

Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Genética molecular de beta talasémicos heterocigotas. Interrelación con parámetros hematológicos

Irma Margarita Bragós, Néliida Inés Noguera, Mariana Paula Raviola y Ángela Cristina Milani

Resumen

En Argentina no hay datos publicados sobre la interrelación entre el fenotipo de la mutación responsable de b-talasemia (b+ ó b0) y los parámetros hematológicos. En el presente trabajo se estudió las 6 mutaciones más frecuentes en la zona del Mediterráneo en 99 portadores de beta talasemia no relacionados de Rosario y zona de influencia. Los parámetros hematimétricos y la morfología eritrocitaria de sangre periférica de los portadores de beta talasemia no permitieron sospechar una determinada mutación. Se encontró diferencias levemente significativas ($p < 0,10$) entre los valores promedio de HCM para las distintas mutaciones consideradas; para el genotipo b+ I-6 es marginalmente superior que para el genotipo b+ II-745, sin que existan diferencias significativas entre los 4 genotipos restantes estudiados.

Palabras clave: rasgo beta talasémico, parámetros hematológicos, mutaciones.

La beta talasemia es una enfermedad genética que da lugar a la ausencia (b^o) o reducción (b+) de la síntesis de cadena de b globina con el consiguiente desbalance en la relación de cadenas alfa/no-alfa. ¹ El exceso de cadenas de a-globina es el principal responsable de la fisiopatología de la b talasemia.

Son cada vez más numerosos los países que aún sin tener grandes problemas sanitarios por estas patologías, se dedican a conocer su prevalencia y planifican amplias campañas para su detección.

En Cuba los estudios epidemiológicos sobre b talasemia, aunque escasos y fragmentarios, han evidenciado una cierta heterogeneidad genotípica. ²⁻⁶ En Argentina no hay datos publicados sobre la interrelación entre el fenotipo de la mutación responsable de la b-talasemia (b+ ó b0) con los parámetros hematológicos. Debido a esto y dada la ascendencia genética fundamentalmente mediterránea, se estudió las 6 mutaciones más frecuentes responsables de b talasemia en la zona del Mediterráneo, e interrelacionamos el fenotipo de la mutación responsable (b+ ó b0) con los parámetros hematológicos.

Métodos

Se estudiaron 113 pacientes no relacionados de Rosario y zona de influencia (68 mujeres, 30 hombres y 15 niños, mayores de un año de edad), diagnosticados como portadores de beta talasemia por métodos convencionales. El origen étnico de los pacientes fue: 89,3 % italianos, 9,8 % españoles y 0,9 % griegos.

A todas las muestras se les practicaron las siguientes determinaciones:

1. Estudio hematimétrico (Cell Dyn 1400):

- Cuantificación de hemáties, hemoglobina y hematocrito.
- Determinación de los índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM.

- Observación de la morfología eritrocitaria (May Grünwald Giemsa)
- Recuento de reticulocitos. ⁷

2. Metabolismo férrico:

- Dosificación de hierro (a los fines de excluir la deficiencia de hierro) ⁷ y capacidad de saturación de la siderofilina (TIBC.) ⁷
- Determinación de ferritina sérica. ⁸

3. Estudio de hemoglobinas:

- Electroforesis de hemoglobinas en acetato de celulosa a pH 9,0. ⁷
- Electroforesis de hemoglobinas en agar-citrato a pH 6,1. ⁹
- Cuantificación de hemoglobina fetal. ⁷
- Test de cuerpos de inclusión. ¹⁰
- Test de inestabilidad térmica. ¹¹
- Test de anaerobiosis. ⁷

4. Estudios moleculares:

- Extracción de ADN. ¹²
- Caracterización molecular de beta talasemia: PCR-ARMS ¹³ analizando las siguientes mutaciones: b° 1-1, b+ 1-6, b° 2-1, b+ 1-110, b+ 2-745 y b°39.
- Presencia de la delección -a 3,7 y de la triplicación de genes alfa (aaaanti 3,7), ¹⁴ con el objeto de tener una población lo más homogénea posible.

