

ESTUDIO DE HEMOGLOBINOPATÍAS

Empezaremos esta revisión hablando sobre la hemoglobina normal, las diferentes alteraciones en la hemoglobina y finalmente sobre los métodos diagnósticos con que cuenta CATLAB.

HEMOGLOBINA:

La molécula de hemoglobina (Hb) está formada por cuatro subunidades proteicas denominadas globinas y 4 grupos hemo. La naturaleza de las cadenas globínicas determina los diferentes tipos de hemoglobinas.

La HbA constituye aproximadamente el 98% de la totalidad del contenido hemoglobínico eritrocitario y está formada por dos cadenas α y dos cadenas β ($\alpha\beta_2$). El 2% restante está constituido por hemoglobina A2 (HbA₂) formada por dos cadenas α y dos cadenas δ ($\alpha\delta_2$) y hemoglobina fetal (HbF) formada por dos cadenas α y dos cadenas γ ($\alpha\gamma_2$).

Durante el desarrollo embrionario y fetal existen cuatro hemoglobinas principales: Hb Gower-1; Hb Gower-2; Hb Portland y HbF. Después del 2º mes de gestación las dos hemoglobinas Gower desaparecen. La Hb Portland puede prolongar su presencia hasta el nacimiento. La HbF representa alrededor del 80% del contenido hemoglobínico en el recién nacido. El declive en la síntesis de HbF es rápido en condiciones normales, de tal forma que a los seis meses de vida sólo se detecta un 5%. Sin embargo, existen fluctuaciones según los grupos étnicos.

La síntesis de la HbA comienza en el segundo mes de vida fetal y su progresión es rápida una vez que se ha producido el parto.

La HbA₂, comienza a sintetizarse en el tercer trimestre del embarazo y está presente en cantidades apenas perceptibles en el momento del nacimiento.

Se puede concluir que hacia la 40ª semana de vida extrauterina, el niño presenta ya los porcentajes hemoglobínicos propios del adulto.

Las hemoglobinas humanas están codificadas en dos grupos de genes estrechamente ligados: los genes de globina similar a α en el cromosoma 16, y los genes similares a β en el cromosoma 11. Las hemoglobinopatías congénitas obedecen a mutaciones en estos genes y sus consecuencias pueden ser:

- Síntesis de una Hb anómala, estructuralmente diferente a la Hb normal (Hemoglobinopatías estructurales).
- Disminución de la síntesis de la Hb normal (Talasemias)
- Ambos defectos simultáneamente (Hemoglobinopatías Talasémicas)
- Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF)

Catlab Informa

HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES:

En la actualidad se conocen más de 400, aunque no todas dan manifestaciones clínicas. Las hemoglobinopatías por afectación de la cadena β son algo más frecuentes que las de la α . Dependiendo de la situación más o menos periférica del aminoácido sustituido en relación con la conformación de la molécula de Hb, las hemoglobinopatías pueden clasificarse en:

- 1) Hemoglobinas con alteración de la solubilidad y su movilidad electroforética (Hb S, Hb C, Hb J, Hb D).
- 2) Hemoglobinas con alteración de la estabilidad (Hb Köln entre otras).
- 3) Hemoglobinas con alteración de la afinidad por el oxígeno (Hb Zurich, Hb Kansas).
- 4) Hemoglobinas que no consiguen mantener el hierro en estado reducido o metahemoglobinas o Hemoglobinas M (Hb Hyde Park).

1) Hemoglobinopatías con alteración de la solubilidad:

Hemoglobinopatía S

Constituye la hemoglobinopatía estructural más frecuente en el mundo.

Se produce por la sustitución del ácido glutámico por la valina en posición 6 de la cadena β . Esto origina que al descender la PO_2 la molécula de Hb cristalice, deformando los hematíes, volviéndolos falciformes y rígidos, e impidiendo su tránsito por los capilares pequeños.

Las personas con Hemoglobina S heterocigota (Hb AS) son asintomáticos (rasgo drepanocítico) y la morfología eritrocitaria es normal.

