

Reconocimiento a la trayectoria de la Prof. Dra. Nilda Fink

Bases moleculares de hemoglobinopatías en Argentina*

Molecular basis of hemoglobinopathies in Argentina

Bases moleculares de hemoglobinopatias na Argentina

► Karen Gabriela Scheps^{1,a}, Viviana Varela^{2,a}

¹ Dra. de la Universidad de Buenos Aires, Área Biología Molecular.

² Dra. de la Universidad de Buenos Aires, Área Biología Molecular. Profesora Adjunta de la Cátedra de Genética. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

^a Universidad de Buenos Aires, Cátedra de Genética, INIGEM, Facultad de Farmacia y Bioquímica, CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Subcomisión de Eritropatías, Sociedad Argentina de Hematología.

Resumen

Durante el desarrollo de un individuo se expresan distintas cadenas de globina de tipo α y no- α , que se combinan en tetrámeros para formar hemoglobina. Los genes que las codifican se organizan en familias. Distintas mutaciones afectan los genes que codifican las cadenas de globina: si provocan alteraciones cualitativas originan cuadros de hemoglobinopatías estructurales, si disminuyen las síntesis de las cadenas de globina, talasemias, y si tienen ambos efectos, hemoglobinopatías talasémicas. El propósito de este trabajo es presentar las bases moleculares de las hemoglobinopatías en Argentina, en un total de 862 muestras, en base a los estudios moleculares realizados en este laboratorio a partir del estudio de 910 muestras de pacientes. En nuestro medio, la Hb S es la hemoglobinopatía estructural más frecuente, las β -talasemias presentan una distribución similar a la cuenca del Mediterráneo y las α -talasemias están intrínsecamente relacionadas a la ascendencia de los afectados. Las bases moleculares de las hemoglobinopatías son variadas. Mientras que en las hemoglobinopatías estructurales y β -talasemias predominan las mutaciones puntuales, en las α -talasemias predominan las deleciones. Se describen mutaciones noveles (cambios puntuales, deleciones y duplicaciones) que se presentan como eventos aislados con herencia recesiva o dominante. Es necesaria la interacción entre el médico hematólogo, el laboratorio bioquímico, el laboratorio molecular y el médico genetista, para llegar al diagnóstico certero de estos cuadros que permitirán reducir la incidencia de las formas severas.

Palabras clave: hemoglobina * variantes estructurales * β -talasemia * α -talasemia * genética

Abstract

Functional hemoglobin is a tetramer composed of 2 α and 2 non- α chains, encoded by genes that are organized in clusters and are expressed sequentially through development. There are multiple mutations described that affect these genes: if the sequence variant leads to a qualitative alteration, the resulting effect is a structural hemoglobinopathy, if it decreases the synthesis of the globin chains, thalassemia, and if it affects both the quality and quantity of

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

the globin chain, the consequence is a thallemic hemoglobinopathy. The aim of this paper is to present the molecular bases of hemoglobinopathies in Argentina, determined in 862 patients, based on the results of the molecular studies carried out in our laboratory from the analysis of 910 samples. Hb S is the most frequent structural hemoglobinopathy, β -thalassemia mutations exhibit a pattern similar to the one displayed by Mediterranean basin populations, and α -thalassemia mutations are intrinsically related to the ancestry of those affected. These syndromes exhibit diverse molecular bases: structural hemoglobinopathies and β -thalassemia are a consequence, mostly of point mutations, whereas in α -thalassemia deletions prevail. Novel mutations (point changes, deletions and duplications) that occurred as isolated events, with recessive or dominant inheritance, were described. Interaction between the hematologist, the geneticist and both the clinical and molecular biology laboratories is necessary to reach an accurate diagnosis of these syndromes and reduce the incidence of severe forms.

Keywords: hemoglobin * structural variants * β -thalassemia * α -thalassemia * genetics

Resumo

Durante o desenvolvemento de un individuo expresan-se diversas cadeias de globina de tipo α e não- α , que se combinan en tetrámeros para formar hemoglobina. Os genes que as codifican son organizados en familias. Diferentes mutacións afectan os genes que codifican as cadeias de globina: se provocaren alteracións cualitativas orixinan cuadros de hemoglobinopatías estruturais, se diminuíren as sínteses das cadeias de globina, talassemias, e se tiveren ambos os efectos, hemoglobinopatías talassémicas. O propósito deste traballo é presentar as bases moleculares das hemoglobinopatías na Argentina, num total de 862 amostras, com base nos estudos moleculares realizados neste laboratorio a partir do estudo de 910 amostras de pacientes. No noso medio, a Hb S é a hemoglobinopatía estrutural mais frecuente, as β -talassemias presentan una distribución similar á bacia do Mediterráneo e as α -talassemias están intrinsecamente relacionadas com a ascendencia dos afectados. As bases moleculares das hemoglobinopatías son variadas. Enquanto nas hemoglobinopatías estruturais e β -talassemias predominan as mutacións puntuais, nas α -talassemias predominan as deleções. Descrevem-se mutacións incipientes (mudanças puntuais, deleções e duplicações) que se presentan como eventos isolados com herança recessiva ou dominante. É necessária a interacción entre o médico hematólogo, o laboratorio bioquímico, o laboratorio molecular e o médico geneticista, para chegar ao diagnóstico certo desses cuadros que permitirán reducir a incidencia das formas severas.

