Int 110 G > A en la población argentina es del 23.3%, ocupando la segunda posición después de la del codón 39. De hecho, se registran valores similares a Italia (segunda en frecuencia, 21%) y a España (cuarta en frecuencia, 8.1%)<sup>1</sup>.

La mutación que produce la HbS es característica de individuos oriundos de África ecuatorial y frecuente en poblaciones mediterráneas, Oriente Medio, India y EE.UU. (población de esos orígenes)<sup>1</sup>.

Si bien en la mayoría de los países la incidencia de HbS y de  $\beta$  tal se conoce en forma aislada, la información sobre la incidencia de HbS/ $\beta$  tal es escasa. En Brasil, la variante más común de anemia drepanocítica es la condición homocigota para la HbS y en Argentina, la condición doble heterocigota para HbS y  $\beta$  tal<sup>7,8</sup>.

En la hemoglobinopatía S la sustitución aminoacídica es responsable de la polimerización de la Hb al desoxige-

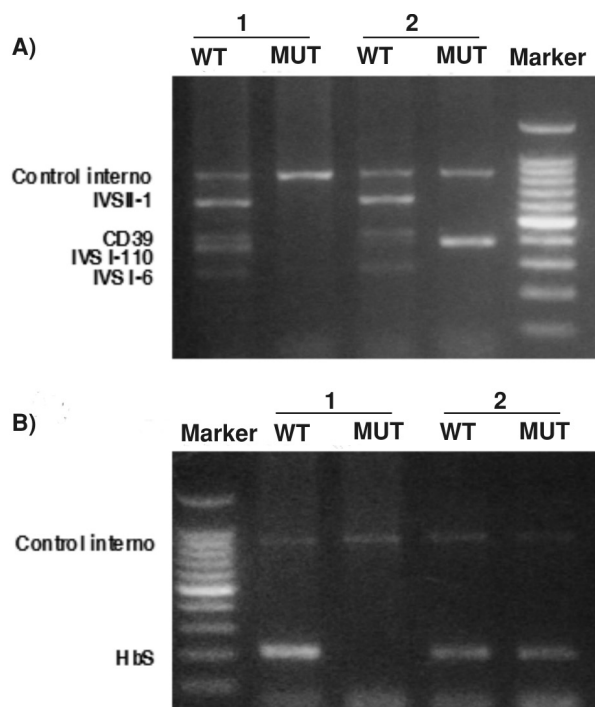


Fig. 2.- Estudios de biología molecular. A) Detección de mutaciones de  $\beta$  talasemia mediante ARMS-PCR. Multiplex 1 1- Paciente sano; 2- Propósito WT- Amplificación de alelos sanos; MUT- Amplificación de alelos mutados. Marker: marcador de peso molecular. Tamaños en pares de bases (pb): Control interno: 861pb; IVS-II nt1: 634pb; Codón 39: 436pb; IVS-I nt110: 390pb; IVS-I nt6: 286pb. B) Detección de la mutación de Hb S (Codón 6 A > T) mediante ARMS-PCR. 1- Paciente sano; 2- Propósito. WT- Amplificación de alelos sanos; MUT- Amplificación de alelos mutados. Marker: marcador de peso molecular Tamaños en pares de bases: Control interno: 861pb; HbS: 207pb.

narse (drepanocitosis), originando estructuras insolubles y rígidas que deforman al hematíe (morfología en hoz). Los episodios repetidos de polimerización de la HbS facilitan la liberación del grupo hemo, siendo el hierro el promotor de la formación de especies reactivas de oxígeno. Éstas alteran la estructura de la membrana eritrocitaria favoreciendo la adherencia del drepanocito al endotelio vascular, uno de los principales factores desencadenantes de las crisis vaso oclusivas. Está descrito que la presencia de moléculas de HbF entre las de HbS reduce la posibilidad de contacto, la polimerización, el número de células densas, la hemólisis y consecuentemente los eventos vasooclusivos<sup>9</sup>.

