



- REVISTA DE -

MEDICINA DE LABORATORIO

**Estudio de la talasemia β en el
laboratorio clínico: estrategias
diagnósticas**

**Study of beta thalassemia in the
clinical laboratory: diagnostic
strategies**

10.20960/revmedlab.00194

08/29/2023

Estudio de la talasemia β en el laboratorio clínico: estrategias diagnósticas

Study of beta thalassemia in the clinical laboratory: diagnostic strategies

Herminio López-Escribano, Arancha Martí Martínez

Laboratorio de Bioquímica y Patología Molecular. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia.

Correspondencia: Herminio López-Escribano. Laboratorio de Bioquímica y Patología Molecular. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia

e-mail: escribanox@yahoo.es

Recibido: 04/08/2023

Aceptado: 09/08/2023

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

RESUMEN

Las talasemias β son trastornos sanguíneos hereditarios caracterizados por anomalías en la síntesis de las cadenas beta de la hemoglobina, lo que da lugar a fenotipos variables, desde anemia severa hasta individuos asintomáticos. La incidencia anual de casos sintomáticos se estima en 1 de cada 100 000 personas en el mundo y en 1 de cada 10 000 en la Unión Europea. Se reconocen tres formas principales: talasemia mayor, talasemia intermedia y talasemia menor. Los individuos con talasemia mayor generalmente desarrollan anemia severa antes de los dos años, lo que requiere transfusiones regulares. Los pacientes con talasemia intermedia manifiestan anemia moderada más tardía y no suelen requerir transfusiones. La talasemia β se ocasiona por mutaciones puntuales o, en casos menos

comunes, delecciones en el gen de la globina beta en el cromosoma 11, lo que resulta en una síntesis reducida o ausente de las cadenas beta de la hemoglobina. La transmisión es de tipo autosómico recesivo, aunque también se han detectado mutaciones dominantes. El diagnóstico se basa en pruebas hematológicas y genéticas. Se recomienda el asesoramiento genético y la posibilidad de diagnóstico prenatal. El tratamiento de la talasemia mayor incluye transfusiones regulares, quelación de hierro y el manejo de complicaciones secundarias. Aunque el trasplante de médula ósea sigue siendo la única cura definitiva disponible en la actualidad, los avances en la caracterización del gen de la globina beta y el uso de terapia génica mediante trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas están permitiendo avances en nuevas terapias transformadoras.

Palabras clave: Talasemia β. Test genéticos moleculares. Consejo genético. Diagnóstico prenatal. Terapia génica.

ABSTRACT

Beta-thalassemia are a group of hereditary blood disorders characterized by anomalies in the synthesis of beta chains of hemoglobin resulting in variable phenotypes ranging from severe anemia to clinically asymptomatic individuals. The total annual incidence of symptomatic individuals is estimated at 1 in 100,000 throughout the world and 1 in 10,000 people in the European Union. Three main forms have been described: thalassemia major, thalassemia intermedia and thalassemia minor. Individuals with thalassemia major usually present within the first two years of life with severe anemia, requiring regular red blood cell transfusions. Patients with thalassemia intermedia present later in life with moderate anemia and do not require regular transfusions. Beta-thalassemia are caused by point mutations or, more rarely, deletions in the beta globin gene on chromosome 11, leading to reduced or absent synthesis of the beta chains hemoglobin. Transmission is

autosomal recessive; however, dominant mutations have also been reported. Diagnosis of thalassemia is based on hematologic and molecular genetic testing. Genetic counseling is recommended, and prenatal diagnosis may be offered. Treatment of thalassemia major includes regular red blood cell transfusions, iron chelation and management of secondary complications. Bone marrow transplantation remains the only definitive cure currently available. Extensive characterization of the beta globin gene locus, accompanied by pioneering work on the utilization of viruses as human gene delivery tools in human hematopoietic stem and progenitor cells, has led to transformative and successful therapies via autologous hematopoietic stem-cell transplant with gene therapy.

Keywords: Beta-thalassemia. Molecular genetic testing. Genetic counselling. Prenatal diagnosis. Gene therapy.

INTRODUCCIÓN

Las talasemias son un conjunto de trastornos hereditarios recesivos caracterizados por una disminución o ausencia de la producción de hemoglobina (Hb), lo que conduce a una anemia crónica de gravedad variable (1). Constituyen los trastornos monogénicos más comunes en todo el mundo (2) y se clasifican como talasemia α (α -tal) o talasemia β (β -tal) (3), según las cadenas de globina que se encuentran afectadas dentro del tetrámero de la Hb (1), formado por dos pares de cadena de globina junto a un grupo hemo unido a cada una de estas.

Los diferentes tipos de Hb dependen de la combinación de los tipos de cadenas de globina, cuya expresión varía a lo largo del tiempo según las distintas etapas del desarrollo. Más del 95 % de la Hb presente en el adulto y en niños mayores de 1 año es HbA y está formada por dos cadenas alfa (α) y dos cadenas beta (β) ($\alpha_2\beta_2$). Los adultos tienen de un 2 a un 3,5 % de HbA₂, la cual está compuesta

por dos cadenas α y dos cadenas delta (δ) ($\alpha_2\delta_2$). En cuanto a la Hb fetal (HbF), esta posee dos cadenas α y dos cadenas gamma (γ) ($\alpha_2\gamma_2$); en el recién nacido constituye entre el 70 y el 90 % de la Hb total. Sin embargo, su concentración disminuye al 2-3 % alrededor del sexto mes de vida, lo que constituye en la vida adulta una cantidad que no supera el 1 % (4).

