

UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

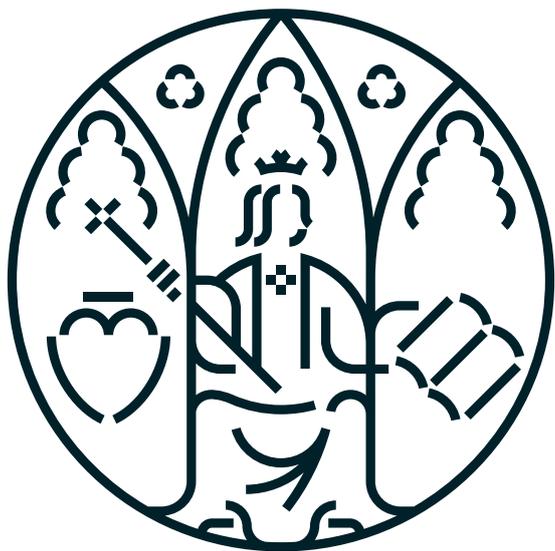
TESIS DOCTORAL

*Caracterización molecular y funcional de
las anemias congénitas*

AUTOR/A María Sánchez Villalobos

DIRECTOR/ES Eduardo José Salido Fierrez
Ana Belén Pérez Oliva

2024



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Caracterización molecular y funcional de
las anemias congénitas*

AUTOR/A María Sánchez Villalobos

DIRECTOR/ES Eduardo José Salido Fierrez
Ana Belén Pérez Oliva

2024



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D^a. María Sánchez Villalobos , habiendo cursado el Programa de Doctorado Integración y Modulación de Señales en Biomedicina de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Caracterización molecular y funcional de las anemias congénitas

y dirigida por:

D.: Eduardo José Salido Fierrez

D^a.: Ana Belén Pérez Oliva

D.:

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 07 de diciembre de 2024

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD** debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis dos directores de tesis el apoyo, la dedicación y la oportunidad de profundizar en el área más bonita de la hematología, la eritropatología. A la Dra Ana Belén, me gustaría agradecerle que confiara en una residente de hematología de cuarto año a la que apenas conocía para pedir un contrato Rio Hortega, por el que he podido terminar la tesis y conocer un campo totalmente desconocido para mí, la investigación básica. Al Dr Eduardo Salido, mi modelo a seguir, al que le prometí un párrafo de esta tesis para él solo, solo decirle que me faltarían párrafos para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, desde quitar el armario del despacho hasta la maniobra de Heimlich.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mis compañeras de laboratorio Laly, Elena, Miriam y Vero su paciencia para recordarme mil veces el orden de los anticuerpos y el funcionamiento de los “chismes”, y nuestra querida “hora de la tostada”. Me gustaría hacer mención especial a mi compañera de fatigas y de la “hora del Western” y a la que tengo el honor de llamar amiga, Laly. Solo darte las gracias por venir a Coímbra a ver el jardín de las lágrimas conmigo, nunca lo olvidaré.

En tercer lugar, dar las gracias al servicio de Hematología del HCUVA, al que considero mi familia, y en especial a mis chicos de la Unidad Eritroendotelial, sin los que no me imagino yendo a trabajar cada mañana.

Por último, agradecer a mi familia el cariño y el apoyo incondicional que me han dado durante toda mi vida.

Gracias.

"El secreto, querida Alicia, es rodearse de personas que te hagan sonreír el corazón. Es entonces y sólo entonces que estarás en el País de las Maravillas".

Lewis Carroll, Alicia en el País de las Maravillas, 1865

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	7
Introducción	11
1. Eritropoyesis.....	13
1.1 Eritropoyesis dependiente de Eritropoyetina.	
1.2 Eritropoyesis dependiente de hierro.	
2. Inflamasoma.....	19
2.1 Activación.	
2.2 Inflamasoma NLRP1	
2.3 Inflamasoma y eritropoyesis.	
3. Enfermedad de células falciformes.....	23
3.1 Epidemiología.	
3.2 Diagnóstico.	
3.3 Fisiopatología.	
3.4 Evolución clínica y complicaciones asociadas.	
3.5 Tratamiento actual.	
3.6 Opciones futuras de tratamiento: Terapia génica.	
4. Talasemia.....	35
4.1 Epidemiología.	
4.2 Diagnóstico.	
4.3 Fisiopatología.	
4.4 Complicaciones clínicas.	
4.5 Tratamiento actual.	
4.6 Otras terapias en ensayo clínico.	
5. Anemia congénita sideroblástica.....	46
5.1 Síntesis del grupo hemo en el eritroblasto.	
5.2 Síntesis del complejo Fe-S.	
5.3 Genes implicados en la síntesis de la cadena respiratoria mitocondrial.	
Objetivos	57
Materiales y métodos	61
1. Análisis de variantes de hemoglobina en el cribado neonatal.....	63
2. Cultivo celular.....	66
3. Obtención de células mononucleadas en sangre periférica y diferenciación eritroide.....	67
4. Ensayo de unidades formadoras de colonias eritroides.....	67