Palavras-chave: hemoglobina * variantes estruturais * β -talassemia * α -talassemia * genética

Introducción

Los desórdenes hereditarios que comprometen la síntesis de la hemoglobina (Hb) representan el grupo más común de alteraciones genéticas que afectan una sola copia de un gen: se estima que nacen más de 350.000 afectados por año (1) y que al menos el 5,2% de la población mundial es portadora de alguna variante de importancia clínica. Las hemoglobinopatías representan, además, el 3,4% de las muertes en niños menores de 5 años (2).

Los genes que codifican para las cadenas de las distintas Hbs que se observan a lo largo del desarrollo de un individuo, presentan una organización típica de genes eucariotas y poseen una estructura general similar, donde la secuencia codificante está repartida en tres exones.

Los genes están agrupados en familias (*clusters*) multigénicas (familia de β -globina y de α -globina).

La familia de los genes de β -globina se ubica en el brazo pequeño del cromosoma 11 (11p15.5); son relativamente pequeños (aproximadamente 1.500 pb), y

codifican cadenas de globina funcionales de 146 aminoácidos.

El orden de los genes en el *cluster* en dirección 5' a 3' es: *HBE1-HBG2-HBG1-HBBP-HBD-HBB* (3).

La expresión de los genes de la familia está regulada por la presencia de elementos reguladores en *cis*, proximales y distales. El *locus* de la región de control (*Locus Control Region*, LCR), es un elemento regulador distal, que se ubica aproximadamente de 6 a 20 kb corriente arriba de *HBE1* y es necesario para que haya alta eficiencia transcripcional de los genes. En este *cluster* se producen 2 eventos de *switch* (eventos de "apagado" y "prendido" de genes) durante el desarrollo (4).

La familia de los genes de α -globina se ubica en la región subtelomérica del brazo pequeño del cromosoma 16 (16p13.3). Al igual que los genes que codifican para cadenas tipo β , son pequeños (aproximadamente 1.500 pb), y codifican cadenas de globina funcionales de 141 aminoácidos.

El orden de los genes en dirección 5' a 3', es: *HBZ-HBZP-HBM-HBAP1-HBA2-HBA1-HBQ1* (3).

Los genes *HBA2* y *HBA1* surgieron de una duplicación ancestral, por lo que son idénticos en la secuencia codificante. Existen pequeñas diferencias a nivel del intrón 2 y difieren en mayor grado en las regiones 3' UTR (5).

Al igual que los genes de la familia de β -globina, los genes de esta familia que se expresan durante la ontogenia se encuentran sujetos a regulación por elementos en *cis* distales y proximales (6) (7). Existe un solo evento de *switch*, con el "apagado" del gen *HBZ* y el "encendido" de los genes *HBA2* y *HBA1*.

A pesar que ambos genes *HBA* se expresan a partir de secuencias promotoras de alta homología y codifican para proteínas idénticas, *HBA2* se expresa 2-3 veces más que *HBA1* (8).

ALTERACIONES GENÉTICAS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE Hb

Actualmente hay más de 1.700 variantes de secuencia reportadas en las bases de datos *Hb Var database* (1.719) (9) e *Ithanel* (1.998) (10) que se asocian con este grupo de síndromes, clasificados por su modo de herencia como autosómicos recesivos (esporádicamente se describieron mutaciones con herencia dominante). Desde el punto de vista de la calidad y cantidad de Hb sintetizada como consecuencia de estos cambios, los desórdenes resultantes, a grandes rasgos, pueden dividirse en 3 grupos:

- Hemoglobinopatías estructurales: En presencia de una mutación, se sintetizan proteínas estructuralmente anómalas. Hay descritas más de 1.100 variantes y la Hb S (*HBB:c.20A>T*) es la más frecuente a nivel global.
- Talasemias: La mutación determina una menor producción (o ausencia) de la proteína mutada. Las más frecuentes son las α o β -talasemias (tal) (hay descritas más de 480 variantes). Existen otras variantes menos frecuentes producto de deleciones que dan origen a δ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ y $\epsilon\gamma\delta\beta$ -tal con distinta importancia clínica (11).
- Hemoglobinopatías talasémicas: Como efecto de estas mutaciones se sintetizan cadenas de globinas estructuralmente anómalas y en cantidad inferior a la normal. Al presente hay más de 100 variantes identificadas con bases moleculares heterogéneas.

Existen también síndromes de sobreexpresión, como la persistencia hereditaria de Hb fetal o alelos con copias extra de genes *HBA*, que por sí mismos no presentan efectos dañinos para los portadores, pero sí son capaces de modular el curso clínico cuando se asocian a otras hemoglobinopatías.

Las hemoglobinopatías tuvieron origen en regiones tropicales y se han distribuido a todo el mundo por las migraciones. No hay registro de hemoglobinopatías es-

tructurales en el territorio americano en la era precolombina (12). Las mutaciones se introdujeron a partir de distintas corrientes migratorias de Europa occidental, desde el siglo XVI y por el tráfico de esclavos de África occidental a fines del siglo XVI.

En función del perfil migratorio en Argentina y de estudios de laboratorios, se podría afirmar que, hasta el presente, la β -tal es más frecuente que las formas clínicamente relevantes de alfa talasemia en este país (13).

Debe tenerse en cuenta que no existen marcadores clínicos o hematológicos que confirmen la α -tal. Sólo se confirma por diagnóstico molecular, y por ende, la información reportada en nuestro medio surge de estudios moleculares para pesquisar los portadores y afectados (14) (15).

El propósito de este trabajo es presentar las bases moleculares de las hemoglobinopatías en Argentina, en base a los resultados de estudios moleculares realizados en este laboratorio desde 1997 a 2016.