5. Analisis estadístico:

- Estudio comparativo de los genotipos talasémicos b0 y b+ en hombres, mujeres £ 50 años y niños: se aplicó la técnica de análisis de la Varianza a 2 criterios de clasificación (talasemia y grupo) para 6 variables de interés, correspondiente a un diseño no balanceado, dado que los tamaños de las muestras eran diferentes para las combinaciones de talasemia y grupo. ¹⁵ Se verificó mediante pruebas gráficas y tests de hipótesis el cumplimiento de los supuestos necesarios para la aplicación del ANOVA: igualdad de varianzas y normalidad de los residuos para todas las variables bajo estudio. ¹⁶
- Estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados: se utilizó la técnica análisis de la Varianza para un criterio de clasificación para 5 variables de interés correspondientes a un diseño balanceado.

Resultados

Sujetos talasémicos

Un individuo presentó la delección -a3,7, 2 presentaron triplicación de genes alfa (aaa anti 3,7), 2 fueron portadores de db talasemia y 1 presentó doble heterocigosis btal/HbS. Estos 6 individuos fueron excluidos del grupo en el que se estudió la interrelación de los parámetros hematológicos con el genotipo b-talasémico. Se identificaron entonces 107 sujetos no emparentados, portadores de b talasemia heterocigota, con metabolismo de hierro normal y sin asociación con ninguna otra de las patologías de la hemoglobina estudiadas.

Los 113 individuos presentaron tests de cuerpos de inclusión, de inestabilidad térmica y de anaerobiosis negativos, con excepción del paciente con doble heterocigosis btal/HbS que presentó el test de anaerobiosis positivo.

Análisis por biología molecular y morfología eritrocitaria de las distintas mutaciones

IVS-I-nt1 (G® A) (b0): esta mutación fue detectada en el 4,9 % de los casos.

IVS-I-nt6 (T® C) (b+): esta mutación fue hallada en el 2,5 %.

IVS-II-nt1 (G® A) (b0): esta mutación correspondió al 1,6 %.

IVS-I-nt110 (G®A) (b+): esta mutación se detectó en el 22,1%.

IVS-II-nt745 (C®G) (b+): los alelos correspondieron al 4,1 %.

CD39 (T®C) (b0) : esta mutación correspondió al 57,4 %.

Estudiando las 6 mutaciones mencionadas, en 8 sujetos (7,4 %), no fue posible poner de manifiesto la alteración molecular responsable de la b-talasemia.

La morfología eritrocitaria de la sangre periférica fue similar en las distintas mutaciones: anisocitosis con regular cantidad de microcitos, discreta hipocromía, discreta poiquilocitosis y punteado basófilo.

Sujetos b-talasémicos heterocigotas (ba/b+ o b0) con valores de Hb A2 ≥ 4 % y Hb F < 5 % (talasemia menor)

A continuación se exponen los resultados del estudio del grupo de sujetos no relacionados entre sí y con b talasemia heterocigota sin asociación con ninguna otra de las patologías de la hemoglobina estudiadas. Este grupo está formado por 99 sujetos (61 mujeres ≤ 50 años, 25 varones y 13 niños de 1 a 13 años). Se descartaron los 8 individuos en los que no se pudo detectar la mutación responsable de b talasemia.

Cuantificación de hemoglobinas

La tabla 1 recoge los valores obtenidos en las dosificaciones de Hb A2 y de Hb F en el grupo de hombres, mujeres ≤ 50 años y niños portadores de b-talasemia heterocigota (b+ ó b0).