En relación a la β -tal, esta se ha distribuido ampliamente por todo el mundo. Más del 90 % de los pacientes afectados se encuentran en regiones que se extienden desde África hasta el sur de Europa y desde el Oriente Medio hacia el sudeste asiático (1).

Aunque los avances en el cuidado médico han mejorado la esperanza de vida de los pacientes, la β -tal sigue siendo un desafío en términos de prevención y manejo, especialmente en regiones con recursos limitados (1). El tratamiento de las personas afectadas supone una carga global considerable en términos de enfermedad. La identificación de portadores y el cribado antenatal son procedimientos valiosos que permiten identificar a las parejas con riesgo de tener hijos afectados para así ofrecerles opciones de tener descendencia sana (2).

GENÉTICA Y DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES. ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Genética y mutaciones en la β -tal

El conjunto de genes de la β -globina (clúster beta), que abarca una región de 70 kb, está compuesto por cinco genes: un gen para la cadena épsilon (), que forma parte de las hemoglobinas embrionarias Gower 1 y 2 (gen *HBE*); dos genes para la cadena , que forma parte de la Hb F (genes *HBG2* y *HBG1*); un gen para la cadena , que forma parte de la HbA₂ (gen *HBD*), y un gen para la cadena , que forma parte de la HbA (gen *HBB*) (Fig. 1). Estos genes se localizan en el brazo corto del cromosoma 11 en el siguiente orden dentro del clúster: 5'—HBE—HBG2—HBG1—HBD—HBB—3'. Además, encontramos un elemento regulador distal, conocido como LCR, que

desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de todos los genes del conjunto. La β-tal se caracteriza por un defecto cuantitativo en la síntesis de las cadenas de globina β subyacente a una marcada heterogeneidad genotípica de las mutaciones del gen (5).

Se han descrito hasta 350 mutaciones de β-tal que dan como resultado la sustitución de un nucleótido, pequeñas delecciones o inserciones dentro del gen de la globina β o en su secuencia flanqueante inmediata (región intrón/exón). Las grandes delecciones que implican al gen *HBB* o a varios genes del clúster son mucho menos frecuentes (a excepción de la delección de 619 pares de bases, que es muy frecuente en los grupos étnicos punyabíes y sindhis de regiones de la India y de Pakistán). A cada tipo de mutación se le asigna un índice de gravedad, que es β^+ cuando se encuentra asociado a mutaciones que causan una reducción relativa de la síntesis de la cadena de globina β (con distinta severidad: $\beta^{+ \text{ severas}}$, $\beta^{+ \text{ leves}}$ o $\beta^{+ \text{ silentes}}$) y β^0 , que se refiere a mutaciones severas que pueden conducir a una ausencia completa de la cadena de globina β (1).

Distribución de mutaciones

La distribución de mutaciones y la prevalencia de portadores de talasemia son bastante conocidas. Se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Con relación a la β-tal, los alelos de talasemia β^0 (β^0 -tal) son los más comunes debido a mutaciones sin sentido o a desplazamientos del marco de lectura, que provocan la terminación prematura de la traducción. Algunas mutaciones son muy comunes, mientras que otras tienen frecuencias muy bajas. Estudios poblacionales han demostrado que solo unos 20 alelos de β-tal representan alrededor de 80 % de sus mutaciones y cada población en áreas de alta prevalencia tiene su propio espectro único de mutaciones (normalmente entre 4 y 10 mutaciones). Por tanto, es importante conocer el espectro mutacional de cada región o área para realizar un estudio dirigido más coste-efectivo, aunque los

fenómenos migratorios actuales aumentan la diversidad de mutaciones que podemos encontrarnos (de ahí la importancia de conocer el origen étnico del individuo a estudiar) (6).

En concreto, en la región del Mediterráneo las mutaciones más comunes distribuidas son: Cd39 (C>T), IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (C>T), IVSI-I (G>A), IVSII-1 (G>A) y Cd8 (-AA). En cambio, en regiones asiáticas nos encontramos diferentes mutaciones, como (7-9):

- La India y Pakistán: -619 bp del, IVSI-5 (G>T), Cd8/9 (+G), Cd41/42 (-TCTT) y IVSI-I (G>T).
- Asia oriental y sudeste asiático: Cd41/42 (-TCTT), Cd17 (A>T), -28(A>G) y IVSII-654 (C>T).
- Indonesia: IVSI-5 (G>T), IVSII-654 (C>T), IVSI-I (G>T) y Cd15 (G>A).

Asociación genotipo-fenotipo

La heterogeneidad clínica de la β -tal es amplia, va desde la β -tal mayor que se caracteriza por una anemia severa a partir de los primeros años de vida, y se considera una enfermedad grave con requerimientos transfusionales, a formas leves, generalmente heterocigotos, con una discreta anemia microcítica e hipocromía, sin manifestaciones clínicas evidentes, conocidas como β -tal menor. Además, podemos encontrarnos con formas intermedias (β -tal intermedia) en pacientes con anemia no tan severa, como en las formas más graves, que no suelen requerir transfusiones (10).