La Hemoglobina S homocigota (Hb SS) o anemia drepanocítica se caracteriza por una anemia hemolítica grave, que aparece a los pocos meses de nacer cuando la Hb S reemplaza a la Hb fetal. En los niños se encuentra esplenomegalia, que desaparece a medida que se producen infartos esplénicos (atrofia esplénica).

La anemia hemolítica es crónica, con valores de Hb que oscilan entre 6 y 8 gr/dl e intensa reticulocitosis. En el frotis de sangre se observan drepanocitos. La hemoglobina fetal en los homocigotos se encuentra elevada en proporción variable. Son frecuentes las crisis vasculares oclusivas por acumulación de drepanocitos.

La doble heterocigosis SC (Hb SC) produce un cuadro clínico menos grave que el de la hemoglobinopatía SS. El crecimiento y desarrollo son normales, la anemia es leve y las crisis vasculares escasas. Suele palparse esplenomegalia de pequeño tamaño. Sin embargo, la afectación retiniana es más grave secundaria a retinopatía proliferativa y hemorragias vítreas. También son más frecuentes los accidentes trombóticos.

Catlab Informa

La combinación Hb S-betatalasemia produce un cuadro clínico de inferior o igual gravedad al de la drepanocitosis. Esta anomalía es particularmente frecuente en Sicilia.

Hemoglobinopatía C

La Hb C se caracteriza por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 de la cadena β por lisina. Es propia del África occidental, pero puede encontrarse con cierta frecuencia en España. El estado homocigoto (Hb CC) se caracteriza por una ligera anemia hemolítica crónica con esplenomegalia. El estado heterocigoto (Hb AC) no produce trastorno alguno. Aunque la Hb C tiende a cristalizar en condiciones de hipoxia, no produce crisis vasoclusivas como las de la Hb S. La morfología eritrocitaria se caracteriza por la aparición de dianocitos.

Hemoglobinopatía J

Se caracteriza por la sustitución de la glicina en posición 16 de la cadena β por ácido aspártico. No produce ningún trastorno en estado heterocigoto. Endémica en Europa, la Hb J es relativamente frecuente en Cerdeña y puede encontrarse en España.

Hemoglobinopatía D

La Hb D no produce trastorno alguno en estado heterocigoto. El estado homocigoto, muy infrecuente, produce una discreta anemia hemolítica

2) Hemoglobinas inestables:

La mutación en este tipo de hemoglobinopatía consiste en un cambio de aminoácido en la zona de unión globina-hemo, produciendo desnaturalización y precipitación de las cadenas de globina.

Se transmiten con carácter autosómico dominante y cursan con un cuadro de anemia hemolítica crónica de intensidad variable. El grado de hemólisis depende del tipo de mutación y su efecto puede verse agudizado por factores diversos tales como la ingesta de ciertos medicamentos oxidantes (sulfamidas) o infecciones. La tinción con colorantes supravitales, da a los hematíes un aspecto característico, por lo que estas anemias se denominaban antiguamente anemias hemolíticas con cuerpos de Heinz positivos. Se conocen actualmente más de 100 Hb inestables.

3) Hemoglobinopatías con alteración de la afinidad por el O₂:

Se producen por mutaciones situadas a nivel de las áreas de contacto entre las subunidades α y β de la molécula de Hb o de la zona de unión del 2,3 DPG a la cadena β . De acuerdo con la naturaleza de la mutación pueden observarse aumentos (Hb Zurich) o disminuciones (Hb Kansas) de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, siendo las primeros mucho más

Catlab Informa

frecuentes que las segundos. Se heredan con carácter autosómico dominante, siendo la forma homocigota incompatible con la vida.

Las hemoglobinopatías con aumento de la afinidad por el oxígeno cursan clínicamente con poliglobulia de intensidad variable, mientras que las de baja afinidad por el oxígeno son asintomáticas, cursando a veces con cianosis ligera.

4) **Hemoglobinopatías M:**

Estas hemoglobinas se caracterizan por la presencia del hierro del hemo en estado férrico (Fe^{+++}) en vez de estar en estado ferroso (Fe^{++}). Son mutaciones que se caracterizan casi siempre por la sustitución de histidina por tirosina en la cavidad del hemo. La tirosina al estar unida al hierro estabiliza su forma oxidada e impide la unión reversible al oxígeno, perdiendo así su capacidad funcional, comportándose como metahemoglobina. De ahí el nombre de hemoglobinas M. La mutación puede afectar a la cadena α o β .