Tabla 1. Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el dosaje de Hb A2 (%) y de Hb F (%) de hombres, mujeres ≤ 50 años y niños con b-talasemia heterocigota (b+ ó b0)

	Hombres				Mujeres ≤ 50 años				Niños			
	b+n 10		b0n 15		b+n 16		b0n		45 b+n 5		b0n 8	
	A2	F	A2	F	A2	F	A2	F	A2	F	A2	F
X	5,4	1,75	5,4	2,4	5,2	2,4	5,2	2,5	5,8	2,9	5,5	2,5
DE	0,67	0,71	0,51	0,97	0,49	0,97	0,67	1,17	0,55	1,03	0,48	1,29
Mín	4,5	0,9	4,4	1,4	4,6	1,4	4,1	0,7	4,9	1,8	4,7	1,2
Máx	6,5	3,2	6,1	4,8	6,1	4,8	6,9	4,9	6,4	4,6	6	4,9

Metabolismo férrico

Los resultados obtenidos en la valoración del patrón férrico en hombres, mujeres ≤ 50 años y niños portadores de b-talasemia heterocigota (b+ ó b0) aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio del patrón férrico de hombres, mujeres ≤ 50 años y niños heterocigotas con b-talasemia heterocigota (b+ ó b0)

	Sideremia (mg/dL)						Transferrina (mg/dL)						Ferritina (ng/mL)					
	Hombres		Mujeres		Niños		Hombres		Mujeres		Niños		Hombres		Mujeres		Niños	
	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0
X	116,9	101,9	102,4	107,2	99	98,6	295,9	296,5	332	301,5	99	98,6	108,9	134,2	75,2	78	63,6	53,4
DE	13,9	16,8	20,6	16,4	23,4	21,6	20,4	18,7	35,3	53,4	40,1	21,6	20,4	45,1	53	27,3	35,6	23,5
Mín	97	80	80	76	75	76	270	261	241	235	75	76	55	60	35	38	40	22
Máx	144	133	126	144	133	134	327	355	396	414	133	134	200	200	135	200	90	88

Estudio hematimétrico

En la tabla 3 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar (DE) de los valores de glóbulos rojos, hemoglobina y hematócrito de hombres, mujeres £ 50 años y niños heterocigotas.

Tabla 3. Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio de GR, Hb y Hto de hombres, mujeres £ 50 años y niños heterocigotas con b-talasemia heterocigota (b+ ó b0)

	GR(1012/L)						Hb(g/dL)						Hto(%)					
	H		M		N		H		M		N		H		M		N	
	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0
X	6,4	6,1	5,3	5,3	5,4	5,8	12,2	11,2	10,5	10,0	9,6	10,1	40	37	34,2	32,3	31,4	33,5
DE	0,6	0,3	0,5	0,4	0,2	0,2	0,96	0,6	0,3	0,5	0,1	0,3	3,0	2,6	1,5	1,6	2,3	1,5
Mín	5,9	5,7	4,7	4,7	5,2	5,6	11,1	10,9	10	10	9,5	9,6	36	34	32	30	29	32
Mx	7,6	6,9	6,1	6,3	5,8	6,1	13,8	12,8	11,2	11,7	10,5	10,9	45	43	36	38	36	36

En la tabla 4 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar (DE) de los valores de VCM, HCM y de CHCM de hombres, mujeres £ 50 años y niños heterocigotas.

Tabla 4. Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el estudio de VCM, HCM y CHCM de hombres, mujeres £ 50 años y niños heterocigotas con b-talasemia heterocigota (b+ ó b0)

	VCM(fL)						HCM(pg)						CHCM(g/dL)					
	H		M		N		H		M		N		H		M		N	
	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0	b+	b0
X	62,2	60,5	64,2	61,1	58,2	57,4	19	18,5	19,6	18,8	17,9	17,4	30,7	30,6	30,7	30,9	30,8	30,4
DE	3,07	2,87	3,73	4,51	2,12	3,93	1,15	0,87	1,34	1,20	0,50	0,99	0,73	1,02	0,60	0,94	1,97	1,15
Mín	59	57	56	57	56	57	17,7	17	17,4	17,5	17	16,2	29,6	28,8	30	28,3	28	29
Máx	67	65	68	66,8	62	64	20,7	19,4	22,2	21,6	18,7	19	31,6	33,1	31,6	31,9	33	32

Recuento de reticulocitos

En la tabla 5 se reseñan los resultados obtenidos del estudio reticulocitario de hombres, mujeres £ 50 años y niños.