Por tanto, atendiendo al fenotipo clínico, podemos clasificar las β -tal en:

- *β -tal menor o rasgo talasémico*: es el resultado de la herencia heterocigota de una mutación de β -tal, ya sea una mutación β^0 o β^+ (1). Es clínicamente asintomática y se caracteriza por una disminución de los índices eritrocitarios, como el volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM), y por el incremento del número de hematíes (RBC) (3).
- *β -tal intermedia*: numerosas alteraciones moleculares pueden

dar lugar a este fenotipo clínico. Aunque el diagnóstico sigue siendo en gran parte clínico, se ha descrito una asociación genotipo/fenotipo, de modo que la base genética de la diversidad fenotípica vendría determinada por moduladores genéticos (10).

El espectro clínico de la β-tal intermedia es muy amplio, así como el fenotipo hematológico. La anemia (los niveles de Hb suelen variar entre 7 y 10 g/dL) es el primer signo de sospecha y en los pacientes con β-tal intermedia puede ser de moderada a leve, con una producción de hematíes adecuada para mantener niveles de Hb superiores a 7 g/dL y no requerir transfusiones de forma regular. Respecto a los moduladores genéticos que podemos encontrar en la β-tal intermedia, hay diferentes genotipos asociados a β-tal intermedia:

- *Homocigotos o heterocigotos compuestos para β-tal:* la amplia diversidad de mutaciones que afectan al gen *HBB* puede producir un fenotipo clínico menos severo (sobre todo si una de las mutaciones o ambas son β^+ no severas, mutaciones que afecten al promotor del gen, etc.). Estas mutaciones causan una ligera reducción en la producción de la cadena de globina β .
- *Portadores de mutaciones dominantes:* con menor frecuencia se observa la afectación de un solo locus del gen *HBB*; el otro es completamente normal. Son mutaciones que suelen provocar alteraciones en los últimos codones del gen, lo que incita un cambio de pauta de lectura que va a dar lugar a la elongación de la cadena, lo que genera una hemoglobina hiperinestable. Esta inestabilidad provoca la lisis del hematíe y da lugar al fenotipo clínico de β-tal intermedia, a pesar de que la mutación se encuentre en heterocigosis.
- *Sobreexpresión de las cadenas globina γ:* la homocigosidad o doble heterocigosidad, junto a una sobreexpresión de cadenas γ , ya sea porque uno de los alelos o ambos

corresponden a una talasemia (β -tal) o porque se asocian a otras alteraciones moleculares en el mismo locus o en otro diferente, como en el síndrome de la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPHF), o polimorfismos en el promotor del gen γ ($HBG1$ o $HBG2$), que van a provocar un incremento de Hb F. Este aumento produce una disminución de la severidad clínica, lo que da lugar a un fenotipo de β -tal intermedia.

- *Incremento de producción de cadenas globina* : el aumento de cadenas α por una triplicación o cuadriplicación de genes α ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ o $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$), asociado a una β -tal heterocigota, provoca un fenotipo clínico de β -tal intermedia debido al exceso de cadenas α que, además de la disminución de cadenas β producida por la β -tal en heterocigosis, provocan la hemólisis del hematíe debido al exceso de cadenas α libres.
- *β -tal mayor o anemia de Cooley*: se presenta en pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones severas de β -tal. Se caracteriza por debutar con una anemia temprana (entre los 6 y 24 meses) que requiere transfusiones sanguíneas. Los pacientes con β -tal mayor no tratada o transfundida inadecuadamente sufren numerosas complicaciones, como retraso del crecimiento, hepatoesplenomegalia, hematopoyesis extramedular y anomalías esqueléticas como resultado de la expansión de la médula ósea. A pesar de ello, las transfusiones de sangre continuas provocan un exceso de hierro sanguíneo que conlleva daño a nivel orgánico grave e irreversible. Por estos motivos, la causa más común de muerte en pacientes con β -tal mayor son problemas cardiovasculares asociados a la anemia severa o por sobrecarga de hierro debida a las transfusiones continuas, seguida de un incremento de riesgo de infecciones (3).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA TALASEMIA β

La prevalencia de la β -tal ha sido históricamente más alta en el Mediterráneo, en Oriente Medio y en el sudeste asiático (11) debido a la asociación evolutiva con la resistencia a la malaria (1). Sin embargo, debido a los fenómenos migratorios, los datos de prevalencia de β -tal están incrementándose comúnmente en regiones no endémicas como Europa oriental y América del Norte (11).

A nivel mundial, aproximadamente el 1,5 % de la población (de 80 a 90 millones de personas) es portador de β -tal. Cada año, se registran alrededor de 40 000 nacimientos de niños afectados de β -tal y aproximadamente la mitad de ellos requiere transfusiones sanguíneas (11).