Materiales y Métodos

En este trabajo se presenta la distribución de mutaciones para las distintas hemoglobinopatías. Se realizaron más de 1.000 ensayos de diagnóstico molecular (muchas muestras se analizaron por más de una estrategia diagnóstica) a partir del estudio de 910 muestras de pacientes. Todos los pacientes fueron informados con consentimientos redactados acorde a la Declaración de Helsinki. Según el fenotipo hematológico, se clasificaron en 5 grandes grupos:

- 1) compatible con la existencia de una hemoglobinopatía estructural
- 2) β -talasemia
- 3) $\delta\beta$ -talasemia
- 4) α -talasemia
- 5) fenotipos no clásicos, dentro de los cuales se incluyeron individuos que presentaron combinaciones de mutaciones correspondientes a los distintos grupos y a pacientes con diagnóstico clínico de tal intermedia.

Se obtuvieron además, muestras de 100 individuos con índices hematimétricos normales, que se usaron como población control de genoma normal, para confirmar la ausencia de nuevas variantes identificadas.

Los pacientes provinieron en su mayoría de la Capital Federal y Gran Buenos Aires, y en menor proporción del interior del país, y fueron evaluados previamente por reconocidos especialistas en hematología de nuestro medio, lo que permitió la orientación en la estrategia diagnóstica utilizada en cada caso.

Se purificó el ADN genómico de leucocitos de sangre periférica por el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (16).

Las mutaciones puntuales se tipificaron por PCR-RFLP y PCR-secuenciación (12) (15). Las mutaciones previamente no descritas se caracterizaron por clonado y secuenciación (17). Las deleciones e inserciones se tipificaron por Southern Blot, PCR-GAP y *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) (15). Las muestras de 4 pacientes, en los que se sospechaba la presencia de grandes deleciones que excedían la región de la familia de genes de α -globina o duplicaciones de la familia (según resultados obtenidos por MLPA), se estudiaron por *Array CGH* (18).

La información sobre las mutaciones estudiadas se obtuvo a partir de las bases de datos *HbVar Database* (9) e *Ithanel* (10) y de GenBank se tomó la secuencia normal de referencia de los genes (HBA: NC_000016.10 y HBB: NC_000011.10).

Resultados

Las bases moleculares detectadas son variadas, y se describirán por grupo de alteraciones. Los porcentajes están calculados en base al número de familias (alelos genéticamente no relacionados).

BASES MOLECULARES DE HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

Las variantes estructurales se originan por mutaciones pequeñas, en general mutaciones de cambio de sentido de un codón o pequeñas inserciones o deleciones que no generan codones de *stop* de síntesis proteica prematuros. La clínica es muy variable y está relacionada al efecto que la mutación produce sobre la estructura de la cadena de globina mutada.

En este estudio (sobre un total de 92 familias tipificadas) 89 (96,74%) presentaron mutaciones en el gen *HBB*: prevalece la Hb S (*HBB*:c.20A>T;p.Glu6Val), que se detectó tanto en heterocigosis como en homocigosis y en doble heterocigosis con mutaciones β -tal, $\delta\beta^0$ -tal y con otras variantes estructurales, dando lugar a síndromes falciformes. La segunda variante estructural en frecuencia, resultó la Hb C (*HBB*:c.19G>A;p.Glu6Lys) presente en 12 familias (13,04%), seguida de la Hb D-Punjab o Hb D-Los Angeles (*HBB*:c.364G>C;p.Glu121Gln) presente en 3 familias (3,26%). Se detectaron, de manera esporádica: Hb E (*HBB*:c.79G>A;p.Glu26Lys) en una familia de ascendencia mediterránea; variantes de secuencia que originaron Hbs inestables, Hbs con afinidad aumentada por el O₂ y meta-hemoglobinemias atribuibles a Hb M.

En la Tabla I se enumeran los genotipos caracterizados en el laboratorio a partir del estudio de 113 pacientes (92 familias).

Sólo se detectaron 3 familias (3,26%) con variantes estructurales en los genes que codifican las cadenas de α -globina (*HBA1* y *HBA2*).

BASES MOLECULARES DE β -TALASEMIA

El efecto fenotípico de cada mutación varía, desde las mutaciones tipo β^0 , donde no se producen cadenas de β -globina a partir del alelo mutado, a distintos tipos de mutaciones tipo β^+ , donde se producirá algo de cadenas normales a partir del alelo mutado y la severidad de la mutación estará estrictamente relacionada con la cantidad de proteína normal remanente. Los cuadros clínicos severos corresponden a pacientes con tal mayor, donde ambas copias del gen *HBB* (de origen paterno y materno) están mutadas. Los genotipos de estos pacientes son homocigotas (ambos alelos presentan la misma mutación) o dobles heterocigotas (la mutación de origen paterno es diferente a la de origen materno). Los individuos con tal menor son portadores (genotipo heterocigota). Existen fenotipos intermedios (tal intermedias) con manifestaciones clínicas marcadas, aunque sin un requerimiento transfusional periódico. Las bases moleculares de las tal intermedias son complejas: los afectados presentan al menos una mutación β -tal y algún factor que acentúa el desbalance de cadenas α / no α ; en nuestro medio, la asociación de una mutación β -tal heterocigota con un alelo triple α (genotipo $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$), es la causa prevalente de tal intermedia. Durante el desarrollo de la tesis doctoral de la Dra. Scheps, sobre un total de 16 familias analizadas, 6 presentaron 2 mutaciones β -tal, 8 presentaron la asociación de una mutación β -tal en asociación de un alelo $\alpha\alpha\alpha$ y 2 en asociación con una duplicación del *cluster* α .