5. Mutagénesis.....	68
6. Citometría de flujo.....	68
7. Evaluación de la oligomerización de ASC mediante citometría de flujo.....	68
8. Inmunofluorescencia.....	68
9. Inmunotransferencia (Western Blot).....	69
10. Secuenciación de nueva generación (NGS).....	70
11. Ensayo de Specks.....	70
12. Ensayo de inducción de ferroptosis.....	71
13. Secuenciación de ARN.....	71
14. Control de calidad y alineación con el genoma de referencia.....	71
15. Cuantificación de la expresión.....	72
16. Análisis de componentes principales y análisis de expresión diferencial.....	72
17. STRING.....	73
18. Análisis estadísticos.....	73

Capítulo 1: Cribado neonatal de hemoglobinopatías en la Región de Murcia

Resultados.....	77
Discusión.....	85

Capítulo 2: Papel del inflammasoma en la anemia sideroblástica congénita

Resultados.....	91
1. Implicación de NLRP1 en la etiopatogenia de la anemia congénita sideroblástica.	
2. La inhibición del inflammasoma aumenta la formación de eritrocitos en un paciente con anemia congénita sideroblástica.	
3. Una nueva variante de NLRP1 encontrada en un paciente con anemia congénita sideroblástica más activa que la variante silvestre.	
4. La ferroptosis contribuye al procesamiento de NLRP1 y a la gravedad del fenotipo de la anemia sideroblástica.	
Discusión.....	105

Capítulo 3: Análisis transcriptómico en sangre total de pacientes con anemias congénitas

Resultados.....	113
1. Perfil de expresión génica de diferentes anemias congénitas respecto a donantes sanos.	
2. El paciente con anemia congénita sideroblástica muestra un patrón de expresión distinto en genes relacionados con la eritropoyesis y el metabolismo del hierro.	
3. Patrón de expresión de <i>BPGM</i> en los diferentes tipos de anemias congénitas.	
4. Diferencias de expresión en los genes relacionados con el estrés oxidativo entre las diferentes anemias congénitas.	

5. Diferencias significativas en genes relacionados con la expresión de proteínas estructurales de membrana entre las distintas anemias congénitas.
6. Otras vías alteradas en las anemias congénitas.

Discusión.....	133
Conclusiones.....	139
Conclusions.....	143
Bibliografía.....	147
Summary.....	169
Anexo I.....	173
Anexo II.....	177

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACS: Anemia congénita sideroblástica

ASC: Proteína tipo speck asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa

ADN mit: ADN mitocondrial

AE1: Proteína transportadora aniones o Banda 3.

ALA: Ácido δ -aminolevulínico

ALAS: δ -aminolevulinato sintetasa

AR: Autosómica recesiva

ARN t: ARN de transferencia

ATP: Adenosín trifosfato

Baso-E: Eritroblasto basófilo

BCAM: Molécula de adhesión celular basal

BFU-E: erythroid burst-forming units

BMP: Proteínas morfogénicas óseas

2,3-BPG: 2,3-bifosfoglicerato

CASP1: Caspasa-1

CC: Homocigoto para hemoglobina C

CFU-E: erythroid colony-forming units

COA: Succinil-coenzima A

CMF: Citometría de flujo

CVO: Crisis vasooclusivas

DAMPs: señales de daño celular endógeno

DMO: Densidad mineral ósea

ECF: Enfermedad de células falciformes

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas

EPO: Eritropoyetina

EPOR: Receptor de eritropoyetina

ERFE: Eritroferrona

FAC: Heterocigoto o portador para hemoglobina C

FAS: Heterocigoto o portador para hemoglobina S

FECH: Ferroquelatasa

GLRX5: Glutaredoxina 5

GSH: Glutación

Hb: Hemoglobina
HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
HbF: Hemoglobina fetal
HIF-1: Factor inducible por hipoxia-1
HMGB1: Proteína B1 del grupo de alta movilidad
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HSP70: Proteína de choque térmico 70
ICAM1: Molécula de adhesión intercelular 1
IRE: Elementos dependientes del hierro
IRP: Proteínas reguladoras de hierro
IST: Índice de saturación de transferrina
LARS2: Leucil-RNAt sintetasa 2
LDH: Lactato deshidrogenasa.
LPI: Hierro plasmático libre
LPS: Lipopolisacárido
MO: Médula ósea
MLPA: Amplificación de sondas tras ligación múltiple
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
NDUFB11: NADH subunidad ubiquinona oxidoreductasa B11 mitocondrial
NO: Óxido nítrico
NLRs: NOD-like receptors
NTDT: Talasemia no dependiente de transfusión
Ortho-E: Eritroblasto ortocromático
PAMPs: Moléculas asociadas a patógenos
PBMCs: Células mononucleadas en sangre periférica
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PGE2: Prostaglandina E2
PGF: Factor de crecimiento placentario.
PPgen IX: Protoporfirinógeno:
PPHH: Progenitores hematopoyéticos
Poly-E: Eritroblasto policromatófilo
PPP: Pentosas fosfato
Pro-E: Proeritroblasto