Las tasas de portadores varían en función de las diferentes regiones geográficas. En Asia, oscila según las zonas: 4,6 % en Pakistán, 3,9 % en la India, 1-8 % en China (muy variable según regiones) o entre el 3 y el 9 % en Tailandia (12). En el Oriente Medio, la prevalencia es alta debido a la consanguinidad en los matrimonios, aunque los programas de prevención han logrado reducirla en las últimas décadas (11). En el Mediterráneo, Chipre tiene unos datos estimados de portadores de β -tal de entre un 12 y un 15 %, lo que la convierte en una de las regiones con mayor prevalencia a nivel mundial. Las cifras en otros países del Mediterráneo varían desde un 7-8 % en Grecia, un 4,3 % en Italia (aunque hay regiones del país con prevalencias superiores a la media, como Cerdeña, con un 10,3 %, y Sicilia, con un 6 %) o un 2,1 % en Turquía. En relación con España, los datos estimados indican un 1,6 % de portadores de β -tal (12).

Como se ha indicado, en algunos países europeos la β -tal está aumentando debido a la migración y a los movimientos de refugiados provenientes de zonas de conflicto, así como a un incremento en las tasas de adopción (1). Por otro lado, las estrategias de prevención tomadas, que incluyen programas de educación de salud pública, consejo genético y cribado poblacional, han permitido disminuir la

incidencia de β -tal en países europeos endémicos y en países que reciben población de zonas endémicas del resto del mundo. Además, las tasas de supervivencia han mejorado debido a los avances en el tratamiento con transfusiones sanguíneas, a la monitorización y al control de la sobrecarga de hierro. Esto ha provocado que la β -tal pase de considerarse una enfermedad pediátrica con esperanza de vida corta a una enfermedad crónica con una supervivencia prolongada (11).

ESTUDIO DE PORTADORES

Las hemoglobinopatías constituyen una de las alteraciones monogénicas recesivas con mayor distribución a nivel mundial. Estas se producen por variantes que afectan directamente a la síntesis de las cadenas de globina de la Hb (síndromes talasémicos) o a cambios estructurales que afectan a las propiedades fisicoquímicas de esta (por ejemplo, la HbS).

Si nos centramos en la β -tal o en su combinación con hemoglobinopatías estructurales que afecten a la cadena de la β -globina, debemos incidir en la identificación de portadores en los que la interacción de distintas alteraciones dé lugar a fenotipos clínicos severos. En estos casos, el cribado neonatal, el diagnóstico prenatal/preimplantacional o el consejo genético están indicados en aquellas parejas portadoras de los desórdenes, según la guía de buena práctica clínica publicada en 2015 por la European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) (2). Esta guía es complementaria a las recomendaciones de la British Society for Haematology (BSH) (13) y a las de la European Network for Rare and Congenital Anaemias (ENERCA) (14). Por tanto, el objetivo es prevenir las siguientes combinaciones en el genotipo que darían lugar a fenotipos clínicos severos (Tablas I y II):

- a) β -tal mayor: coherencia de dos variantes que afecten a los niveles de expresión de cadena β , incluyendo la $\delta\beta$ -tal y Hb Lepore.

- b) *Síndromes drepanocíticos*, ya sea Hb S en homocigosis (Hb S/Hb S) o su combinación con otras variantes que afecten al gen beta como: Hb S/ Hb C, Hb S/ β-tal, Hb S/ Hb D- Punjab, Hb S/ Hb O-Arab, Hb S/Hb Lepore o Hb S/ Hb E.
- c) *Hb E talasemia*: coherencia de β-tal con Hb E.

El laboratorio clínico juega un papel fundamental en la detección de portadores de hemoglobinopatías, ya que es la única enfermedad genética en la que su detección inicial es posible con estudios hematológicos y bioquímicos. En muchos países de nuestro entorno hay programas de detección de parejas portadoras durante el embarazo (cribado antenatal) que siguen algoritmos muy dirigidos de decisión clínica. Un ejemplo es el programa de cribado realizado por el sistema de salud del Reino Unido (NHS) (15) a todas las gestantes (cribado de drepanocitosis y talasemia) (Fig. 2). En la primera visita para el control del embarazo, la matrona solicita un cribado de hemoglobinopatías que incluye un hemograma, un estudio de hemoglobinas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o electroforesis capilar (EC), junto con un cuestionario en el que se indica el origen étnico de la gestante y la pareja (dato muy importante, ya que la prevalencia de portadores y la frecuencia de mutaciones varían según el origen étnico). Si se detecta una posible variante en la gestante, se solicita el estudio a la pareja (si está disponible), y si esta también es portadora de una alteración, debe procederse al estudio genético de ambos. Una vez conocido el genotipo de los portadores, se evalúan las distintas interacciones entre las variantes que afectan al gen *HBB* y sus implicaciones clínicas para derivar a estos casos a la consulta genética. Determinados genotipos provocan un fenotipo clínico severo en el que está indicado el diagnóstico prenatal. En cambio, hay combinaciones que producen un fenotipo clínico impredecible. Estos genotipos debe evaluarlos un equipo multidisciplinar que realice un estudio exhaustivo en busca de casos publicados con las mismas

características para ofrecer las distintas opciones posibles a la pareja. Por tanto, estos algoritmos (15) se basan en:

1. Detección de portadores mediante técnicas hematológicas:
 - a) *Hemograma.* Mediante la realización de un hemograma, obtendremos parámetros eritrocitarios como el VCM, el HCM, el índice de distribución eritrocitaria (RDW) y la concentración de Hb y RBC. Valores en adultos de VCM < 79 fL y de HCM < 27 pg podrían indicar heterocigosis para talasemia (siempre que se excluya microcitosis por anemia ferropénica) (Fig. 2). El RDW y el RBC pueden discriminar entre portadores de talasemia y deficiencia de hierro, ya que en los portadores de talasemia el RDW generalmente no se encuentra alterado, a diferencia de la que ocurre en la anemia ferropénica. En los portadores de talasemia, el RBC se incrementa normalmente a valores de $6-7 \times 10^{12}/\text{L}$ como mecanismo compensador de la HCM disminuida crónica. Durante el embarazo, el RBC no es un buen parámetro, ya que puede sufrir el efecto de la hemodilución. Además, durante el tratamiento de la anemia ferropénica con hierro el RBC puede verse incrementado (2).
 - Muestras analizadas pasadas 24 horas tras la extracción podrían presentar un falso incremento del VCM, sobre todo si no se han mantenido refrigeradas, a diferencia del HCM, que es estable hasta 5 días a temperatura ambiente. Por tanto, los programas de cribado se basan principalmente en el HCM como principal indicador de microcitosis.
 - b) *Análisis de hemoglobina y su cuantificación.* Se requieren técnicas analíticas capaces de identificar variantes estructurales que afecten a la cadena β (16). Al detectar una posible variante estructural, se recomiendan al menos dos métodos para la identificación de patrones de Hb. Estos métodos incluyen la electroforesis de Hb a pH 8,6 con membrana de acetato de celulosa, electroforesis de Hb a pH 6

con gel de agarosa, isoelectroenfoque, HPLC y EC. Los métodos HPLC y EC son los más utilizados por los laboratorios clínicos debido a su automatización y a una mayor capacidad de detectar y de cuantificar variantes estructurales, como las que afectan a la cadena β (Hb S, Hb C, Hb D-Punjab, Hb O-Arab, Hb E o Hb Lepore, entre otras). Además, son métodos que nos permiten cuantificar niveles de HbA, Hb A₂ y Hb F y así identificar portadores de β -tal, $\delta\beta$ -tal o HPHF mediante el uso de algoritmos diagnósticos.

- *HbA₂*. Niveles de HbA₂ $\geq 3,5\%$ e índices eritrocitarios como el HCM disminuido son compatibles con heterocigosisidad para β -tal (Fig. 2). En los programas de cribado de portadores se asume que hay situaciones en las que los niveles de HbA₂ pueden encontrarse infraestimados o en las que el HCM esté alterado (incrementado) (16), lo que dificulta la detección de portadores de β -tal. Estas condiciones están bien caracterizadas. Las que afectan a los niveles de HbA₂ son las que mejor se conocen:
 - o *Mutaciones silentes*. Son mutaciones que afectan a ciertas regiones del promotor, regiones intrónicas o regiones PolyA del gen β (con una mayor prevalencia en sujetos de origen mediterráneo). Algunas de estas mutaciones son: c.-50 A>C [CAP+1 (A>C)], c.92 + 6 T>C [IVSI-6 (T>C)], c.-151 C>T [-101 (C>T)], c.-142 C>T [-92 (C>T)], c. -18 C>G [+33 (C>G)], c. 316-7 C>G [IVS2-844 (C>G)], c.6 C>G [+1480 (C>G)], c.111 A>C o c.110 T>C [PolyA (A>G) o (T>C)]. Estas alteraciones producen niveles normales o límites de HbA₂ de entre 3,1 y 3,5 %, pero afortunadamente la gran mayoría provoca alteraciones de síntesis de tipo β^+ (15).

- o Portadores de β -tal con anemia ferropénica severa:* la HbA₂ puede encontrarse infraestimada.
- o Portadores de β -tal con deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico, enfermedad hepática o tratamiento VIH:* en los que puede producirse un incremento de los índices eritrocitarios, como el HCM.
- o Portadores de β -tal con coexistencia de talasemia δ o una variante en δ o α :* al disminuir los niveles de cadena δ se forma una menor cantidad de tetrámero de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) o se forman dos tetrámeros con distinto comportamiento fisicoquímico para su detección por los métodos analíticos, con lo que se obtiene la HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), que no contiene las variantes δ o α (denominada δ' o α') y la HbA_{2'} con la variante δ' o α' ($\alpha_2\delta'_2$; $\alpha'_2\delta_2$), denominada HbA₂ *split* (17) (Fig. 3).
- o Portadores de β -tal en los que coexiste una alteración en genes alfa.* En la enfermedad de la Hb H, principalmente por delección de tres genes α cuyo genotipo corresponde con (−/− α). En estos casos, al disminuir la síntesis de cadenas α , la HbA₂ ($\alpha_2\alpha_2$) se encontraría disminuida.
- o Portadores de talasemia $\varepsilon\gamma\delta\beta$.* Delección muy infrecuente que afecta a gran parte del clúster β infraestimando la HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) al disminuir las cadenas δ .