A partir de estudios de diagnóstico molecular realizados en este laboratorio, sobre un total de 576 individuos heterocigotas (470 familias), se obtuvieron los datos de frecuencias de mutaciones que se presentan en la Tabla II. El perfil de mutaciones β -tal en nuestra población coincide con lo descrito en la literatura para otras poblaciones en las que un pequeño grupo de mutaciones son frecuentes y un grupo heterogéneo de mutaciones se presentan en forma esporádica. En este estudio, 6 mutaciones corresponden al 89,7% de los alelos presentes en nuestra población y 22 mutaciones se observaron con presentación esporádica.

Las mutaciones más frecuentes en nuestro entorno coinciden con las reportadas en la cuenca del Mediterráneo: La mutación Codón 39 es la más frecuente (40% de las familias afectadas).

La mayoría de las mutaciones β -tal presentan herencia autosómica recesiva, pero en la población analizada se caracterizaron 4 mutaciones que cursaron como cuadros de tal dominante. En todos los casos se trataron de mutaciones que dan lugar a hemoglobinopatías talasémicas, al conducir a síntesis de cadenas de globina hiperinestables: Hb Durham-N.C. o Hb Brescia (*HBB*:c.344T>C;p.Leu114Pro), descrita por primera vez en una familia argentina de ascendencia árabe, y 3 mutaciones que se originaron en eventos mutacionales *de novo*: Hb Wilde

Mutaciones en el gen HBB			
Genotipo	N° de pacientes	N° de familias	(%)
Síndromes Falciformes y portadores de Hb S			69,57
Hb S / Hb A	48	45	
Hb S / Hb S	14		
Hb S / β -tal	13	12	
Hb S / $\delta\beta$ -tal	1	1	
Hb S / Hb D-Punjab	3	2	
Hb S / Hb C	3	3	
Hb S / Hbpatía. talasémica	1	1	
Hb E			1,09
Hb E / Hb A	2	1	
Hb C			13,04
Hb C / Hb A	11	11	
Hb C / Hb C	1		
Hb C / β -tal	1	1	
Hb D-Punjab o D-Los Ángeles			3,26
Hb D-Punjab / Hb A	3	3	
Hbs inestables			6,52
Hb Saint-Etienne (Hb Istanbul) / Hb A	2	2	
Hb Tacoma / Hb A	1	1	
Hb Agenogi / Hb A	1	1	
Hb Redondo / Hb A	1	1	
Hb Showa-Yakushiji / Hb A	1	1	
Hbs con afinidad incrementada por el O ₂			2,17
Hb Southampton / Hb A	1	1	
Hb Regina / Hb A	1	1	
Meta-hemoglobinemias atribuibles a Hb M			1,09
Hb M-Saskatoon / Hb A	1	1	
Mutaciones en los genes HBA2 y HBA1			
Genotipo	N° de pacientes	N° de familias	
Hb Torino / Hb A	1	1	
Hb I-Interlaken / Hb A	1	1	
Hb Riccarton / Hb A	1	1	
Totales	113	92	

Tabla I. Hemoglobinopatías Estructurales: Perfil de genotipos caracterizados. Se indican los porcentajes (%) de las variantes en HBB, calculadas en base al número de familias.

(HBB:c.270_273delTGAG;p.Glu90Cysfs*67) y Hb Patagonia (HBB:c.296_297dupGT;p.Asp99Trpfs*59), con modificación del marco de lectura, que darían lugar a variantes elongadas inestables de 155 y 157 aminoácidos respectivamente (según los resultados obtenidos por análisis bioinformáticos) (19) y la Hb Tavapy (HBB:c.182_187delCTCATG; p.Val60_Lys61del) donde, la

deleción de 2 aminoácidos (según análisis bioinformáticos), provoca severos efectos en el bolsillo del hemo, por su cercanía con la histidina distal (H63) (20).

Los portadores, a pesar de tener genotipos heterocigotas, presentaron cursos clínicos severos, con espectro de tal intermedia a tal mayor, con requerimiento transfusional periódico.

Mutaciones	Nomenclatura HGVS	Tipo	Pacientes	Familias	(%)
Cod 39 (C>G)	HBB:c.118C>T	β^0	235	188	40,0
Int 1-110 (G>A)	HBB:c.93-21G>A	β^+	117	94	20,0
Int 1-1 (G>A)	HBB:c.92+1G>A	β^0	56	46	9,9
Int 1-6 (T>C)	HBB:c.92+6T>C	β^+	53	50	10,7
Int 2-1 (G>A)	HBB:c.315+1G>A	β^0	27	18	3,9
Int 2-745 (C>G)	HBB:c.316-106C>G	β^+	24	23	4,9
(-87) (C>G)	HBB:c.-137C>G	β^+	7	7	1,5
(-56) (G>C)	HBB:c.-106G>C	β^+	1	1	0,2
Cod 6 (-A)	HBB:c.20delA	β^0	9	8	1,7
Cod 8/9 (+G)	HBB:c.27_28insG	β^0	2	1	0,2
Cod 11 (-T)	HBB:c.36delT	β^0	1	1	0,2
Cod 15 (G>A)	HBB:c.48G>A	β^0	2	1	0,2
Cod 29 (C>T)	HBB:c.90C>T	β^+	2	2	0,4
Cod 30 (G>C)	HBB:c.92G>C	β^0	2	2	0,4
Int 1-2 (T>A)	HBB:c.92+2T>A	β^0	1	1	0,2
Int 1-5 (G>C)	HBB:c.92+5G>C	β^+	2	2	0,4
Cod 41/42 (delCTTT)	HBB:c.126_129delCTTT	β^0	1	1	0,2
Cod 44 (-C)	HBB:c.135delC	β^0	3	2	0,4
Int 2-654 (C>T)	HBB:c.316-197C>T	β^+	1	1	0,2
Int 2-705 (T>G)	HBB:c.316-146T>G	β^+	1	1	0,2
Int 2-726 (A>G)	HBB:c.316-125A>G	β^+	1	1	0,2
c.*96T>C	HBB:c.*96T>C	β^+	2	1	0,2
Hb Durhan N.C.	HBB:c.344T>C	$\beta^{\text{dominante}}$	2	1	0,2
Hb Wilde	HBB:c.270_273delTGAG	$\beta^{\text{dominante}}$	1	1	0,2
Hb Patagonia	HBB:c.296_297dupGT	$\beta^{\text{dominante}}$	1	1	0,2
Hb Tavapy	HBB:c.182_187delCTCATG	$\beta^{\text{dominante}}$	1	1	0,2
$\delta\beta^0$ var. Siciliana	NG_000007.3:g.64336_77738del13403	$\delta\beta^0$	16	12	2,6
$\delta\beta^0$ var. no tipificada	-	$\delta\beta^0$	5	2	0,4
Totales			576	470	100,0