Tabla 5. Medición de la tendencia central y variación obtenidas en el recuento de reticulocitos de hombres, mujeres £ 50 años y niños con b-talasemia menor (b+ ó b0)

	Reticulocitos (%)					
	Hombres		Mujeres £ 50 años		Niños	
	b+n 10	b0n 15	b+n 16	b0n 44	b+n 5	b0n 8
X	1,95	2,28	2,03	2,45	1,16	1,53
DE	1,21	0,90	0,99	1,25	0,38	1,14
Mín	0,7	0,7	0,8	0,9	0,8	0,9
Máx	4,2	3,8	4	5,2	1,5	3,4

Análisis estadístico

Estudio comparativo de los genotipos talasémicos b0 y b+ en hombres, mujeres menores de 50 años y niños.

Se estudiaron 15 hombres, 45 mujeres y 8 niños con mutaciones b0 y 10 hombres, 16 mujeres y 5 niños con mutaciones b+.

Se presenta para cada variable estudiada el valor de la media aritmética y su correspondiente error estándar según tipo de talasemia y grupo.

A continuación se presentan las conclusiones extraídas de los correspondientes cuadros ANOVA para cada una de las variables en estudio, considerando un nivel de significación del 5 % y las comparaciones múltiples por el método de Scheffé para el 5 % realizadas cuando corresponde. Cabe destacar que debido a que el diseño del ANOVA es desbalanceado, las medias utilizadas para dichas comparaciones no son medias aritméticas, sino medias calculadas por mínimos cuadrados.

En los modelos planteados fue considerado el término "interacción" entre talasemia y grupo, resultando este no significativo al 5 % en todos los casos.

Glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hb) y hematócrito (Hto)

En la tabla 6 se presentan las medias y errores estándar en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematócrito.

Tabla 6. Valores medios y errores estándar en el recuento de glóbulos rojos ($\times 10^{12}/L$), dosaje de hemoglobina (g/dL) y del hematócrito (%) de los portadores talasémicos

tal	Grupo								
	Hombres			Mujeres < 50			Niños		
	GR	Hb	Hto	GR	Hb	Hto	GR	Hb	Hto
b0	6,06 ± 0,11	11,19 ± 0,20	36,59 ± 0,74	5,30 ± 0,06	10,01 ± 0,12	32,36 ± 0,43	5,82 ± 0,14	10,14 ± 0,28	33,53 ± 1,01
b+	6,42 ± 0,13	12,19 ± 0,25	39,71 ± 0,91	5,35 ± 0,10	10,46 ± 0,20	34,18 ± 0,72	5,38 ± 0,18	9,64 ± 0,35	31,44 ± 1,28

No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos de talasemia. Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ($p=0,00$).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que los promedios para hombres son significativamente mayores que los promedios de las mujeres menores de 50 años y niños, los cuales no difieren.

Volumen corpuscular medio (VCM)

En la tabla 7 se presentan las medias y errores estándar en la medición del VCM.

Tabla 7. Valores medios y errores estándar en la medición de VCM (fL), de HCM (pg) y de CHCM (g/dL) de los portadores talasémicos

tal	Grupo								
	Hombres			Mujeres < 50			Niños		
	VCM	HCM	CHCM	VCM	HCM	CHCM	VCM	HCM	CHCM
b0	60,47 ± 1,29	18,48 ± 0,33	30,66 ± 0,30	61,12 ± 0,76	18,89 ± 0,19	30,95 ± 0,17	57,38 ± 1,77	17,46 ± 0,45	30,36 ± 0,41
b+	61,94 ± 1,59	19,00 ± 0,40	30,66 ± 0,36	64,19 ± 1,25	19,66 ± 0,32	30,68 ± 0,29	58,20 ± 2,24	17,92 ± 0,57	30,82 ± 0,51

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de talasemia.

Existen diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p=0,0207$). De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que el promedio de VCM para niños es significativamente menor que para las mujeres menores de 50 años, y que son estos 2 grupos los únicos que difieren entre sí.

Hemoglobina corpuscular media (HCM)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de talasemia. Existen diferencias altamente significativas entre los grupos estudiados ($p=0,0011$).