Hay que señalar que niveles de HbA₂ inferiores a 3,5 %, junto con índices eritrocitarios disminuidos, serían compatibles con α -tal, y según los valores de HCM y el origen étnico (debe revisarse si el portador es de zona de alto riesgo de talasemia α^0), deberían confirmarse con un

estudio genético por el riesgo de fetos afectados de *Hidrops Fetalis* (ausencia de los cuatro genes α).

- *HbF*. Los niveles de HbF son normalmente inferiores al 1 % a partir de los 2 años. Niveles por encima de 2 % en adultos deberían requerir más estudios para detectar determinadas entidades clínicas. Hay que señalar que durante el embarazo la HbF puede incrementarse hasta un 3-5 %, por lo que estos valores son difíciles de interpretar. Valores por encima del 5 % durante la gestación podrían indicar la presencia de HPHF, por lo que se recomienda su seguimiento a los 6 meses del parto. Por tanto, según las recomendaciones de la EMQN, habría que solicitar un estudio a la pareja si en la gestante nos encontramos una de estas dos situaciones con relación a la HbF (2):
 - *Niveles de HbF por encima del 5 % y un VCM y HCM disminuidos*: se asocian a $\delta\beta$ -tal en heterocigosis o una delección $^A\gamma\delta\beta$. Los niveles de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) los encontramos dentro de la normalidad debido a la delección de uno de los genes δ . El incremento de HbF podría estar implicado en una mayor tasa de transcripción del gen *HBG* por la delección del gen *HBE*. Es importante detectar portadores de estas entidades por su combinación con β -tal o Hb Lepore (Fig. 4).
 - *Niveles de HbF por encima del 10 % y un VCM y HCM normal*: se asocian con HPHF en heterocigosis. Podemos clasificar la HPHF en dos tipos, la deletacional y la no deletacional.
En la HPHF deletacional podemos encontrar delecciones de diferente tamaño que afectan a los genes β y δ , como en la denominada tipo 1 (*Black*

HPFH-1), tipo 2 (Ghanaian HPFH-2), tipo 3 (Indian HPFH-3), tipo 4 (Italian HPFH-4) o tipo 5 (Italian 2/Sicilian HPFH-5). En la HPHF no delecional, encontramos mutaciones puntuales que pueden afectar al gen ^Aγ o al ^Gγ.

La consecuencia final es que en los portadores de esta entidad la HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) se encuentra disminuida (en la delecional) o dentro de la normalidad (en la no delecional) y la Hb F > 10 % (mayores niveles en las delecionales, normalmente con valores de 20-25 %).

Es importante identificar esta entidad, ya que la combinación de HPHF delecional y Hb S produce un genotipo de Hb S en hemicigosis (al estar delecionado uno de los genes β), pero con un fenotipo clínico menos severo que la Hb en homocigosis gracias al incremento de Hb F, ya que la Hb F es un potente inhibidor de la polimerización de la desoxihemoglobina S. Por tanto, en los casos en los que se sospeche en la gestante la presencia de HPHF por los parámetros hematimétricos anteriormente descritos, el parente biológico debe ser estudiado, ya que, si es portador de Hb S, hay riesgo de Hb S en hemicigosis con un fenotipo clínico leve de drepanocitosis y en estos casos el diagnóstico prenatal no estaría indicado (Fig. 4).

Hay que señalar que en portadores de β-tal o de HbS los niveles de HbF suelen estar dentro de la normalidad. Si se detecta una elevación por encima del 7-8 % de Hb F, debe sospecharse la coexistencia de variaciones génicas, como la triplicación de genes α (en estos casos suele ir asociada a un fenotipo de β-tal intermedia con niveles de Hb entre 7 y 10 g/dL), polimorfismos en el promotor del gen Gγ o variantes en genes de factores de transcripción que actúen sobre el gen γ (2, 15).

2. Estudio del metabolismo del hierro:

Parámetros como el índice de saturación de la transferrina y de la ferritina pueden medirse para evaluar el estatus de hierro, lo que es útil en individuos con VCM y HCM disminuidos y HbA₂ y HbF dentro de la normalidad. El estudio nos permitirá distinguir entre deficiencia de hierro y portadores de α-tal o ciertas formas de β-tal en heterocigosis denominadas “silentes”, en las que encontraremos un perfil del metabolismo del hierro dentro de la normalidad. Sin embargo, es importante destacar que puede coexistir una deficiencia de hierro con talasemia, lo que nos lleva a un diagnóstico erróneo. Se recomienda repetir el estudio hematimétrico una vez que se normalicen las reservas de hierro (aunque no siempre es factible en parejas con embarazo en curso) (2).

ESTUDIOS GENÉTICOS

Aspectos generales en el estudio de hemoglobinopatías

En la actualidad, numerosos métodos basados en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) pueden usarse para detectar las variantes de la hemoglobina. Entre ellos, los más utilizados son la ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System* o PCR alelo específica), RE-PCR (amplificación y tratamiento con enzimas de restricción), PCR a tiempo real con análisis de curvas *melting*, pirosecuenciación, secuenciación de Sanger y *dot-blot* reverso (17).