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
PUS1: Pseudouridina sintetasa 1
ROS: Radicales de oxígeno
RN: Recién nacidos
RST: Receptor soluble de transferrina
SC: Doble heterocigoto para hemoglobina S y hemoglobina C
SCF: Factor estimulante de colonias
SS: Homocigoto para hemoglobina S
TDT: Talasemia dependiente de transfusión
TGFβ: Factor de crecimiento transformante β
TI: Talasemia intermedia
TM: Talasemia mayor
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRNT1: tRNA nucleotidil transferasa 1
VCAM1: Proteína de adhesión celular vascular 1
VCM: Volumen corpuscular medio
VEGFR1: Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular
WT: Silvestre
YARS2: Tirosil-RNA_t sintetasa

RESUMEN

Las anemias congénitas se clasifican en dos grandes grupos: anemias hemolíticas por alteraciones intrínsecas del hematíe y anemias por insuficiencia medular. Dentro del primer grupo se incluyen: las membranopatías, enzimopatías y hemoglobinopatías, encontrando dentro de este último subgrupo a la enfermedad de células falciformes (ECF) y a las talasemias; incluyendo en el segundo grupo a la anemia congénita sideroblástica (ACS) y a la anemia diseritropoyética congénita.

Son enfermedades con afectación multisistémica y gran variedad fenotípica, en la que pacientes con una misma mutación pueden presentar desde anemias leves-moderadas hasta anemias severas con dependencia transfusional desde la infancia. A pesar de conocer bien su etiología, hay muchos factores desconocidos asociados a dicha heterogeneidad clínica, siendo necesario profundizar en el estudio de estos posibles moduladores de la enfermedad para conseguir un mayor entendimiento de la firma génica de estos pacientes. Son enfermedades raras, frecuentemente infradiagnosticadas, lo que dificulta el estudio sobre la verdadera incidencia poblacional de estas enfermedades.

En este trabajo, intentaremos profundizar en el estudio de la ECF, la ACS y la talasemia, tratando de esclarecer algunas de las cuestiones planteadas.

Como se ha comentado, la ECF es una hemoglobinopatía, de transmisión autosómica recesiva, caracterizada por presentar un estado inflamatorio crónico y crisis vaso-oclusivas de repetición, presentando daño multiorgánico y alta mortalidad infantil. De la necesidad de instaurar un tratamiento precoz y debido al incremento de población endémica en nuestro país, se instaura en 2016 en la Región de Murcia el cribado neonatal. En este estudio, hemos tratado de determinar la incidencia de la ECF y de evaluar su beneficio en la población neonatal de la Región de Murcia. La prevalencia de la ECF en nuestra región ha resultado similar a la de otras regiones de España excepto Madrid y Cataluña, con mayor flujo migratorio. Todos los recién nacidos con ECF recibieron atención terapéutica precoz y todas las parejas de portadores consejo genético.

Dentro del grupo de las anemias por insuficiencia medular, encontramos como se ha descrito la ACS. La ACS engloba un grupo heterogéneo de trastornos hematopoyéticos raros y hereditarios que se caracterizan por un acumulo de hierro mitocondrial en los precursores eritroides, lo que conlleva a una sobrecarga férrica y eritropoyesis ineficaz características de esta enfermedad. Recientemente, se ha descrito en modelo animal, que la inhibición de NLRP1 puede tener un impacto significativo sobre la eritropoyesis. Así, en este estudio hemos tratado de caracterizar la posible implicación del inflammasoma en

la fisiopatología de un paciente con ACS por mutación en el transportador mitocondrial *SLC25A38*. Con este estudio, hemos demostrado, por un lado, que la inhibición del inflammasoma aumenta la formación de eritrocitos en un paciente con ACS por mutación en el gen *SLC25A38*; y, por otro lado, hemos identificado en dicho paciente por NGS una variante de *NLRP1* que en combinación con otros factores como la ferroptosis podría agravar su fenotipo clínico, aportando así datos significativos sobre la posible implicación del inflammasoma en la ACS.

A pesar de sus diferentes etiologías, las hemoglobinopatías (ECF y talasemias) y la ACS tienen como origen fisiopatológico común la alteración congénita en la eritropoyesis. Para profundizar en su estudio, hemos analizado el transcriptoma de diez pacientes con talasemia, cuatro pacientes con ECF y un paciente con ACS por medio de la técnica Quant 3' mRNA-Sequencing. Nuestros resultados han demostrado una expresión claramente diferenciada entre pacientes y controles sanos, revelando una expresión incrementada en los genes relacionados con el metabolismo glucolítico y oxidativo, genes de membrana y eritropoyesis en todos los pacientes estudiados a excepción del paciente con ACS, que muestra un patrón de expresión génica único en comparación con el resto de las anemias congénitas estudiadas.