De la aplicación de las comparaciones múltiples se concluye que el promedio de HCM para niños es significativamente menor que para las mujeres menores de 50 años, y que son estos 2 grupos los únicos que difieren entre sí.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de talasemia ni tampoco entre los grupos estudiados.

Hemoglobina A2, hemoglobina F y reticulocitos

En la tabla 8 se presentan las medias y errores estándar en la medición de Hb A2, de Hb F y de reticulocitos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos de talasemia ni entre grupos en estudio.

Tabla 8. Valores medios y errores estándar en la medición de Hb A2 (%), de Hb F y de reticulocitos de los portadores talasémicos

tal	Grupo		
	Hombres	Mujeres < 50	Niños

	Hb A2	Hb F	ret	Hb A2	Hb F	ret	Hb A2	Hb F	ret
b0	5,38 ± 0,15	2,42 ± 0,25	2,28 ± 0,30	5,21 ± 0,09	2,51 ± 0,15	2,46 ± 0,17	5,54 ± 0,21	2,51 ± 0,36	1,54 ± 0,41
b+	5,40 ± 0,19	1,75 ± 0,32	1,95 ± 0,36	5,24 ± 0,15	2,04 ± 0,26	2,03 ± 0,29	5,84 ± 0,27	2,90 ± 0,46	1,16 ± 0,51

Estudio comparativo de las mutaciones de los genotipos talasémicos estudiados

Volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), hemoglobina A2 y hemoglobina F

En la tabla 9 se observan valores medios y errores estándar de VCM (fL), de HCM (pg), de CHCM (g/dl), de Hb A2 (%) y de Hb F (%) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos.

Tabla 9. Valores medios y errores estándar de VCM (fL), de HCM (pg), de CHCM (g/dL), de Hb A2 (%) y de Hb F (%) para de las distintas mutaciones de portadores beta talasémicos

Mutación	VCM	HCM	CHCM	Hb A2	Hb F
	Media ± Error Est.				
b+ I-110	62,97 ± 1,12	19,26 ± 0,32	30,61 ± 0,23	5,28 ± 0,11	1,97 ± 0,13
b+I-6	64,00 ± 1,73	19,90 ± 0,68	31,07 ± 0,29	5,37 ± 0,23	3,30 ± 0,85
b+ II-745	56,80 ± 1,97	17,52 ± 0,58	30,85 ± 0,24	5,77 ± 0,29	2,17 ± 0,46
b0 I-1	60,17 ± 2,12	18,55 ± 0,46	30,93 ± 0,68	5,33 ± 0,20	1,90 ± 0,26
b0 II-1	61,50 ± 2,12	18,55 ± 0,25	30,20 ± 1,10	5,05 ± 0,85	2,15 ± 0,15
b0 39	60,35 ± 0,60	18,57 ± 0,15	30,80 ± 0,14	5,25 ± 0,07	2,50 ± 0,14

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de cada una de las variables estudiadas para las 6 mutaciones consideradas. Existen diferencias levemente significativas ($p < 0,10$) entre los valores promedio de HCM para las distintas mutaciones consideradas.

Al aplicar comparaciones múltiples de Newman-Keuls para el 10 % se concluye que el promedio de HCM para el genotipo b+ I-6 es marginalmente superior que para el genotipo b+ II-745, sin que existan diferencias significativas entre los restantes 4 genotipos estudiados.

Discusión

Genética molecular de b talasémicos heterocigotas. Interrelación con parámetros hematológicos

Nuestro estudio consta de 99 sujetos con b-talasemia heterocigota, en los cuales hacemos distinción entre los que se expresan fenotípicamente como b0 ó b+. En estos sujetos se excluyeron las condiciones adquiridas o genéticas como la deficiencia de hierro, la a-talasemia deleción (-a3,7) y la triplicación de genes alfa (anti aaa3,7), los cuales pueden modificar tanto los índices hematimétricos como el nivel de Hb A2