Si bien los valores de HbS del paciente fueron lo suficientemente elevados como para plantearse un probable cuadro de hemoglobinopatía S homocigota, la presencia de HbA lo descartó. En condición heterocigota tanto para HbS como para  $\beta$  tal, el cuadro que se potencia es el drepanocítico. El elevado valor de HbS que registró el paciente es comparable al de ciertas poblaciones asiáti-

cas<sup>10, 11</sup>. Por otro lado, los bajos valores de HbA responderían a que la mutación IVS-I nt 110 G > A genera una nueva diana de *splicing* que compite con las normales, de manera que en un 80% de las veces el *splicing* no ocurre adecuadamente impidiendo la síntesis de la cadena de  $\beta$  globina normal<sup>12</sup>. En este caso, el alelo portador de la mutación  $\beta$  tal solo permitiría la producción de un 20% del 50% que le corresponde, explicando el bajo porcentaje relativo de la HbA que presentó.

La presencia de HbS con prueba de falciformación positiva junto al aumento de HbA2 con microcitosis sin ferropenia permitió hacer el diagnóstico del síndrome drepanocítico HbS/ $\beta$  tal. Los estudios moleculares lo confirmaron y aportaron el conocimiento del genotipo del propósito.

Son numerosos los factores que modifican el número de hematíes falciformes en sangre, entre ellos el simple estado de hidratación. En este paciente, si bien era esperable hallar drepanocitos en el frotis sanguíneo, se podría interpretar que al momento de la extracción sanguínea no estaba cercano a una crisis dolorosa, y en consecuencia no presentaba eritrocitos en hoz fácilmente observables.

La disminución del tamaño del bazo asociada a los antecedentes clínicos es un signo orientativo de la hemoglobinopatía, puesto que la estasis crónica por atrapamiento de células falciformes en los cordones y sinusoides esplénicos conlleva al infarto, fibrosis y encogimiento progresivo del órgano. Las imágenes osteoblásticas en huesos largos, cabeza femoral y acetábulos harían referencia a infartos óseos por oclusión vascular.

Está documentado que en los adultos, el tratamiento con HU no impide nuevos eventos cerebrovasculares o la progresión de infartos cerebrales silenciosos existentes en la asociación HbS/ $\beta$  tal<sup>13</sup>. Sin embargo, otros vinculan bajos niveles de HbF con complicaciones vaso oclusivas, daño a órganos y muerte temprana. La HU es uno de los agentes terapéuticos inductores de la síntesis de HbF, estimula precursores eritroides que conservan la capacidad de sintetizar la cadena  $\beta$  globina<sup>9, 14</sup>. Las reiteradas crisis dolorosas que refería el paciente, sumado a la probable falta de adherencia al tratamiento con HU, se podrían vincular con el bajo valor de HbF registrado (posiblemente asociada al haplotipo heredado)<sup>15</sup>. Estas particularidades le darían al propósito ciertas características clínicas de un cuadro homocigota de HbS.

Desde la herencia, es interesante destacar que ambos progenitores del propósito tuvieron que haber aportado un alelo mutado. Es decir, de acuerdo con los datos familiares aportados, en cada embarazo, las probabilidades de haber tenido un hijo con HbS/ $\beta$  tal fue del 25%. Ahora, desde la genética del propósito, su progenie será portador obligado de, al menos, una de las hemoglobinopatías.

Es importante ofrecer un adecuado asesoramiento genético. Frente a este hallazgo de relevancia sanitaria, es imprescindible contactar a la mayor cantidad posible de

familiares y, bajo consentimiento, proceder a evaluarlos y así predecir el curso de la enfermedad. De hecho, el diagnóstico temprano es necesario para reducir el riesgo de mortalidad precoz.

