

TALASEMIA MAYOR EN COSTA RICA A PROPOSITO DE UN NUEVO CASO β SUPRESOR, CON ESTUDIO GENETICO-MOLECULAR

Walter Rodríguez R, * Alfonso Durán, ** Edgar R. Calderón, ***
Mario Chaves, * Gerardo Montero, * German F. Sáenz. *

RESUMEN

En una niña caucásica costarricense, oriunda como sus padres de la ciudad de Cartago, Costa Rica, se demostró que su severa anemia hemolítica era producida por una talasemia mayor (β tal) o enfermedad de Cooley. Los estudios moleculares efectuados posteriormente pusieron en evidencia la existencia de una mutación sin sentido en el segundo exon, codón 39 tipo C->T, la cual provoca interrupción de la traducción, y por lo tanto un fenotipo 13° tal supresor. Este informe constituye el primer caso costarricense de enfermedad de Cooley estudiado con técnicas de biología molecular. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1993; 14 (3, 4): 69-73).

INTRODUCCION

En Costa Rica se ha informado sobre cuatro casos de talasemia mayor (1), diagnosticados fenotípicamente con base en los resultados del hemoglobinograma familiar, según una metodología descrita en una publicación nacional (2).

* CIHATA, Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; Hospital San Juan de Dios.

** Servicio de Oncohematología, Hospital Nacional de Niños, (CCSS).

*** Laboratorio Clínico, Hospital Escalante Pradilla, San José, Costa Rica.

La gran mayoría de lesiones descritas en el gen de la globina β son mutaciones puntuales, que afectan a un solo nucleótido. En los últimos diez años, se ha descrito casi un centenar de mutaciones asociadas con la existencia de una β talasemia. Estas mutaciones afectan la expresión del gen de globina β en todos sus estadios: transcripción, procesamiento, maduración del ARNm y traducción. En el presente caso, se destacan por primera vez los estudios genético moleculares practicados a una familia en la cual se encontró un nuevo caso de β tal mayor. Así mismo, se aplicaron los mismos procedimientos de biología molecular a la última familia en donde habíamos descrito otro caso de enfermedad de Cooley (1).

PRESENTACION DEL CASO

La propositus es una paciente femenina de 4 años de edad, oriunda de la provincia de Cartago. A los 7 meses de edad fue referida al Hospital Nacional de Niños, del Hospital de Cartago, con historia de haber sido hospitalizada en ese hospital a los 4 meses de edad por anemia severa y cuadro infeccioso (bronconeumonía y enfermedad diarreica), documentándose hepatoesplenomegalia al examen físico. Los exámenes de laboratorio en Cartago mostraron: un hematocrito en 22%, las plaquetas en 275.000/mm³, los reticulocitos en 2% y los leucocitos en 18.000/

mm³, con un recuento diferencial normal; 5% de eritroblastos, con una morfología eritrocítica que presentó anisopoiquilocitosis con hipocromía marcada. En su internamiento fue transfundida con glóbulos rojos empacados. Un mes después volvió a cita de control encontrándose una hemoglobina de 6,2 g/dl, con 2% de reticulocitos y un leucograma y plaquetas normales. Hubo discreta hiperbilirrubinemia indirecta y una importante alteración morfológica eritrocítica: macrocitos con basofilia difusa, eliptocitos, esquistocitos, microesferocitos y células en diana.

No hay antecedentes heredofamiliares de anemia. Los padres de la niña están emparentados; son primos hermanos, ambos oriundos de Cartago.

Los estudios en el Hospital de Niños mostraron una hemoglobina en 4,5 g/dl con la siguiente morfología eritrocítica: marcada hipocromía (3+), marcada anisocitosis (4+) dada por macrocitos con basofilia difusa (2+) microcitos (1+), esferocitos (2+), abundantes poiquilocitos hipocrómicos y escasos no hipocrómicos y células en diana (2+).

Se observó un 65% de eritroblastos, con cambios diseritropoyéticos.

Se utilizaron los métodos estándar en hematología (3,4,5). La electroforesis de la Hb se practicó en placas de acetato de celulosa Titán III de la casa Helena, a pH 8,6 en tampón de TEB, de acuerdo con Schneider (6), y en geles de agar ácido (pH 6,2), según Robinson *et al.* (7). La Hb A₂ se cuantificó por microoromatografía con DE-52 (8); la Hb F por desnaturalización alcalina (9), y la Hb F intraeritrocitaria se investigó según el método de Betke, ligeramente modificado (10). Los estudios de biología molecular se basaron en los procedimientos que utilizan oligonucleótidos alélicos específicos sobre un ADN leucocitario enzimáticamente amplificado gracias al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (11). Estos novedosos estudios fueron efectuados, en el Center for Medical Genetics, the Johns Hopkins Hospital, University School of Medicine, por el Dr. Haig H. Kazazian.