Estudio hematimétrico

Como ya se conoce, los parámetros hematológicos más utilizados para el diagnóstico de una b-talasemia heterocigota son el número de hematíes (GRx10¹²/L), los niveles de hemoglobina (Hb g/dL) para ver el grado de anemia, la hemoglobina corpuscular media (HCM pg) y sobre todo el volumen corpuscular medio (VCM fL), que pone de manifiesto la microcitosis. Se han publicado estudios que han puesto de manifiesto que dependiendo del tipo de mutación responsable de la b talasemia, la magnitud de las manifestaciones hematológicas puede ser variable. ¹⁷⁻²¹

En este trabajo no se encontraron claras diferencias entre estos parámetros si se trata de una b-talasemia con ausencia de síntesis de cadena b globina (b₀) o bien una síntesis reducida (b₊) (tablas 6 y 7). Sí encontramos diferencias levemente significativas ($p < 0,10$) entre los valores promedio de HCM para las distintas mutaciones consideradas, para el genotipo b₊I-6 es marginalmente superior que para el genotipo b₊ II-745, y no existen diferencias significativas entre los restantes 4 genotipos estudiados (tabla 7).

Los datos obtenidos en nuestro estudio concordaron en parte con lo que otros autores han encontrado en otros países y etnias. Rosatelli y colaboradores ¹⁸ en Italia (estudiando 126 portadores y 7 mutaciones), encontraron diferencias significativas en los valores de VCM y HCM, los cuales fueron mayores solo cuando se trató de las mutaciones b₊I-6 y -87 cuando se compararon con mutaciones que producían b₊ y b₀ talasemia.

Stefanis y colaboradores ¹⁹ estudiando en 55 portadores las 3 mutaciones más comunes en Grecia (b₊I-6, b₊I-110 y CD39), no encontraron correlación consistente entre estas y el nivel de Hb, el hematócrito y los índices hematimétricos, solo un ligero aumento del VCM cuando se trató de la mutación b₊I-6.

Tampoco Altay y colaboradores ²⁰ encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de VCM en los rasgos talasémicos asociados con IVS I-110, IVS I-6 y IVS II-1.

Por el contrario, Rund y colaboradores ²¹ en Israel, al estudiar 113 individuos portadores e identificar 18 mutaciones, encontraron que la media del VCM de los portadores de b₀ talasemia fue significativamente más baja que la de los portadores de b₊ talasemia; las distintas mutaciones b₊ fueron asociadas con diferencias significativas en los valores de VCM, y por el contrario, todas las mutaciones b₀ tuvieron rangos idénticos de VCM, lo que indica que el grado de reducción en el VCM está directamente relacionado con la severidad de la mutación. Esta conclusión permitiría usar este parámetro para planear estrategias para la rápida identificación de la mutación en poblaciones con gran diversidad de mutaciones.

En nuestra población, que presenta poca diversidad de mutaciones y donde no hallamos una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de VCM para los 6 genotipos estudiados (tabla 9), planificamos el estudio molecular basándonos solamente en la frecuencia que estos genotipos presentaron.

Recuento de reticulocitos

Los valores de reticulocitos no fue un parámetro diferenciador entre b₊ y b₀-talasemia (tabla 8); en algunos casos, el número de reticulocitos en sangre periférica fue algo elevado, coincidiendo con un mayor grado de anemia.

Cuantificación de hemoglobinas

La elevación de Hb A₂ es la característica más importante en la identificación de heterocigotas b-talasémicos. Sin embargo, algunos portadores pueden tener Hb A₂ normal o en el límite inferior del rango para un portador; un ejemplo de esta categoría es la de los portadores de la mutación b₊ I-6. ^{22, 23} En todos los individuos heterocigotos donde nos fue posible identificar la mutación, el nivel de Hb A₂ fue aproximadamente el doble del rango normal. En nuestro estudio, donde solo identificamos 2 individuos con la mutación b₊ I-6, la Hb A₂ de estos fue de 5,5 y 4,9 %, o sea, valores superponibles con la media hallada en los portadores de una mutación b₊ (tabla 1).

Las diferencias encontradas en los niveles de HbA₂ para el fenotipo b₊ versus b₀ no resultaron significativas (tabla 8), como las descritas por Rund y colaboradores, ²¹ donde los niveles de HbA₂ para b₀ (5,13 % ± 0,9) frente a b₊ (4,3 % ±

1,2) sí presentaron diferencias significativas ($p=0,008$).