INTRODUCCIÓN

1. ERITROPOYESIS

La eritropoyesis es un proceso que dura en torno a 14 días en el que se generan eritrocitos maduros a partir de progenitores hematopoyéticos indiferenciados. Se divide en dos etapas principales: una primera fase de diferenciación, en el que la célula madre multipotente se compromete a línea eritroide; y una segunda fase de maduración que engloba desde el progenitor eritroide hasta la salida a sangre periférica del reticulocito enucleado y su maduración terminal a eritrocito maduro.

La fase de diferenciación comienza con la primera célula progenitora comprometida a línea eritroide, la BFU-E (*erythroid burst-forming units*), que se diferencia en CFU-E (*erythroid colony-forming units*). Ambos progenitores no son identificables a nivel morfológico, pero son capaces de formar colonias en medios semilíquidos como la metilcelulosa (1).

La segunda fase comienza con la maduración de CFU-E en proeritroblasto, primera célula eritroide morfológicamente identificable en médula ósea (MO). Se trata de una célula de gran tamaño, núcleo grande redondeado con nucleolos y citoplasma intensamente basófilo. En el proceso de maduración, se produce de forma gradual la reducción del tamaño celular, disminución de la relación núcleo-citoplasma, picnosis del núcleo hasta su expulsión y la pérdida de basofilia citoplasmática. Así, a partir de proeritroblasto identificamos el eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático y reticulocito, el cual tras permanecer 24 horas en MO es liberado a sangre periférica donde terminará el proceso de diferenciación a eritrocito maduro (**figura 1**). Junto con los cambios morfológicos, el eritroblasto va produciendo hemoglobina (Hb) a medida que va madurando mediante la síntesis de cuatro cadenas polipeptídicas de globina y cuatro moléculas de grupo hemo (1–3).

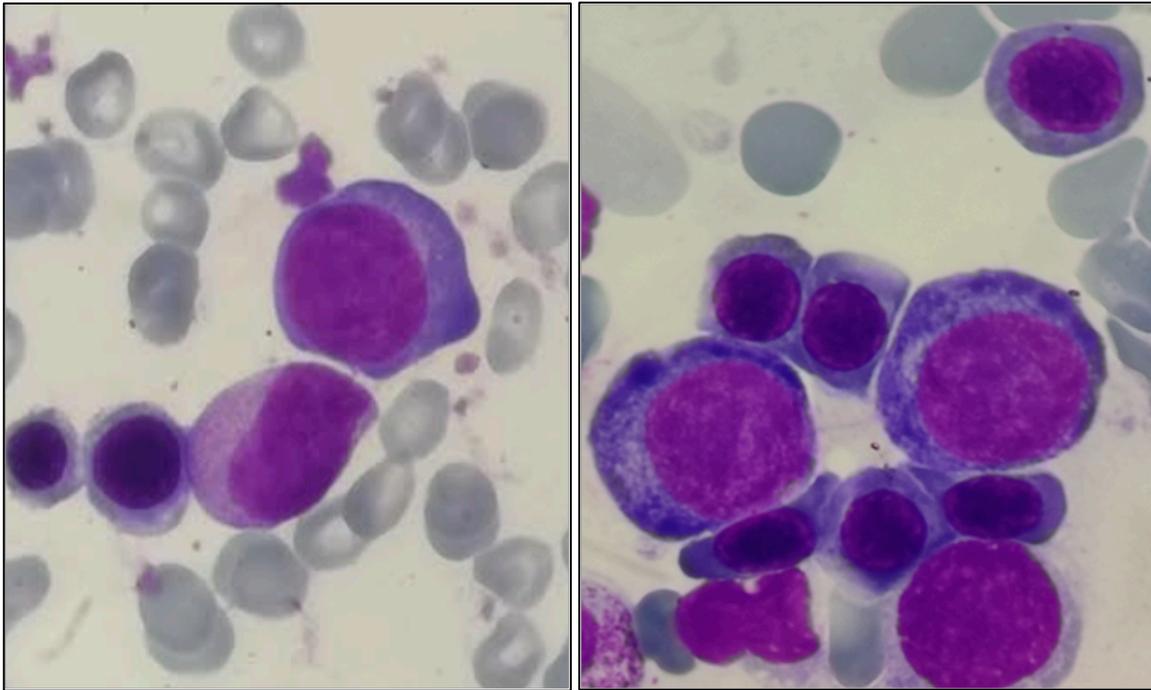


Figura 1. Extensión de médula ósea (tinción de May-Grünwald Giemsa; objetivo 50X). En ambas imágenes aparecen representados los diferentes estadios madurativos del eritroblasto a nivel medular.

Paralelamente, la expresión de los antígenos de membrana también va cambiando, lo que nos permite realizar el seguimiento del proceso de maduración eritroide por citometría de flujo (CMF). Así, diferenciamos los progenitores eritroides basándonos en la expresión gradual de los antígenos de superficie CD34/CD36/CD71 y CD105 en células CD123 (receptor de IL-3) negativas, en combinación con la expresión de glicoforina A (CD235A) y CD105 o alternativamente banda 3/SLC4A1 (CD233) y la pérdida progresiva de CD49d (1–4) (**figura 2**).