Tabla II. β -talasemia: Frecuencias de las mutaciones; en el apartado superior se indican las mutaciones más frecuentes; Nomenclatura HGVS: Nomenclatura recomendada según normas de la Human Genome Variation Society.

BASES MOLECULARES DE α -TALASEMIA

En la Tabla III se resumen los datos obtenidos, en nuestro laboratorio, a partir del diagnóstico molecular de 173 individuos correspondientes a 151 familias de nuestro medio.

La delección $-\alpha^{3,7}$ presentó la mayor frecuencia, coincidiendo con lo reportado en la bibliografía a nivel mundial (21), siendo la principal responsable tanto del fenotipo "portador silente" (genotipo $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) como del "rasgo talasémico" (genotipo $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$).

Se encontraron distintas mutaciones α^0 en estado

heterocigota (genotipo $-\alpha/\alpha$): en pacientes con ascendencia mediterránea la delección-^{MEDI} resultó ser la más frecuente seguida de las delecciones $-(\alpha)^{20,5}$ y $-\text{CAL}$, característica en poblaciones del sur de Italia. Las delecciones $-\text{SEA}$ y $-\text{FIL}$ se tipificaron exclusivamente en pacientes de origen asiático.

Se tipificaron 4 pacientes con enfermedad de Hb H (genotipo $-\alpha/-$); en todos, el alelo tipo α^+ , correspondió a la delección $-\alpha^{3,7}$: en 2 pacientes, esta mutación estaba asociada a la mutación $-\text{MEDI}$; en los 2 restantes, una mujer adulta y un paciente pediátrico con discapacidad intelectual, se caracterizaron grandes delecciones que

Genotipo	Pacientes	Familias	(%)
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	91	109	72,2
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	31		
$--MED1/\alpha\alpha$	13	11	7,3
$-(\alpha)^{20,5}/\alpha\alpha$	5	3	2,0
$--CAL^{(*)}/\alpha\alpha$	5	4	2,6
$--SEA/\alpha\alpha$	8	6	4,0
$--FIL/\alpha\alpha$	2	1	0,7
Deleción-- $BA^{(*)1}/\alpha\alpha$	1	1	0,7
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$; Deleción HS-40 ^(*)	1	1	0,7
$--MED1/-\alpha^{3,7}$	2	2	1,3
$--^{(*)2}/-\alpha^{3,7}$	2	2	1,3
$\alpha^M/\alpha\alpha$	8	8	5,3
$\alpha\alpha^M/\alpha\alpha$	5	3	2,0
Totales	173	151	100

Tabla III. α -talasemia: Distribución de los genotipos diagnosticados en este laboratorio. Las deleciones indicadas como (*) fueron caracterizadas por MLPA; ^{(*)1}: deleción nóvel descrita en el texto; ^{(*)2}: deleciones nóveles mayores a 127,5 kb.

abarcaron todos los genes de la familia α . En el último paciente, se detectaron otras *Copy Number Variants*: deleciones en 6p21.1 y 17q25.3 y una duplicación en 7p22.3-p22.2, que posiblemente contribuyan al fenotipo (18).

En 8 familias se hallaron mutaciones puntuales en estado heterocigota en *HBA2*: 5 presentaron la mutación $\alpha^{IVSI(-5nt)}\alpha$ (*HBA2*:c.95+2_95+6delTGAGG), 2, la mutación $\alpha^{NcoI}\alpha$ (*HBA2*:c.1A>G;p.Met1Val) y uno, una variante de secuencia en la región 3' UTR (*HBA2*:c.*107A>G). Estos hallazgos son compatibles con el perfil étnico de nuestra población, de ascendencia predominante del área del Mediterráneo. En 3 familias, se hallaron mutaciones en el gen *HBA1* previamente no descritas: En una paciente adulta se determinó una sustitución en la secuencia aceptora de *splicing* (*HBA1*:c.301-2A>T) en asociación en *cis* con la Hb Riccarton (*HBA1*:c.154G>A; p.Gly51Ser) (17). También se encontraron 2 deleciones nóveles que generan corrimientos del marco de lectura: *HBA1*:c.187delG (p.Trp62fs*66), en una mujer con anemia drepanocítica y su hijo portador de Hb S en asociación con la variante *patchwork* $\alpha 212$ (22) y la mutación *HBA1*:c.237delC (p.Asn78Lysfs*6) en un padre y su hijo de otra familia.