Altay y colaboradores, 20 al igual que nosotros (tabla 9), encontraron que el aumento de Hb A2 no se correlaciona con la severidad de la mutación responsable de b-talasemia, dado que solo hallaron valores significativamente más altos de Hb A2 en pacientes portadores de la mutación b0 II-1 cuando se compararon con individuos portadores de la mutación b+ I-6.

Para Rosatelli y colaboradores, 18 los niveles de HbA2 solo resultaron más bajos en los heterocigotas para las mutaciones b+ I-6 y b+ I-110 cuando se compararon con los fenotipos b039, b+ I-1 y b+ II-745. Este hallazgo no pudo relacionarse con la severidad de la mutación, ya que el menor aumento fue visto tanto en una mutación suave (IVS I-6) como en una severa (IVS I-110).

Por su parte, Stefanis y colaboradores, 19 solo encontraron diferencias estadísticamente significativas al hallar valores más bajos de Hb A2 en pacientes portadores de la mutación b+ I-6 cuando se compararon con pacientes portadores de IVS I-110 y CD39.

Los niveles de HbF en los beta talasémicos heterocigotas generalmente están alrededor del 2 %, pero hay un porcentaje en que estos niveles está por encima del 2,5 %. ²⁴

Kutlar y colaboradores, 22 en una población mediterránea y estudiando las mismas 6 mutaciones que nosotros, asociaron niveles altos de Hb F con las mutaciones IVS I-2 e IVS II-1.

En nuestro trabajo, los valores de Hb F encontrados en las mutaciones b+ y b0 no fueron lo suficientemente significativos para establecer diferencias entre los genotipos (tabla 8), sin embargo, se observa en nuestros datos (tabla 9), un moderado aumento (por encima del 2,5 %) en los niveles de HbF en los portadores de las mutaciones CD 39 y IVS I-6, algo similar a lo publicado por Vrettou y colaboradores, 24 quienes encontraron que el 73 % de los portadores talesémicos con Hb F > 2,5 %, presentaban las mutaciones CD 39, IVS II-1, codon 6 (-A) y codon 8 (-AA), implicando una asociación entre las mutaciones y el moderado aumento en los niveles de Hb F.

Stefanis y colaboradores 19 también encontraron diferencias significativas, pues encontraron niveles más altos de Hb F en pacientes CD39 heterocigotas (2,31 % \pm 1,52) cuando se compararon con heterocigotas IVS I-6 (0,79 % \pm 0,45) y portadores de IVS I-110 (1,17 % \pm 0,75), siendo esta la primera vez que se reportó un ligero aumento en el nivel de Hb F en heterocigotas CD39.

Es importante destacar que en los trabajos publicados, las determinaciones de los niveles de Hb A2 y de Hb F se llevaron a cabo mediante la técnica de high performance liquid chromatography (HPLC).

Metabolismo férrico

El estudio del metabolismo férrico fue realizado para descartar que la anemia microcítica e hipocrómica que presentaban este grupo de pacientes, fuera debida al progresivo descenso de la síntesis de hemoglobina, como consecuencia del agotamiento de las reservas de hierro. Se observó que los niveles de ferritina fueron normales. Lo mismo se observó con la sideremia y la TIBC (tabla 2).

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Sra. Liria Vogel por la organización de las muestras de sangre; a la Profesora Dra. Ana Villegas del Servicio de Hematología y Hemoterapia, del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España y a la Dra. Cristina Rosatelli de la Universidad de Cagliari, Cerdeña, Italia, por proveernos de muestras de DNA con mutaciones conocidas. Este trabajo fue financiado en parte por la Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