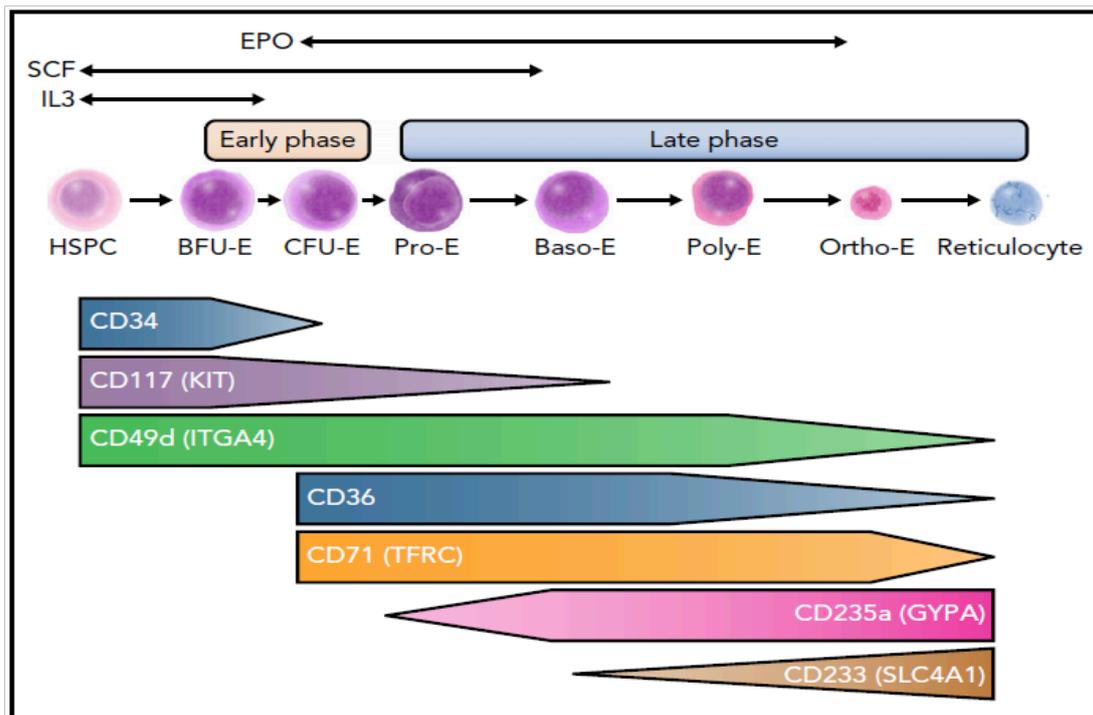


Figura 2. Representación de la eritropoyesis. En una fase inicial o temprana de la eritropoyesis la célula madre hematopoyética multipotente da lugar a los primeros progenitores comprometidos a línea eritroide, las unidades formadoras de colonias (BFU-E y CFU-E). En una segunda fase o fase de maduración mediada por eritropoyetina (EPO), la CFU-E se diferencia en proeritroblasto (Pro-E) el cual se diferenciará de manera secuencial en los diferentes estadios madurativos: eritroblasto basófilo (Baso-E); eritroblasto policromatófilo (Poly-E) y eritroblasto ortocromático (Ortho-E) (1).

Este proceso de eritropoyesis está regulado por numerosas vías de señalización y factores de transcripción. El inicio de la eritropoyesis o eritropoyesis temprana es dependiente de eritropoyetina (EPO), mientras que el proceso de diferenciación y maduración final es regulado principalmente por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el hierro.

1.1 Eritropoyesis dependiente de Eritropoyetina

La EPO es fundamental en la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en médula ósea, disminuyendo rápidamente con la maduración eritroide terminal. En el progenitor, el reconocimiento de la EPO por su receptor de membrana EPOR induce la activación de la vía JAK2/STAT3/STAT5, incrementando la expresión de genes implicados en la supervivencia, proliferación y diferenciación eritroide. Así, en un primer paso la asociación EPO/EPOR activa la expresión de las quinasas MAPK, JAK2 y PI3K e inhibe la expresión de hepcidina, favoreciendo la utilización del hierro

por los eritroblastos. A continuación, STAT3 y STAT5 fosforilados se activan favoreciendo: la producción de eritroferona (ERFE), el incremento de expresión del gen regulador de la apoptosis BCL-X y la traslocación al núcleo de NRD. Paralelamente, por medio de STAT5 se inhibe BIM, NOXA, Fas y FasL, proteínas proapoptóticas favoreciendo la supervivencia de los progenitores eritroides. De forma fisiológica, cuando la producción de los eritrocitos es adecuada, STAT3 regulado por la vía EPO-JAK2 sufre una rápida inhibición por fosfatasas y por la proteína SOCS siendo degradado vía proteasoma para prevenir su hiperactividad (5,6) (**figura 3**).