Se determinó un patrón electroforético FA₂ (ausencia total de Hb A), Hb en 96,8% y Hb A₂ en 2,5%. Los cuerpos de inclusión intraeritroblásticos fueron positivos (exceso de Cadenas α), y la prueba de la elución de la Hb F eritrocitaria dio un patrón pancrómico, en donde todos los eritrocitos poseían Hb F en mayor o menor grado, tal y como era de esperarse dada la ausencia de Hb A. El hemoglobinograma de los padres, reveló la existencia de β talasemia menor, al constatarse, como análisis de corteza, valores de la Hb A₂ de 5,6% en el padre y de 6,4% en la madre. En ambos, el nivel de la Hb F fue normal.

Los análisis de biología molecular destacaron el hallazgo en el gen β globínico de la familia de una mutación sin sentido en el segundo exon, codón 39 tipo C->T, con lo que se origina un genotipo en el propositus, pues tal mutación produce una supresión total de síntesis de cadenas β A.

Después de confirmarse el diagnóstico de *beta-talasemia mayor de genotipo β^0/β^0* , por el CIHATA, la evolución de la niña hasta el momento ha sido muy satisfactoria. Se ha mantenido con transfusiones cada 3-4 semanas de glóbulos rojos empacados irradiados, filtrados y lavados. No ha tenido ninguna complicación infecciosa hasta el momento y su desarrollo psicomotor es normal.

Finalmente, el reporte médico señala en la actualidad que la niña tiene 4 meses de edad y se reconoce que el tratamiento quelante del hierro se debió haber iniciado después de los 3 años. Lamentablemente no se cuenta con desferroxamina debido a su alto costo, pero se espera que a corto plazo se pueda adquirir. Son muchos los pacientes con distintas hemoglobinopatías (especialmente síndromes drepanocíticos) y otros trastornos hematológicos que requieren de este tratamiento. No debe descartarse un eventual trasplante de médula ósea.

DISCUSION

La β -tal es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, caracterizada por una anemia hipocrómica, la cual adquiere el

carácter netamente hemolítico y de eritropoyesis ineficaz, en el paciente homocigoto o mayor, el cual, por consecuencia, será transfusión dependiente (12). El que se exprese fenotípicamente un determinante beta-tal como supresor (β^0) o depresor (β), dependerá de la severidad de la mutación llevada a cabo, caracterizándose el tipo β^0 por la total ausencia de síntesis de cadenas β (13). Este determinante ya ha sido reportado en Costa Rica en conjunción con la Hb S (14), y en otro caso de talasemia mayor (1, 13). En las aproximadamente 60 kilobases que ocupan el "cluster" de los genes de la globina de tipo β , se han descrito 19 dianas de restricción polimórficas, cuyo estudio simultáneo permite establecer unos determinados haplotipos, habiéndose relatado la existencia de un número muy reducido (alrededor de 10 de ellos), en las distintas poblaciones estudiadas (15). El estudio de la relación de estos haplotipos, con la existencia de determinadas mutaciones del gen de globina beta, pone en evidencia el hecho de que éstas aparecen predominantemente ligadas a un particular haplotipo en las distintas poblaciones estudiadas (16). El empleo de los haplotipos de "cluster" de globinas tipo beta permite efectuar un diagnóstico genotípico tanto directo como indirecto, que requiere además de un estudio familiar (17). El diagnóstico prenatal de la beta-tal, por estos métodos de análisis del ADN, se ha hecho entonces factible gracias a la abundante información disponible referente a las mutaciones o deleciones en el gen, que condicionan la aparición de un fenotipo común que se conoce genéricamente como beta-tal. Actualmente son más de 100 las lesiones moleculares descritas en β -tal (18, 19, 20), siendo principalmente mutaciones de una única base en la secuencia del ADN, capaces de alterar la expresión normal de este gen. Estas lesiones tienen una distribución geográfica o racial determinada, de tal suerte que, en una área concreta en la que el trastorno esté implantado, existe un número limitado de lesiones responsables del trastorno (21). Una propiedad de algunos de

los haplotipos descritos es su alta tendencia a asociarse con determinadas mutaciones beta-tal (3, 15). Este reconocimiento permitió diseñar una estrategia para el diagnóstico prenatal mediante el estudio de la segregación de esos haplotipos en la familia, con un grado variable confiabilidad (22). No es sino hasta hace unos pocos años que es posible hacer el diagnóstico prenatal de la beta-tal de una manera rápida y segura, mediante una estrategia que combina la técnica de amplificación enzimática de un fragmento de ADN, conocido como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (23), y la detección directa de la mutación talasémica sobre el fragmento de ADN amplificado, por medio de hibridación con oligonucleótidos alelo-específicos radiomarcados (24), o no (11, 25, 26). Esta última metodología ha sido la utilizada en el diagnóstico de la lesión molecular beta-tal de las familias estudiadas, una de ellas objeto de este informe.