Se heredan con carácter autosómico dominante. Las personas heterocigotas presentan cianosis sin ningún otro trastorno. La cianosis es irreversible y no cede con la administración de sustancias reductoras (ácido ascórbico o azul de metileno). A menudo hay poliglobulia. Hasta el momento se han descrito cinco moléculas de estas Hb.

TALASEMIAS

Grupo heterogéneo cuya característica común es un defecto en la síntesis de una o varias de las cadenas de globina. Cada talasemia recibe el nombre de la cadena que deja de sintetizarse. Las más comunes son: 1) la β -talasemia; 2) la α -talasemia y 3) la $\delta\beta$ -talasemia. La disminución de la síntesis de las cadenas de globina provoca un desequilibrio entre cadenas alfa y beta, provocando una acumulación anormal de la globina excedente. Estos precipitados intracelulares son los responsables de la destrucción precoz de los eritroblastos y hematíes.

La herencia de la talasemia muestra un patrón autosómico dominante y su frecuencia dentro de la población mundial es muy elevada, presentando una distribución que se correlaciona con las zonas donde existe o ha existido paludismo endémico (cuenca mediterránea, África central, Sudeste asiático). En España, los estudios epidemiológicos más recientes han evidenciado una elevada incidencia de los síndromes talasémicos con distribución geográfica irregular y marcada heterogeneidad genotípica.

Catlab Informa

1) **β-Talasemia:**

Obedece a una disminución en la síntesis de cadenas β de globina. La mayoría de los casos de β -talasemia se deben a mutaciones genéticas que afectan posteriormente al funcionalismo del RNA.

La intensidad del déficit depende del grado de alteración genética y puede variar desde una síntesis deficiente o parcial hasta una ausencia total de síntesis. Basándose en ello, se clasifica clínicamente en 3 grandes grupos:

β-talasemia menor

Es la forma más frecuente de talasemia en nuestro medio. Se produce por una mutación del gen β en estado heterocigoto y se caracteriza por una pseudopolicitemia microcítica con anemia muy discreta o inexistente; con dianocitos y punteado basófilo en la extensión de sangre periférica; y aumento de la HbA₂. La HbF puede también aumentar hasta un 5%. Rara vez se aprecia esplenomegalia.

β-Talasemia mayor

Se caracteriza por una expresividad clínica variable, pero generalmente intensa. Su forma más grave es la anemia de Cooley que se inicia a partir de los 6 meses del nacimiento y se caracteriza por una intensa anemia, esplenomegalia, a veces gigante, y hepatomegalia. Además, alteraciones óseas, sobre todo en cráneo (cráneo en cepillo), configurando unos rasgos faciales característicos. El cuadro clínico se suele agravar por las complicaciones debidas a la sobrecarga férrica secundaria a las transfusiones y a la mayor absorción intestinal de hierro.

El perfil hematológico nos muestra una anemia intensa, microcítica e hipocrómica; y la morfología una intensa anisopoiquilocitosis, con hipocromía y abundante punteado basófilo. Es frecuente observar elementos inmaduros de la serie roja y los reticulocitos ligeramente aumentados, aunque nunca tanto como correspondería al grado de anemia y eritroblastosis medular.

β-Talasemia intermedia

La β -talasemia intermedia puede deberse a la herencia homocigota de formas benignas de β -talasemia, a la herencia heterocigota de alguna mutación β grave, a la coincidencia de una β -talasemia mayor con una α -talasemia, al estado homocigoto para la $\delta\beta$ -talasemia o a una alteración β homocigota pero contrarrestada por una síntesis alta de Hb F.

El cuadro clínico de la β -talasemia intermedia se caracteriza por una anemia de intensidad moderada, hemólisis crónica y esplenomegalia; cuya gravedad no alcanza nunca la de la enfermedad de Cooley.