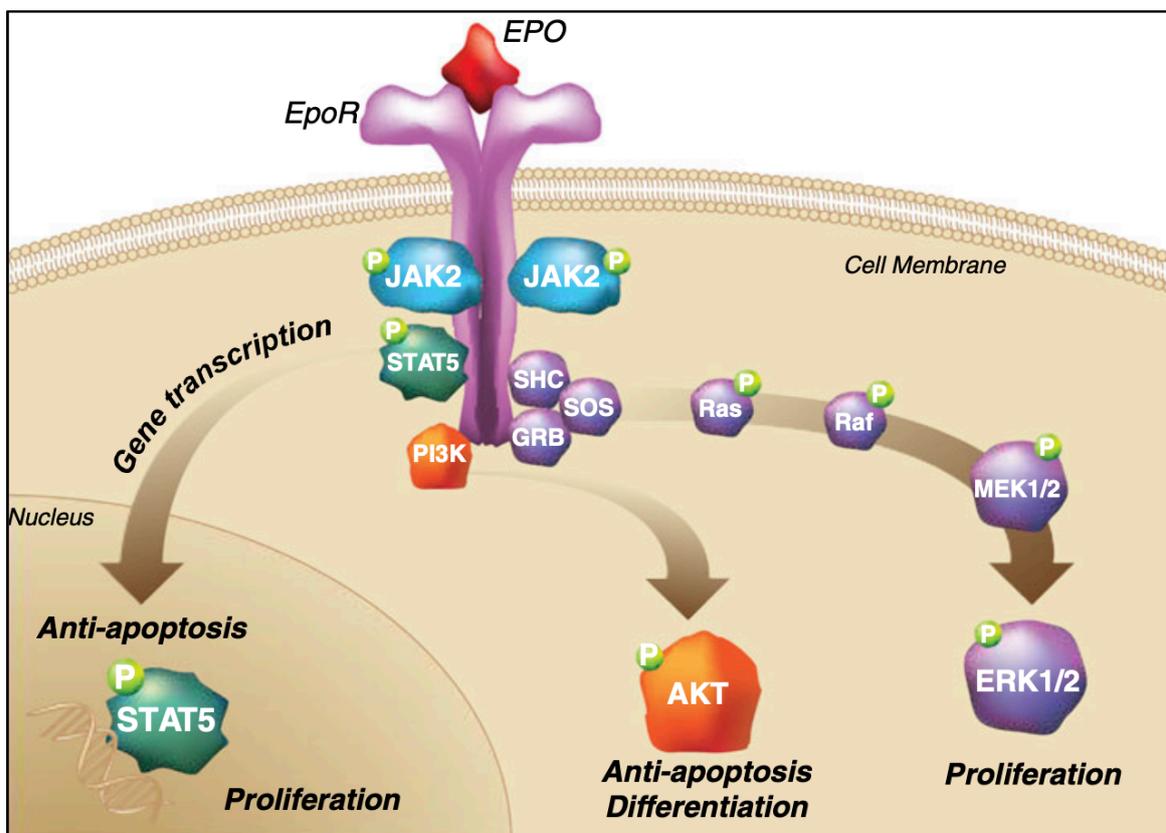


Figura 3. Representación esquemática de la implicación del sistema del sistema EPO/EpoR en la regulación de la eritropoyesis (7).

1.2 Eritropoyesis dependiente de hierro

Durante gran parte de la diferenciación y maduración eritroide la presencia de hierro es esencial por su implicación en la síntesis del grupo hemo y la integridad del eje ERFE- hepcidina-ferroportina, imprescindible en la homeostasis del hierro. En esta etapa intervienen la ERFE que es un regulador negativo de la hepcidina, la transferrina y la

superfamilia de TGF- β , que comprende a las proteínas morfogénicas óseas (BMP), activinas y el factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11) con actividad inhibitoria sobre la maduración y diferenciación eritrocitaria terminal (6,8).

En la vía de señalización de TGF- β , la unión de los ligandos al receptor conduce a la fosforilación de las proteínas citoplasmáticas Smad, que son trasladadas al núcleo donde modulan la transcripción de genes necesarios en la diferenciación eritroide, induciendo así la apoptosis del eritroblasto (8).

En el proceso normal de maduración eritroide, la disminución de la expresión de GDF11 con la consiguiente supresión de la vía de TGF- β y la estimulación por la EPO ocurren paralelamente, favoreciendo la diferenciación de los progenitores eritroides (6).

Así, la eritropoyesis es un proceso controlado a diferentes niveles moleculares por hormonas y factores de crecimiento que activan a su vez distintas vías de señalización, acabando con la activación de factores de transcripción eritroides. Los factores de transcripción eritroides imprescindibles en la diferenciación eritroide son GATA1, SCL, TAL1, LMO2, LDB1, KLF-1 y GFI-1B, aunque están involucrados muchos más. Estos factores de transcripción están regulados por el factor estimulante de colonias (SCF) y EPO entre otros, para garantizar un desarrollo eritroide óptimo (6). En este proceso, GATA1 es considerado un factor de transcripción esencial en el desarrollo normal de la diferenciación eritroide temprana principalmente a nivel de CFU-E y BFU-E, disminuyendo su expresión hacia la diferenciación terminal (9) (**figura 4**).