Dentro de las lesiones β -tal que pueden reconocerse mediante enzimas de restricción y la PCR, se encuentra la lesión en el codón 39 con la mutación C->T, con una distribución frecuente en el Mediterráneo y en otras poblaciones europeas, estando relacionada con los haplotipos I, II, IX y VII (27). Dentro de las alteraciones biosintéticas que logran producir cuadros β talasémicos, existen aquellas en las que un punto de mutación sin sentido "nonsense" provoca la aparición de un ARNm no funcional, tal y como es el caso de la mutante en el codón 39 (C->T), prevalente en las personas caucásicas del Mediterráneo. A propósito, existen aproximadamente unos 20 defectos moleculares en el gen beta en la población mediterránea. Un 50% de ellos se corresponde con el fenotipo clínico de β^0 -tal (27). De éstos, el más frecuente es el β^0 39, hallado en los casos costarricenses que aquí se relatan, y que indica el origen probable de la familia. De las mutaciones detectadas en la población mediterránea, 12 de ellas son muy raras, en tanto que ocho son muy comunes y han sido detectadas en la gran mayoría de las áreas β talasémicas consideradas de alto riesgo. La mutación β^0

39 ha demostrado ser el defecto molecular prevalente en la parte occidental de la cuenca mediterránea, incluida Cerdeña, España y Portugal (27, 28), constituyéndose Cerdeña en un ejemplo extremo de heterogeneidad haplotípica al encontrarse en el contexto de nueve diferentes haplotipos cromosómicos (29). Como regla general, cada una de estas mutaciones está contenida en un heplotipo cromosómico específico. Es alta la asociación entre haplotipos específicos y mutaciones específicas, pero no absoluta, de tal suerte que mutaciones como las β^0 39, β^+ ISV-1 nt 110, β^0 IVS-2 nt, han sido detectadas en diferentes haplotipos (15). En vista de que las mutaciones 3-tal específicas se concentran en diferentes poblaciones, se han establecido para su detección ensayos con oligonucleótidos seleccionados para diferentes regiones geográficas. Así, el ADN genómico amplificado por la PCR es secuencialmente hibridizado con diferentes oligonucleótidos específicos, correspondientes con las mutaciones que son prevalentes en la región de origen de una familia bajo estudio (30).

BIBLIOGRAFIA

- Rodríguez, W.; Jiménez, G.; Calderón, E.; & Sáenz, G. F.: Beta talsemia mayor (Enfermedad de Cooley) por homocigosidad de gene supresor (β^0). *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1989; 2: 75-79.
- Sáenz, G. F.; Chaves, M.; Montero, A.; & Jiménez, J.: Síndromes de beta talasemia menor heterocigota. II. Aspectos analíticos-diagnósticos. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1988; 9: 83-91.
- Dacie, J. V. & Lewis, S. M.: *Hematología práctica*. 2ª Ed. Toray, S. A. Barcelona. 1970, 40-70 p.
- Sáenz, G. F.; Elizondo, J.; Arroyo, G.; Jiménez, J.; Montero, A. G.; y Valenciano, E.: Diagnóstico de hemoglobinopatías y de trastornos afines. Enfoque poblacional del problema. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1981; 90: 127-143.
- Sáenz, G. F.; Chaves, M.; Briceño, J.; Quintana, E.; Arroyo, G.; Valenciano, E.; Montero, A. G.; Jiménez, J.: Polimorfismo de la hemoglobina y de la G6PD eritrocítica en población pre-escolar de Santa Cruz, Guanacaste, Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1985; 6: 126-130.
- Schneider, R. G.: Differentiation of electrophoretically similar Hemoglobina such as S, D, G, and P; or A_2 , C, E, and O by electrophoresis. *Clin. Chem.* 1974; 20: 1111-1115.
- Robinson, A. R.; Robson, M.; Harrison, A. P.; Zulzer, W. W.: A new technique for differentiation of Hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 1975; 50: 745-752.
- Efremov, G. D.; Huisman, T. H. J.; Bowman, K.; Wrightstone, R. N.: Microchromatography of Hemoglobins. II. Rapid method for the determination of Hemoglobin A_2 . *J. Lab. Clin. Med.* 1974; 83: 675-664.
- Singer, K.; Cherrnoff, A. I., Singer, L.: Studies on abnormal hemoglobine. *Blood.* 1951; 6: 413-428.
- Kleihaner, E.: Determination of fetal hemoglobin: elution technique. In: *Standardization of laboratory reagents and methods for the detection of hemoglobinopathies*. Center for Disease Control (CDC), Atlanta, Ga. 1974; 25-30.
- Kulozik, A. E., Lyons, J.; Kohne, E.; Bartram, C. R.; y Kleihaner, E.: Rapid and nonradioactive prenatal diagnosis of β -thalassaemia and sickle cell disease: application of the polymerase chain reaction (PCR). *Brit. J. Haemat.* 1988; 70: 455-458.
- Weatherall, D. J.: The diagnostic features on the different forms of thalassaemia. In: *The thalassaemias*. Churchill-Livingstone, N. Y., 1983; 22-29.
- Sáenz, G. F.; Carrillo, J. M.; Mora, L.: Beta talasemia intermedia de genotipo $\beta^0/(\delta\beta)^0$. Comunicación de un caso. *Sangre.* 1984; 29: 467-472.
- Sáenz, G. F.; Elizondo, J.; Páez, C. A.: Hallazgo del gene β^0 talasémico (supresor) en Costa Rica. V. Síndrome de heterocigosidad doble S/ β^0 -tal. *Sangre.* 1978; 23: 196-201.