Discusión y Conclusiones

Los desórdenes hereditarios que comprometen la síntesis de la Hb representan el grupo más común de síndromes monogénicos. Si bien el origen se situó en

áreas ecuatoriales, las migraciones determinaron su expansión a nivel mundial.

La mayoría de las personas portadoras de hemoglobinopatías en nuestra población son de ascendencia mediterránea, aunque debido a la creciente inmigración del este y sudeste asiático, se está incrementando el número de pacientes de este origen, donde la α^0 -tal es frecuente y el perfil de mutaciones es diferente. Por ende, es necesario llevar registro de los cambios demográficos poblacionales, que repercutirán, indudablemente, sobre la prevalencia de las distintas hemoglobinopatías a futuro.

El análisis de las hemoglobinopatías estructurales muestra que hay variantes de relevancia clínica, como otras sin repercusiones clínicas asociadas, prevaleciendo las que afectan el gen *HBB*. La hemoglobinopatía estructural más frecuente, en nuestro medio, es la Hb S, seguida por la Hb C y la Hb D-Punjab.

Las causas moleculares más frecuentes de síndromes falciformes son la presencia de la mutación Hb S, en homocigosis y en doble heterocigosis con una mutación β -tal; este resultado es lógico dada la alta prevalencia de la β -tal en Argentina. También existen casos dobles heterocigotas de Hb S con otras mutaciones que comprometen la síntesis de cadenas de globinas, como Hb D, Hb C, Hb Dhounbury y con la deleción $\delta\beta$ -tal⁰ Variante Siciliana.

Sólo 3 familias presentaron variantes estructurales en los genes *HBA2* y *HBA1*. Si bien están descritas como menos frecuentes, en general el efecto fenotípico será menos severo que en caso de las variantes en el gen *HBB*, ya que estará afectado sólo 1 de las 4 copias de genes productores de cadenas de α -globina.

La β -tal es la hemoglobinopatía más frecuente en Argentina (13). En este trabajo se informa el perfil de mutaciones obtenido a partir del análisis de 470 familias. Los fenotipos severos (tal mayor o intermedia) son consecuencia de asociación de varias mutaciones: 2 mutaciones β -tal, o la asociación de una mutación β -tal en heterocigosis con algún factor agravante del desbalance de cadenas α : no- α , como un mayor número de copias de genes *HBA*. Son excepción, los casos de mutaciones puntuales de talasemia dominante, con fenotipos severos en estado heterocigota.

Como en otros grupos poblacionales reportados en la literatura y trabajos previos en Argentina (11) (23), se halló un grupo acotado de mutaciones frecuentes causantes de estos cuadros y un grupo heterogéneo de mutaciones, presentes en muy baja frecuencia.

La mutación Codón 39 (*HBB*:c.118C>T) es la prevalente en Argentina. El cambio C>T determina la aparición de un codón de terminación de la traducción prematura (mutación tipo β^0) que impide la síntesis de cadenas de β -globina a partir de todos los ARN mensajeros que portan el cambio.

Las mutaciones Int 1-110 (*HBB*:c.93-21G>A) e Int 1-6 (*HBB*:c.92+6T>C) en el intrón 1 de *HBB*, le siguen en

frecuencia. Los cambios en ambas mutaciones provocan la activación de sitios crípticos de *splicing*. Como resultado de estos cambios, en los transcritos en los que se reconocen los sitios anómalos de *splicing*, se retiene parte del intrón 1, provocando la aparición de codones de terminación prematuros de la traducción. Ambas son mutaciones tipo β^+ porque existe la capacidad parcial de sintetizar cadenas de β -globina a partir de los alelos mutados. Sin embargo, presentan distinta severidad fenotípica; los pacientes homocigotas para Int 1-110 cursan como talasemia mayor, mientras que los homocigotas para Int 1-6 cursan como tal intermedia.

En 9 individuos, que habían sido sospechados como probables portadores α -tal, pero que presentaban valores de Hb A₂ en el rango superior normal (3,0 a 3,5%), se descartó la existencia de la delección de 3,7 kb y la secuenciación de *HBB* permitió identificar la mutación Int 1-6 en heterocigosis. Todos los portadores de la mutación (-87) (*HBB*:c.-137C>G), que afecta la región promotora, disminuyendo la eficiencia de transcripción, también presentaron Hb A₂ en el rango normal.

Otro grupo de pacientes sin aumento de la fracción Hb A₂, presentaron mutaciones β -tal en heterocigosis, con Hb F en el rango de 4 a 8,4%. Los valores superiores al 5%, se asociaron a la presencia de las mutaciones Int 2-1 (G>A) y la Hb Durhan N.C. La producción incrementada de cadenas de γ -globina, al unirse a las cadenas de α -globina en exceso, formando Hb F, aplacan el aumento de Hb A₂. Esta situación se observó en 8 pacientes que ingresaron al estudio con un diagnóstico presuntivo de $\delta\beta^0$ -tal.

En 4 pacientes se tipificaron mutaciones β -tal con herencia dominante. Estos cuadros son producto de mutaciones que conducen a la traducción de cadenas de β -globina estructuralmente anómalas sumamente inestables, que disminuyen su eficiencia de unión a las cadenas α -globina (o la inhiben por completo), provocando la precipitación tanto de las cadenas β alteradas como de las cadenas α en exceso en los precursores eritroides, conduciendo a eritropoyesis ineficaz y produciendo hemólisis en sangre periférica.