Catlab Informa

2) α -Talasemia:

Son alteraciones debidas a la disminución total o parcial de cadenas α . El principal mecanismo por el que se producen las α -talasemias es la delección total de un gen. Las formas moleculares más frecuentes son la delección de 3,7 kb y la de 4,2 kb. La delección de 3,7 kb es especialmente frecuente en el área mediterránea y en la población americana de raza negra, mientras que la delección de 4,2 kb es más propia del sudeste asiático.

La expresividad clínica de la α -talasemia depende de la naturaleza de la delección:

α^+ -talasemia silente (α^+ -tal)

Delección de un único gen α . No presenta expresividad clínica ni biológica (portadores asintomáticos)

α^0 -talasemia menor (α^0 -tal)

Delección de dos genes α . Las manifestaciones clínicas son mínimas o nulas y en el hemograma aparece una discreta o moderada anemia con microcitosis y poliglobulia. La hiperferritinemia es infrecuente. Expresividad clínica superponible a la β -talasemia menor, aunque a diferencia de ésta, presenta una HbA2 normal o incluso disminuida (1,5-2,5 %) y nunca se observa aumento de HbF. Es la forma más común en el litoral mediterráneo.

Hemoglobinopatía H (Hb H)

Delección de tres genes α . Es frecuente en China e Indonesia y se han descrito también algunos casos en Italia, Sudamérica y en España. Cursan con un cuadro clínico de anemia hemolítica crónica de intensidad moderada, exacerbada por infecciones o por la ingesta de algunos medicamentos oxidantes. Además moderada esplenomegalia. Presenta una expresividad clínica superponible a la β -talasemia intermedia.

Su presencia se ha observado también asociada a retraso mental (mutación del gen ATR) o de forma adquirida en el curso de mielodisplasias y leucemias.

La incubación de la sangre con azul de cresilo brillante permite la observación de precipitados intraeritrocitarios (cuerpos de Heinz) mediante el microscopio óptico o electrónico.

Hemoglobina Bart's

Ausencia total de cadenas α . Produce Hydrops fetal y es incompatible con la vida.

3) $\delta\beta$ -Talasemia:

Se caracteriza por un defecto en la síntesis tanto de cadenas β como δ debido a amplias delecciones del cromosoma 11. En los homocigotos, la única Hb que se formará es la Hb F, mientras que en heterocigotos se

Catlab Informa

evidencia un aumento de la Hb F (hasta un 16-18%), pero las demás fracciones hemoglobínicas serán normales. Las manifestaciones clínicas del homocigoto suelen ser las de una talasemia intermedia, mientras que el estado heterocigoto no produce ninguna alteración clínica. La $\delta\beta$ -talasemia heterocigota es relativamente frecuente en la zona mediterránea de España, aunque menos que la β -talasemia. El hemograma de una $\delta\beta$ -talasemia heterocigota es superponible al de una β -talasemia heterocigota pero con una amplitud de distribución eritrocitaria (RDW) mucho más alta.

HEMOGLOBINOPATÍAS TALASÉMICAS:

Existen mutaciones de los genes de globina que, además de producir una disminución en la síntesis de cadenas globínicas, son responsables de alteraciones estructurales. Entre ellas destacan como más frecuentes la HbE, la Hb Lepore, hemoglobinopatías con alargamiento de la cadena de globina (Hb Constant Spring, Hb Tak) y hemoglobinopatías con cadenas de globina muy inestables (Hb Showa-Yakushiji, Hb Houston, Hb Geneva, Hb Quong Sze, Hb Suan Dok, Hb Petah, Hb Lleida, Hb Clinic).

Hemoglobina E (Hb E)

Es el resultado de la sustitución de un ácido glutamínico en posición 26 por la lisina en la cadena β que se manifiesta por un defecto en la maduración del RNAm y disminución en la síntesis de cadenas de β -globina. Hemoglobinopatía prácticamente limitada al sudeste asiático y su expresividad clínica es superponible a la β -talasemia menor: los heterocigotos sólo presentan microcitosis y los homocigotos se caracterizan por un grado mayor de microcitosis y una ligera anemia. Cuando la Hb E se asocia a un gen β -talasémico, la expresividad clínica es de una β -talasemia intermedia.