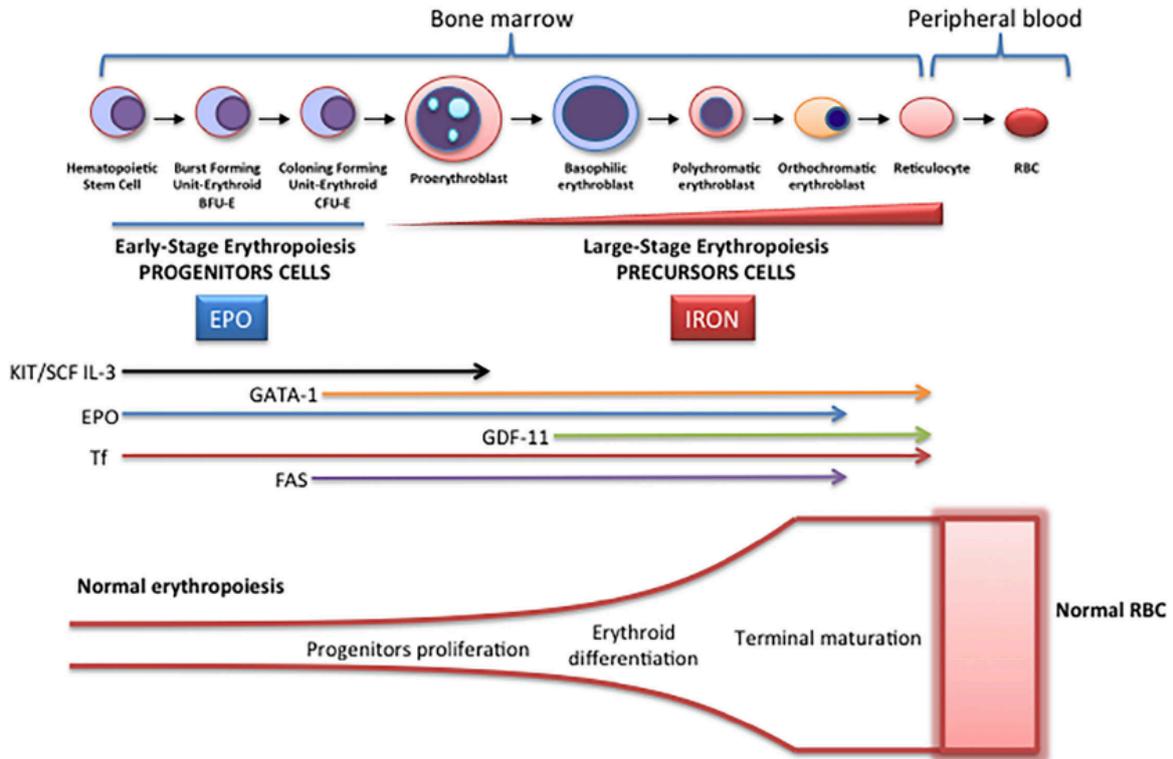


Figura 4. Eritropoyesis. En la fase inicial de la diferenciación eritroide, la EPO es el principal regulador tras la formación de las BFU-E. En esta fase, GATA1 promueve la eritropoyesis y aumenta la expresión del receptor de la EPO. En la fase final de la maduración eritroide intervienen moléculas como la transferrina y el factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11) (6).

Estudios recientes, demuestran que el inflamasoma puede desempeñar un papel importante en la regulación de GATA1 y la diferenciación eritroide posterior (10,11).

2. INFLAMASOMA

El inflamasoma está presente en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas y tiene un papel clave en el desarrollo de la respuesta inmune innata. Es un complejo multiproteico formado principalmente por proteínas sensoras, denominadas receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), la proteína adaptadora ASC (también conocida como PYCARD) y proteínas efectoras o caspasas con actividad cisteína-proteasa como Caspasa-1 (CASP1) (12).

2.1 Activación

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que desempeñan un papel fundamental en el sistema inmunitario innato al detectar microorganismos patógenos y factores de estrés celular, lo que conduce a una respuesta inflamatoria (13). La activación de los inflamasomas da como resultado la escisión de la pro-caspasa-1 (pro-CASP1) en su forma activa, CASP1, que posteriormente procesa citocinas proinflamatorias como pro-IL-1 β y pro-IL-18 en sus formas activas. Este proceso también puede desencadenar una forma de muerte celular programada conocida como piroptosis (14). Esta forma inflamatoria de muerte celular ayuda a eliminar las células infectadas o dañadas, así como a la liberación de IL-1 β e IL-18 (15) (**figura 5**).