Para el estudio de delecciones y duplicaciones, los métodos más utilizados son la GAP-PCR (por ejemplo, para el estudio de δβ-tal), MLPA (*multiplex ligation-dependent-probe amplification*) y aCGH (*array comparative genoma hybridization*). El método de GAP-PCR está siendo desbancado por estos últimos, ya que pueden detectar nuevas delecciones/duplicaciones, muy útiles en el estudio de las grandes delecciones del clúster β o triplicaciones α, cuando la sospecha clínica sea de β-tal intermedia por coexistencia de β-tal en heterocigosis y triplicación α.

La correcta caracterización de genotipos en portadores es extremadamente importante para realizar un correcto consejo genético y es esencial antes de realizar un diagnóstico prenatal / preimplantacional. Las recomendaciones de la EMQN (2) para el estudio genético de portadores son las siguientes:

- Antes de realizar la prueba genética, evaluar los resultados hematológicos para seleccionar la prueba genética apropiada para cada caso.
- Una vez realizada la prueba genética, reevaluar el caso con los resultados hematológicos.
- Evaluar la historia familiar y hematológica en los casos en los que sea relevante.
- Se recomienda confirmar las alteraciones genéticas en portadores y en el diagnóstico prenatal por dos métodos.
- Si la secuenciación Sanger es el único método disponible, se recomienda que la región diana sea secuenciada por duplicado (si es posible con distintos cebadores) y en ambas direcciones (*forward* y *reverse*).
- Si obtenemos un resultado negativo para el estudio de delecciones/duplicaciones mediante GAP-PCR y hay alta sospecha de variante, se recomienda repetir el estudio mediante la técnica MLPA o aCGH.

Estrategias de estudio genético de -tal

Las hemoglobinopatías más comunes tienen un patrón característico en la población. El espectro y la frecuencia de estas variantes habitualmente se han publicado en la literatura y normalmente están limitados a un determinado número en cada población. Por tanto, es de vital importancia para su estudio el conocimiento del origen étnico para seguir una correcta estrategia diagnóstica.

Es de gran utilidad tener métodos de cribado de las mutaciones más frecuentes en cada población de estudio (según el origen étnico) para optimizar recursos (8,16). Para ello, los métodos más utilizados son la

ARMS-PCR, RE-PCR, Real Time-PCR y pirosecuenciación. Otra opción es la secuenciación del gen de la β -globina por Sanger que permita detectar variantes a lo largo de todo el gen. Para el estudio de grandes delecciones, como la $\delta\beta$ -tal, Hb Lepore o HPHF, podremos utilizar la GAP-PCR o la técnica MLPA para el clúster β .

Se recomienda informar del estudio genético junto a los parámetros hematológicos (hematimetría y estudio de hemoglobinas). Debe de usarse la nomenclatura HGVS (*Human Genome Variation Society*) para evitar ambigüedad entre laboratorios, además de la nomenclatura tradicional. La mayoría de las nomenclaturas podemos encontrarlas en la base de datos HbVar Globin Gene Server (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>.).

Análisis de ADN fetal

En caso de un estudio prenatal, deben obtenerse muestras de sangre de los padres para la realización de un hemograma y un estudio de hemoglobinas y de ADN para confirmar las mutaciones durante el cribado y para su estudio simultáneo con la muestra fetal. En los casos en los que la pareja de la gestante portadora no esté disponible para el estudio, si detectamos en el estudio de la vellosidad coriónica o en el del líquido amniótico que el feto es portador de drepanocitosis o β -tal heredada de la madre, debe secuenciarse el gen completo de la β -globina del feto para excluir una segunda mutación en el gen β . Es recomendable excluir contaminación del ADN fetal con ADN materno mediante kits comerciales que detecten STRs (*short tandem repeat polymorphisms*) (2).

MANEJO, TRATAMIENTO Y NUEVAS TERAPIAS EN LA TALASEMIA MAYOR

Los tratamientos para la β -tal dependen del tipo y de su gravedad. En líneas generales, los pacientes con β -tal mayor requieren transfusiones de sangre debido a la anemia severa y a la inhibición de

la absorción gastrointestinal de hierro. Los pacientes con transfusiones regulares desarrollan manifestaciones clínicas típicas de la sobrecarga de hierro: hipogonadismo (35-55 % de los pacientes), hipotiroidismo (9-11 %), hipoparatiroidismo (4 %), diabetes (6-10 %), fibrosis hepática y disfunción cardíaca (33 %). Por tanto, deben realizarse estudios del metabolismo férrico en pacientes multitransfundidos y evaluar la necesidad y la monitorización de terapia con quelantes de hierro. Además de la sobrecarga férrica, pueden aparecer otras complicaciones derivadas de transfusiones repetidas, como infecciones, reacciones transfusionales, etc. (7,18).

En la actualidad, el único tratamiento que puede curar la talasemia es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (HLA compatible), aunque en los últimos años, gracias al conocimiento de la regulación del clúster de genes de la β -globina, hay numerosos ensayos clínicos basados en la terapia génica con resultados muy prometedores (19).