Referencias bibliográficas

1. Weatherall DJ, Clegg JB. En: The thalassemia syndromes. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1981. p. 150-85.
2. Varela V, Abreu S, Rossetti L, Targovnik H. Mutaciones b-talasémicas más frecuentes en la población argentina. *Sangre* 1996;41:137-40.
3. Varela V, Rossetti LC, Binaghi A, Targovnik HM, Abreu MS. Molecular genetics of the thalassemias in Argentina. *Sangre (Barc)* 1999;44:210-5.
4. Soria N, Tulián C, Plassa F, Roth G. b-thalassemia and hemoglobin types in Argentina: Determination of most frequent mutations. *Am J Hematol* 1997;54: 160-3.
5. Roldán A, Gutiérrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Feliú Torres A. Molecular characterization of b-thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* 1997;54:179-82.
6. Bragós I, Noguera N, Morisoli L, Milani A. Most frequent mutations in b-thalassemia in a population in Rosario, Argentina. *Haematológica* 2000;85:101-2.
7. Evatt B, Lewis SM. Anemia: hematología para un diagnóstico básico. Organización Panamericana de la Salud. Washington. N° 14; 1986. p. 78-114.
8. Van Suijlen JD, van Noord PC, Leijnse B. Accuracy of serum ferritin determinations in tissue preparations and human serum. *J Clin Chem Biochem* 1990;28:43-8.
9. Milner PF, Gooden HM. Rapid citrate-agar electrophoresis in routine screening for hemoglobinopathies using a simple hemolysate. *Am J Clin Pathol* 1975;64: 58-64.
10. Papayannopoulou T, Stomatoyannopoulos G. Stains for inclusion bodies in the detection of hemoglobinopathies. Schmidt RNI, Huisman THJ, Lehmann (eds.) Cleveland: H. CRC Press; 1974. p. 32-8.
11. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclei Acids Res* 1988;16:1215.
13. Old JM, Varawalla NY, Weatherall D. Rapid detection and prenatal diagnosis of b thalassaemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the U.K. *Lancet* 1990: 336:834-7.
14. Smetanina NS, Huisman THJ. Detection of common deletion α -thalassaemia-2 determinants by PCR. *Am J Hematol* 1996;53:202-3.
15. Steel R, Torril J. Bioestadística: principios y procedimientos. 2 ed. Bogotá: Mc Graw-Hill Latinoamericana, S.A., 1985. p. 177-97.
16. Montgomery D. Design and analysis of experiments. 2 ed. New York: John Wiley and Sons; 1991. p. 202-34.
17. Tamagnini GP, Lopes MC, Castanheira ME, Wainscoat JS, Wood WG. b⁺-thalassaemia Portuguese type: Clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of b thalassaemia. *Br J Haematol* 1983;54:189-200.
18. Rosatelli C, Leoni GB, Tuveri T, et al. Heterozygous b-thalassemia; relationship between the hematological phenotype and the type of b-thalassemia mutation. *Am J Hematol* 1986;39:1-4.
19. Stefanis L, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Metaxotou-Mavromati A, Katamis C. Hematologic phenotype of the mutations IVS I nt 6 (T@C), IVS I-nt 110 (G @A and CD39 (C@T) in carriers of b-thalassaemia in Greece. *Pediatr Hematol Oncol* 1994;11:509-17.
20. Altay C, Gurgey A. b-thalassemia intermedia in Turkey. *Ann NY Acad Sci* 1990: 612:81-9.
21. Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A. Mean corpuscular volume of heterozygotes for b-thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* 1992;79:238-43.
22. Kutlar A, Kutlar F, Gu L, Mayson N, Huisman THJ. Fetal hemoglobin in normal and b-thalassemia heterozygotes. *Hum Genet* 1990;85:106-10.
23. Galanello R, Barella S, Ideo A, et al. Genotype of subjects with borderline HbA₂: implication for beta thalassemia carrier screening. *Am J Hematol* 1994;46:79-81.
24. Vrettou C, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, et al. Molecular studies of beta thalassemia with raised Hb F levels. *Hemoglobin* 2000;24:203-20.

Dra. *Irma Margarita Bragós*. Cátedra de Hematología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. 2000 Rosario, Santa Fe, Argentina. Tel. 54-341-4804592/3 int 247. Fax: 54-341-4804598. e-mail: ibragos@fbioyf.unr.edu.ar