Hemoglobina Lepore (Hb Lepore)

En esta hemoglobinopatía, existe un crossing-over con intercambio de material genético y formación de un gen híbrido $\delta\beta$. Este gen codifica una cadena globínica híbrida constituida por un fragmento δ y uno β . Debido a ello, además del cromosoma Lepore en el que el gen β ha sido sustituido por el gen híbrido $\delta\beta$, se forma un cromosoma anti-Lepore en el que el gen híbrido coexiste con los genes δ y β normales.

Dado que el crossing-over puede producirse en diferentes lugares, existen varios tipos de Hb Lepore (Boston, Baltimore y Hollandia). La variante más frecuente es la Hb Lepore Boston, cuya incidencia parece ser especialmente elevada en determinadas áreas geográficas de Italia y centro de Europa.

El comportamiento clínico es superponible al de una β -talasemia, así el estado heterocigoto se comporta como una β -talasemia menor pero sin aumento de HbA₂ ni de la HbF. El estado homocigoto suele presentar características clínicas de una talasemia mayor.

Catlab Informa

PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL (PHHF):

Se caracteriza por la síntesis de HbF durante la vida adulta.

Se han descrito diversas formas clínicas:

PHHF Pancelular, preferentemente en individuos de raza negra y oriundos de Grecia. La PHHF de la raza negra es totalmente asintomática en cualquiera de sus formas homocigota o heterocigota. Los individuos heterocigotos presentan valores elevados de HbF y (17 a 30%) y disminución de la HbA₂. El VCM y HCM se hallan muy ligeramente disminuidos y en ocasiones pueden apreciarse dianocitos circulantes. En el estado homocigoto se ha descrito algún caso con

esplenomegalia, reticulocitosis y eliptocitosis, aunque en la mayoría de casos existe moderada poliglobulia, con disminución del VCM y HCM.

La forma PHHF griega heterocigota presenta valores de HbF inferiores a los del a PHHF de la raza negra.

PHHF Heterocelular, donde la distribución HbF eritrocitaria es irregular. Las variantes mejor estudiadas son la suiza y británica. El porcentaje de HbF tanto en el estado homocigoto como en el heterocigoto no llega a superar el 15% y en ningún caso de acompaña de anemia ni de alteraciones clínicas o hematológicas.

ESTUDIO DE HEMOGLOBINOPATÍAS CATLAB:

Las técnicas empleadas en el estudio de las hemoglobinas son muy diversas y van desde la simple observación de la morfología eritrocitaria al análisis genético mediante técnicas de biología molecular y secuenciación. Nuestro laboratorio cuenta con los siguientes equipos para el estudio de hemoglobinopatías:

- Hemogramas: Analizadores Sysmex XN®
- Hb glicosiladas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): Analizador D-100 Bio-Rad®
- HbA₂ y Hb fetal por HPLC: Analizador D-10 Bio-Rad®
- Electroforesis alcalina: Hidrasys®
- Extracción de Ac. Nucléicos: Qiacube
- Estudio molecular de alfa talasemia: kit Strip assay alpha globin.

Además el laboratorio cuenta con 3 especialistas en Hematología para el estudio morfológico de sangre periférica e interpretación de los resultados obtenidos.

En CATLAB, los estudios de hemoglobinopatías se generan a partir de 3 tipos de muestras:

- 1) de estudios de Hb glicosilada (HbA_{1c}) en los que se detecta un pico de Hb variante.
- 2) de hemogramas con microcitosis (VCM<75) procedentes de rutina o de estudios de anemia, a los que previamente se ha descartado ferropenia.

Catlab Informa

3) de las solicitudes de HbA₂, HbF, electroforesis y estudios moleculares de α -talasemia realizadas por los clínicos. Aquí los especialistas realizan previamente un cribado revisando el histórico de resultados, la morfología y la ferritinemia; esto para evitar pruebas innecesarias, sobre todo aquellas que son costosas o requieren mucha dedicación.