Las nuevas terapias están basadas en la inserción de genes mediante vectores virales o en la edición de genes mediante la tecnología CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) en células hematopoyéticas autólogas. La inserción de genes mediante vectores virales (retrovirus o lentivirus) se basa en la transferencia de los genes β modificados y en sus secuencias reguladoras en células madre hematopoyéticas autólogas para que se produzcan cadenas β funcionales (20). En junio de 2019 la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y en octubre de 2022 la FDA (Food and Drug Administration) aprobaron la primera terapia basada en la inserción de genes mediante el vector lentiviral que codifica para el gen β^{A-T87Q} -globina en pacientes con β -tal con necesidades transfusionales (19).

Otra estrategia de terapia génica utilizada en ensayos clínicos se basa en el editado del ADN, que consiste en modificar directamente los genes afectados mediante la tecnología CRISPR. Ensayos clínicos recientes se basan en la interrupción del factor de transcripción

BCL11A mediante CRISPR-Cas9, cuya consecuencia será un incremento de expresión de cadenas γ (incrementando la expresión de Hb F) (19).

CONCLUSIONES

El impacto de los fenómenos migratorios de población portadora de hemoglobinopatías desde áreas endémicas a regiones con baja prevalencia ha incrementado significativamente la ratio de portadores y el espectro de mutaciones asociadas a cada área.

Una gran variedad de alteraciones genéticas que afectan al clúster de la β-globina puede dar lugar a numerosos fenotipos clínicos con distintos grados de severidad. Esto ha llevado a algunos países con alta prevalencia a desarrollar sistemas de cribado antenatal y neonatal para la identificación de portadores o afectados. El laboratorio clínico juega un papel fundamental en la identificación de estas variantes, ya que disponemos de las técnicas necesarias (hematimétricas y moleculares) para una correcta caracterización. Además, es importante la evaluación del riesgo asociado a estos pacientes y su descendencia para ofrecer un consejo genético adecuado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD. β-Thalassemias. N Engl J Med 2021;384(8):727-43. DOI: 10.1056/NEJMra2021838
2. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Eur J Hum Genet 2015;23(4):560.
3. Zakaria NA, Bahar R, Abdullah WZ, Mohamed Yusoff AA, Shamsuddin S, Abdul Wahab R, et al. Genetic Manipulation Strategies for β-Thalassemia: A Review. Front. Pediatr 2022;10:901605. DOI: 10.3389/fped.2022.901605

4. Kalle Kwaifa I, Lai MI, Md Noor S. Non-deletional alpha thalassaemia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 2020;15(1):166. DOI: 10.1186/s13023-020-01429-1
5. Bao X, Zuo Y, Chen D, Zhao C. DNA methylation patterns of β -globin cluster in β -thalassemia patients. *Clin Epigenetics* 2020;12(1):187. DOI: 10.1186/s13148-020-00987-2
6. Old J, Timbs A, McCarthy J, Gallienne A, Proven M, Rugless M, et al. New Challenges in Diagnosis of Haemoglobinopathies: Migration of Population. *Thalass Rep* 2018; 8(1):7474.
7. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5(1):11.
8. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med* 2010;12(2):61-76.
9. Thein SL. The molecular basis of β -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(5):a011700. DOI: 10.1101/cshperspect.a011700
10. Ropero R, González Fernández FA, Martínez Nieto J, Torres Jiménez WM, Benavente Cuesta C. β -talasemia intermedia: triplicación de genes α/β talasemia heterocigota en España. *An RANM* 2021;138(01):60-71.
11. Kattamis A, Forni GL, Aydinok Y, Viprakasit V. Changing patterns in the epidemiology of β -thalassemia. *Eur J Haematol* 2020;105(6):692-703. DOI: 10.1111/ejh.13512
12. Eleftheriou A, Angastiniotis M. Global Thalassaemia Review 2021. Thalassaemia International Federation; 2022.
13. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Manson A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010; 149(1):35-49.
14. ENERCA. Recommendations for preconceptional or antenatal screening, prenatal diagnosis and genetic counselling of haemoglobinopathies; 2013.
15. NHS Sickle Cell and Thalassaemia Screening Programme. Hand- book for Antenatal Laboratories; 2017. Disponible en:

<https://www.gov.uk/government/publications/sickle-cell-and-thalassaemia-screening-handbook-for-laboratories>

16. Munkongdee T, Chen P, Winichagoon P, Fucharoen S, Paiboonsukwong K. Update in Laboratory Diagnosis of Thalassemia. *Front Mol Biosci* 2020;7:74.
17. Nurrat M, Moiz B, Nasir A, Rasool Hashmi M. An insight into the suspected HbA2' cases detected by high performance liquid chromatography in Pakistan. *BMC Res Notes* 2011;4:103. DOI: 10.1186/1756-0500-4-103
18. Ali S, Mumtaz S, Shakir HA, Khan M, Tahir HM, et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Mol Genet Genomiz Med* 2021;9:e1788. DOI: 10.1002/mgg3.1788
19. Segura E, Ayoub P, Hart K, Kohn D. Gene therapy for β -Hemoglobinopathies: From Discovery to Clinical Trials. *Viruses* 2023;15;713.
20. Locatelli F, Thompson AA, Kwiatkowski JL, Porter JB, Thrasher AJ, Hongeng S, et al. Betibeglogene autotemcel gene therapy for non- β 0/ β 0 genotype β -thalassemia. *N Engl J Med* 2022;386(5):415-27. DOI: 10.1056/NEJMoa2113206