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

## Bibliografía

- Rossetti LC, Targovnik HM, Varela V. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin. *Haematologica* 2004; 88: 746-7.
- Bragós IM, Noguera NI, Morisoli L, Milani AC. Most frequent mutations of beta-thalassemia in Rosario, Argentina. *Haematologica* 2000; 85: 101-2.
- Vives Corrons JL. Hemoglobinopatías estructurales. En: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, (eds). *Hematología Clínica*. Madrid: Elsevier, 2007, p 223-45.
- Vives Corrons JL. Talasemias y síndromes talasémicos. En: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, (eds). *Hematología Clínica*. Madrid: Elsevier, 2007, p 247-72.
- Fortina P, Dotti G, Conant R, et al. Detection of the most common mutations causing beta-thalassemia in Mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *Genome Res* 1992; 2: 163-6.
- Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev* 2003; 17: 43-53.
- Zago MA, Silva Pinto AC. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29: 207-14.
- Abreu MS, Peñalver JA. Hemoglobinopatías en Argentina. *Medicina (B Aires)* 1992; 52: 341-6.
- Feliu Torres A, Eandi Eberle S, Sciuccati G, Bonduel M. Efecto de la hidroxiurea en hemoglobina S. *Medicina (B Aires)* 2003; 63: 140-2.
- Baruah MK, Saikia M, Baruah A. Pattern of hemoglobinopathies and thalassemias in upper Assam region of North Eastern India: high performance liquid chromatography studies in 9000 patients. *Indian J Pathol Microbiol* 2014; 57: 236-43.
- Khera R, Singh T, Khuana N, Gupta N, Dubey AP. HPLC in characterization of hemoglobin profile in thalassemia syndromes and hemoglobinopathies: a clinico hematological correlation. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015; 31: 110-5.
- A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias project. En: [http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query\\_vars3?mode=output&display\\_format=page&i=827](http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display_format=page&i=827); consultado el 19/06/16.
- Rigano P, Pecoraro A, Calvaruso G, Steinberg MH, Iannello S, Maggio A. Cerebrovascular events in sickle cell-beta thalassemia treated with hydroxyurea: A single center prospective survey in adult Italians. *Am J Hematol* 2013; 88: 261-4.
- Chalikiopoulou C, Tavianatou AG, Sgourou A, et al. Genomic variants in the ASS1 gene, involved in the nitric oxide biosynthesis and signaling pathway, predict hydroxyurea treatment efficacy in compound sickle cell disease/ $\beta$ -thalassemia patients. *Pharmacogenomics* 2016; 17: 393-403.
- Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 2011; 118: 19-27.

----

## LA TAPA

**Camilo Golgi (1843-1926).** Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal, compartieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1906, por primera vez se dividió el premio. En 1916 no hubo Premios Nobel, hubo la Gran Guerra. Según Cajal, Golgi, en su Conferencia al recibir el premio, “[...] hizo gala de una altivez y egolatría tan inmoderadas que produjeron deplorable efecto en la concurrencia. Ni por incidencia aludió a los casi innumerables trabajos neurológicos aparecidos fuera de Italia y aun en Italia misma, desde la remota fecha de su obra magna sobre la *finestructura del sistema nervioso*. [...]”. La lectura atenta de la conferencia de Golgi prueba que Cajal es injusto: Golgi alude a Cajal cuatro veces, lo elogia, no está de acuerdo con la teoría neuronal, es reticularista. La técnica de Golgi, la “*reazione nera*”, de 1873: fijación del tejido nervioso con bicromato de potasio e impregnación con nitrato de plata, hizo posible distinguir las neuronas, seguir axones y dendritas y sus conexiones, y hacer visible, con las modificaciones de Cajal, la “*struttura nascosta*” (estructura escondida) del sistema nervioso. Y “en reconocimiento de sus trabajos sobre la estructura del sistema nervioso”, fue que ambos recibieron el Premio Nobel.

Camilo Golgi nació en 1843. Estudió en la Universidad de Pavía, allí fue profesor y rector. En 1865 se recibió de médico con una tesis, dirigida por Cesare Lombroso (1835-1909), sobre la etiología de las enfermedades mentales, Mayor fue la influencia de Giulio Bizzozero (1846-1901), que se percibe en un artículo de 1869 sobre la estructura y desarrollo de los psamomas en dos tumores meníngeos. A éste le sigue, en 1870, un artículo sobre los “linfáticos” del cerebro. Su campo quedó definido. En 1886, en *Sulla fina anatomia degli organi centrale del sistema nervoso* expuso la suma de sus trabajos sobre el tema. La descripción del aparato reticular interno (aparato de Golgi) es de 1898. En los años siguientes estudió la malaria, la estructura renal, y la transfusión sanguínea en el peritoneo. Golgi fue prolífico en escritos y discípulos. Murió, jubilado, a los 83 años. (Ver: [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org); Ramón y Cajal S. Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica. Madrid: Alianza, 1995; Mazarrelo P. *La struttura nascosta. La vita di Camilo Golgi*. Bologna: Cisalpino, 1996).