A las muestras con microcitosis sin ferropenia y a los estudios solicitados por los clínicos se les realiza primero una determinación de HbA₂ y HbF por HPLC para diagnosticar β -Talasemias, $\delta\beta$ -talasemias y descartar la presencia de una banda de Hb variante. Las muestras con resultados dentro de la normalidad y que son muy sospechosas de talasemias, se les añade estudio molecular de α -talasemia. A las muestras que se les ha detectado un pico de Hb variante por

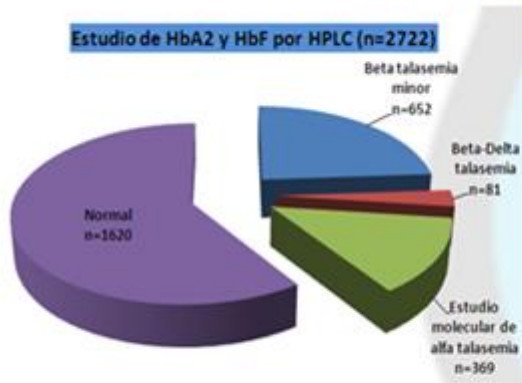
HPLC, ya sea en estudio de HbA_{1c} o de HbA₂ y HbF, se les realiza una electroforesis alcalina para diagnosticar las hemoglobinopatías estructurales más frecuentes.

Los resultados que no son concluyentes pero se sospecha la presencia de una hemoglobinopatía, se envían a nuestro centro de referencia (Hospital Universitari Vall d'Hebron) para realización de electroforesis ácida y secuenciación en caso necesario.

A continuación presentamos los resultados obtenidos los 4 últimos años con esta metodología de trabajo, donde además de detectar las hemoglobinopatías prevalentes para nuestra área geográfica, hemos podido identificar hemoglobinopatías poco frecuentes y de 2 hemoglobinopatías no descritas anteriormente. Una se ha registrado con el nombre de Hb Vall d'Hebron y la otra está pendiente de registrar.

Catlab Informa

HEMOGLOBINOPATÍAS DIAGNOSTICADA EN CATLAB ENERO 2011 A DICIEMBRE 2014



Electroforesis Alcalinas	426
HbAS	221
HbSS	8
HbAC	100
HbCC	3
HbSC	3

Estudios moleculares de alfa talasemia	369
Delección 3.7 Kb homocigoto	94
Delección 3.7 Kb heterocigoto	91
Doble del(-SEA) heterocigoto	5
Doble del(-SEA) homocigoto + mutación puntual en el codón 125 del gen $\alpha 2$ (Hb Quong Sze) en hemicigosis.	1
Doble del.3.7Kb/4.2kb	5
Del. $\alpha 2$ IVS1 5nt heterocigoto	11
Del. 3.7Kb heterocigoto/del. $\alpha 2$ polyA-1 hemicigoto	1
Del. 3.7Kb heterocigoto/del. $\alpha 2$ IVS1 hemicigoto	2
Doble del. 20.5Kb heterocigoto	1
Triplicación anti-3.7Kb	4
Wild type	154

Estudios Centro de referencia	34
HbAD	10
HbAJ	5
HB Hope het	4
Hb Lepore het	5
Hb Lansing	1
HbS/beta talasemia	2
Hb Roane/Siriraj	1
Hb G Philadelphia het	1
Doble heterocigoto Hb G Philadelphia/HbS	1
Hb O Arab het	1
Hb Arlington Park	1
Hb Vall d'Hebron	1
Hb pendiente de registrar	1

Jorge Medina
Hematología
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 5038
jmedina@catlab.cat
www.catlab.cat

Nerea Ramos
Hematología
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038
nramos@catlab.cat
www.catlab.cat

Catlab Informa

Teresa Villalba

Responsable Hematologia

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 / 660.67.63.01

tvillalba@catlab.cat

www.catlab.cat

BIBLIOGRAFIA:

1. J. L. Vives Corrons. Hemoglobinopatías estructurales. En: J. Sans-Sabrafen. Hematología Clínica. Quinta edición.
2. J. L. Vives Corrons. Talasemias y síndromes talasémicos. En: J. Sans-Sabrafen. Hematología Clínica. Quinta edición.
3. J. J. Malcora. Hemoglobinopatías y talasemias. BSCP Can Ped 2001; 25- nº 2.
4. C. Sillero, M. Ruiz, M. Sanchez. Hemoglobinopatías y talasemias. Diagnóstico por el laboratorio. FESITESS Andalucía. 2012.