Todas las variantes se habrían generado *de novo* en los pacientes afectados o en las gametas de alguno de sus padres. La única variante descrita previamente fue la Hb Durham-N.C./Brescia, que representa el 9,7% de los alelos β -tal en la Federación de Rusia. Las otras 3 variantes fueron variantes nóveles: en el caso de la Hb Tavapy, hay una delección de 6 pb: *HBB*:c.182_187delCTCATG sin corrimiento del marco de lectura. Las Hb Wilde y Hb Patagonia presentan cambios del marco de lectura que, en lugar de generar codones *stop* prematuros, dan lugar a variantes elongadas de 155 y 157 aminoácidos.

En este trabajo también se actualizaron las bases moleculares de la α -tal en nuestro medio, aumentando el número de muestras caracterizadas respecto a un trabajo previo de este laboratorio (15).

El conocimiento del estado de portador α -tal es esencial para definir la etiología real de la microcitosis, permitir un diagnóstico preciso y diferencial de estos cuadros y un adecuado asesoramiento genético.

En 151 familias se detectaron mutaciones α -tal. Se registraron 136 familias de portadores de delecciones, 11 con mutaciones puntuales y 4 afectados con enfermedad con Hb H. La delección $-\alpha^{3,7}$ (delección de 3,7 kb o *rightward deletion*), en heterocigosis, deja 3 copias de *HBA* funcionantes (genotipo $-\alpha/\alpha\alpha$) y presenta el fenotipo de "portador silente", en homocigosis (genotipos $-\alpha/-\alpha$), es responsable del fenotipo de "rasgo talasémico". Es la mutación α -tal más frecuente a nivel mundial, y la de mayor incidencia en países de la cuenca del Mediterráneo (24). En este trabajo se determinó que estaba presente 72,2% de los portadores α -tal, por lo que, ante la sospecha de α -tal, los estudios moleculares deben comenzar por el rastreo de esta delección.

Hay descritas más de 40 delecciones tipo α^0 (genotipos $--/\alpha\alpha$). Las más frecuentes son $-\text{MEDI}$ y $-(\alpha)^{20,5}$ en población del Mediterráneo, $-\text{SEA}$ en el sudeste de Asia, y $-\text{FIL}$ en población filipina. Por su frecuencia y distribuciones geográficas acotadas, la técnica PCR-GAP resultó muy eficiente para su caracterización: $-\text{MEDI}$, $-(\alpha)^{20,5}$ y $-\text{CAL}$ sólo se hallaron en individuos con ascendencia mediterránea, mientras que las delecciones $-\text{SEA}$ y $-\text{FIL}$, en individuos de origen asiático.

En el ADN genómico de 11 pacientes (9 familias) con perfil α^0 -tal en los que no se detectaron las delecciones más frecuentes y en el de 2 pacientes con Hb H en los que se había hallado solamente la delección $-\alpha^{3,7}$ se realizaron diagnósticos por MLPA. En 5 pacientes (4 familias de ascendencia italiana) se identificó la delección $-\text{CAL}$ (31.207 pb, GRCh37/hg19 chr16:197924-229131del31207), sin bien los límites (determinados por secuenciación) no coinciden exactamente con los descriptos en bibliografía, la diferencia podría estar dada por diferencias en la Secuencia de Referencia usada por los distintos autores (25).

En una paciente con fenotipo α^0 -tal, se comprobó que estaban intactas las 4 copias de genes *HBA* (genotipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) pero existía una delección en el *locus* regulatorio MCS-R2 (HS-40), lo que muestra que es necesaria la integridad de esta región para la expresión con alta eficiencia del *cluster* de α -globina como está descrito previamente en la bibliografía (6) (26).

En otra paciente, se identificó por MLPA, y caracterizó por PCR-GAP y secuenciación, una nueva delección $-\text{BA}$ (GRCh37/hg19 chr16:217522-227915del10394).

Además, se detectaron por MLPA, 2 delecciones de más de 127,5 kb (máximo tamaño que permite identificar el *kit* comercial) en 2 pacientes con Hb H (genotipo $--/\alpha\alpha$, con un cuadro clínico de talasemia no dependiente de transfusiones). En particular, se estudiaron exhaustivamente, las muestras de un niño (y sus padres normales) que, además del cuadro α -tal, presentaba

pautas de retraso madurativo y varias anomalías del desarrollo, algunas, características del síndrome ATR-16 (27). Se comprobó que el niño poseía múltiples *Copy Number Variants* en distintas regiones genómicas que podrían contribuir, o ser las responsables, del retraso mental observado y de otras características fenotípicas (15).

En la otra paciente con enfermedad con Hb H se identificó una nueva delección (-^{PA}), de al menos 402.480 pb (arr[GRCh37] 16p13.3(88,165-490,645) x1), que incluyó la pérdida de otros genes vecinos al *cluster* de α -globina

En referencia a las mutaciones no delecionales, si bien presentan baja frecuencia, y las mutaciones en *HBA2* están reportadas como más frecuentes en la literatura, se deben investigar también en *HBA1*. La detección de 3 mutaciones α -tal nóveles en *HBA1* (*HBA1*:c.301-2A>T, *HBA1*:c.187delG y *HBA1*:c.237delC) resalta la importancia de su estudio por secuenciación génica.

Como conclusión final, se enfatiza la necesidad de estudios de diagnóstico molecular para la detección de la causa primaria de este amplio espectro de fenotipos hematológicos así como la interacción entre el médico hematólogo, el laboratorio bioquímico, el laboratorio de diagnóstico molecular y el médico genetista, para llegar al diagnóstico certero de estos cuadros y realizar el correcto asesoramiento familiar, con el fin de reducir la incidencia de las formas severas.