15. Orkin, S. H.; Kazazian, H. H.; Antonarakis, S. E.: Linkage of beta-thalassemia mutations and beta-globin gene polymorphism in the beta-globin gene cluster. *Nature*. 1982; 296: 267-269.
16. Kazazian, H. H.; Orkin, S. H.; Markham, A. F.; Chapman, C. R.; Youssofian, H. A.; Waber, P. G.: Quantitation of the close associations between DNA haplotypes and specific β -thalassemia mutations in mediterraneans. *Nature*. 1984; 310: 152-156.
17. Gallano, P.; Baiget, M.; Del Río, E.; Gorodon, E.; Chanem, N.; y Goossens, M.: Caracterización de la inserción de un nucleótido en el gen de la globina β mediante amplificación, electroforesis en geles desnaturalizantes y secuenciación directa. *Biol. Clin. Hematol.* 1991; 13: 127-136.
18. Kazazian, H. H. & Bohn, C. D.: Molecular Basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood*. 1988; 72 (4): 1104-1116.
19. Kazazian, H. H.: The Thalassemia Syndromes: Molecular basis and Prenatal diagnosis in 1990. *Sem. Hematol.* 1990; 27 (3): 209-228.
20. Thein, S. L.; Hesketh, C.; Wallace, R. B.; Weatherall, D. J.: The molecular basis of thalassaemia major and thalassaemia intermedia in Asian Indians: application to prenatal diagnosis. *Brit. J. Haematol.* 1988; 70: 225-231.
21. Kattamis, C.; Hu, H.; Cheng, G.: Molecular characterization of β -thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Brit. J. Haematol.* 1990; 74: 342-346.
22. Waiscoat, J. S.; Work, S.; Sampietro, M.: Feasibility of prenatal diagnosis of β -thalassemia by DNA polymorphisms in Italian population. *Brit. J. Haematol.* 1986; 62: 495-500.
23. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffeel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A.: *Science*. 1988; 239: 487-494.
24. Saiki, R. K.; Bugawan, T. L.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A.: Analysis of enzymatically amplified β globin and HLA-DQ α DNA with allelespecific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986; 324: 163-166.
25. Cai, S. P.; Chang, C. A.; Zhang, J. Z.; Saiki, R. K.; Erlich, H. A. & Kan, Y. W.: Rapid prenatal diagnosis of β thalassemia using DNA amplification and nonradioactive probes. *Blood*. 1989; 73 (2): 372-374.
26. Nieves, M. A.; López, M. A.; De Pablos, J. M.; y Garrido, F.: La reacción en cadena de la polimerasa: Aplicación al estudio de la patología del gene beta de globina. *Biol. Clin. Hematol.* 1990; 12: 121-126.
27. Cao, A.; Gossens, M. & Pirastu, M.: β thalassaemia mutation in Mediterranean population. *Brit. J. Haematol.* 1989; 71: 309-312.
28. De Pablos, J. M.; Nieves, N. A.; López, M. A.; y Garrido, F.: Diagnóstico prenatal de la β talasemia mediante amplificación enzimática del gen β de globina y detección directa de la lesión con oligonucleótidos aleloespecíficos. *Biol. Clin. Hematol.* 1992, 14: 127-133.
29. Pirastu, M.; Kan, Y. W.; Galavella, R.; y Cao, A.: Multiple mutations produce β^0 thalassemia in Sardinia. *Science*. 1984; 223: 929-93.
30. Goossens, M.; Henni, T.: Recombinant DNA Technology in the Diagnosis of hemathologic diseases. *Biol. Clin. Hematol.* 1989; 11: 37-44.