CORRESPONDENCIA

Prof. Dra. VIVIANA VARELA
Cátedra de Genética, Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Junín 956
C1113AAC, CIUDAD DE BUENOS AIRES, Argentina
Tel.: 54-11-49648296; Fax: 54-11-49648296
E-mail: vivianavarela09@gmail.com

Referencias bibliográficas

- Giordano PC, Hartevelde CL, Bakker E. Genetic epidemiology and preventive healthcare in multiethnic societies: The hemoglobinopathies. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11(6): 6136-46.
- Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008; 86(6): 480-7.
- Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med* 2010 Feb; 12(2):61-76.
- Palstra RJ, de Laat W, Grosveld F. Beta-globin regulation and long-range interactions. *Adv Genet* 2008; 61: 107-42.
- Patrinos GP, Antonarakis SE. Human hemoglobin. En: Speicher M, Antonarakis SE, Motulsky AG, editors. *Vogel and Motulsky's Human Genetics*. Berlin Heidelberg Springer; 2010. p. 365-401.
- Higgs DR, Vernimmen D, Wood B. Long-range regulation of alpha-globin gene expression. *Adv Genet* 2008; 61: 143-73.
- Coelho A, Picanço I, Seuanes F, Seixas MT, Faustino P. Novel large deletions in the human alpha-globin gene cluster: Clarifying the HS-40 long-range regulatory role in the native chromosome environment. *Blood Cells Mol Dis* 2010 Aug 15; 45(2): 147-53.
- Voon HP, Vadolas J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassaemia. *Haematologica* 2008; 93(12): 1868-76.
- Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* 2004 Jan 1; 32(Database issue): D537-41.
- Kountouris P, Lederer CW, Fanis P, Feleki X, Old J, Kle-anthous M. IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. *PLoS One* 2014 Jul 24; 9(7): e103020.
- Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. Fourth Edition: Oxford: Blackwell Science Ltd. UK; 2001.
- 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 Jun; 89(6): 746-7.
- Aixalá MTF. Prevalencia y perfil hematimétrico de β talasemia menor. *Hematología* 2003; 27(3): 183-6.
- Noguera NI, Bragós IM, Milani AC. Prevalence of -alpha3.7-thalassemia in Argentina. *Hemoglobin* 2002 Feb; 26(1): 103-6.
- Scheps KG, Francipane L, Nash A, Cerrone GE, Copelli SB, Varela V. Bases Moleculares de alfa-talasemia en Argentina. *Medicina(B Aires)* 2015; 75(2): 81-6.
- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980 Oct 10; 8(19): 4321-5.
- Scheps KG, Binaghi A, Varela V. Identification of a new HBA1 gene mutation (HBA1:c.301-2A>T) in cis with Hb Riccarton (HBA1:c.154G>A) [α 51(CE9)Gly→Ser. *Hemoglobin* 2012; 36(5): 504-7.
- Scheps KG, Francipane L, Nevado J, Basack N, Attie M, Bergonzi MF, et al. Multiple copy number variants in a pediatric patient with Hb H disease and intellectual disability. *Am J Med Genet A* 2016 Apr; 170(4): 986-91.
- Scheps KG, Hasenahuer MA, Parisi G, Fornasari MS, Pennesi SP, Erramouspe B, et al. Hb Wilde and Hb Patagonia: two novel elongated beta-globin variants causing dominant beta-thalassemia. *Eur J Haematol* 2015 Jun; 94(6): 498-503.
- Hasenahuer MA, Parisi G, Varela V, Scheps KG, Fornasari MS. Molecular characterization of novel β -globin variants associated to dominant β -thalassemia. En: 6th Argentinian Conference on Bioinformatics and Computational Biology 2015. 14 al 16 de octubre de 2015. Centro Científico Tecnológico (CCT) CONICET, Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina, libro de resúmenes, pág. 48.

21. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, *et al.* EMQN haemoglobinopathies best practice meeting. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2015 Apr; 23(4): 426-37.
22. Scheps KG, De Paula SM, Bitsman AR, Freigeiro DH, Basack FN, Pennesi SP, *et al.* Coinheritance of a novel mutation on the HBA1 gene: c.187delG (p.W62fsX66) [codon 62(-G)(α 1)] with the α 212 patchwork allele and Hb S [β 6(A3)Glu \rightarrow Val, GAG \rightarrow GTG; HBB:c.20A \rightarrow T]. *Hemoglobin* 2013; 37(5): 492-500.
23. Lazarte SS, Mónaco ME, Haro AC, Jiménez CL, Ledesma Achem ME, Issé BA. Molecular characterization and phenotypical study of β -thalassemia in Tucumán, Argentina. *Hemoglobin* 2014; 38(6): 394-401.
24. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010 May 28; 5:13.
25. Blattner A, Brunner-Agten S, Ludin K, Hergersberg M, Herklotz R, Huber AR, *et al.* Detection of germline rearrangements in patients with α - and β -thalassemia using high resolution array CGH. *Blood Cells Mol Dis* 2013 Jun; 51(1): 39-47.
26. Viprakasit V, Hartevelde CL, Ayyub H, Stanley JS, Giordano PC, Wood WG, *et al.* A novel deletion causing alpha thalassaemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element. *Blood* 2006 May 1; 107(9): 3811-2.
27. Regueiro García A, Saborido Fiaño R, González Calvete L, Vázquez Donsión M, Couselo Sánchez JM, Fernández Sanmartín M. [Osteosarcoma and ATR-16 syndrome: association or coincidence?]. *An Pediatr (Barc)* 2015 Jan; 82(1): e189-91.

Recibido: 27 de julio de 2016
Aceptado: 28 de julio de 2017