Los inflamasomas se activan por una variedad de estímulos, incluidos los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), componentes de patógenos microbianos, patrones moleculares asociados a daños (DAMP) y señales endógenas liberadas por células dañadas (16). Si bien los inflamasomas son esenciales para la defensa del huésped, la desregulación puede conducir a varias enfermedades, incluidas enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias, trastornos metabólicos, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades infecciosas (17,18). Recientemente, se ha descubierto que la desregulación de los inflamasomas está asociada con trastornos hematológicos (10,19).

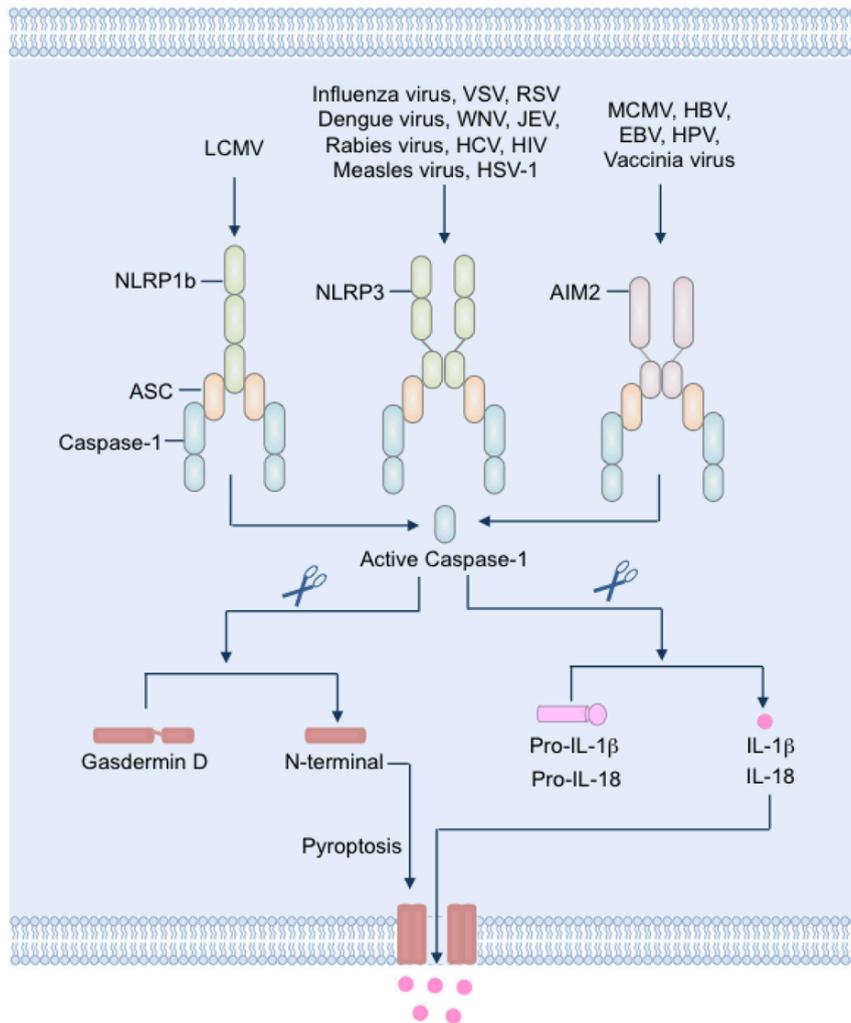


Figura 5. Representación esquemática de la inducción de piroptosis por diferentes inflammasomas en contexto de infección viral (15).

2.2 Inflamasoma NLRP1

A pesar de su descubrimiento temprano, NLRP1 ha sido menos estudiado que otros inflammasomas como NLRP3, debido principalmente a diferencias significativas entre las proteínas humanas y murinas (20). Las diferencias estructurales y funcionales entre el NLRP1 humano y el murino han planteado desafíos en la investigación. Estas diferencias complican la traducción directa de los hallazgos de los modelos murinos a la biología humana. El NLRP1 humano tiene una arquitectura de dominio más complejo y mecanismos de activación diferentes a los de su homólogo murino (21). Sin embargo, el NLRP1 se ha asociado con la hematopoyesis en varios estudios independientes que utilizan modelos de ratones y peces cebra (10,22). Estos estudios subrayan su papel en la

regulación de la formación de células sanguíneas y sus posibles implicaciones en las enfermedades hematológicas.

Es importante destacar que la organización de los dominios de NLRP1 humano consiste en un PYD (dominio de pirina) que está involucrado en interacciones proteína-proteína; un dominio NACHT, que es responsable de la unión de nucleótidos y oligomerización; un dominio de repetición rica en leucina (LRR), que está involucrado en la detección de ligandos y la autorregulación; un dominio FIIND (función para encontrar) que contiene un ZU5; un dominio UPA, que sufre escisión autoproteolítica; y un dominio CARD (reclutamiento de caspasa) que se conecta con efectores posteriores como pro-CASP1 (**figura 6**). Un paso crucial para la activación de NLRP1 es la escisión autoproteolítica del dominio FIIND. Esta escisión separa las partes N-terminal y C-terminal, que se cree que son necesarias para la liberación y activación del dominio CARD C-terminal y la oligomerización con ASC (23,24).

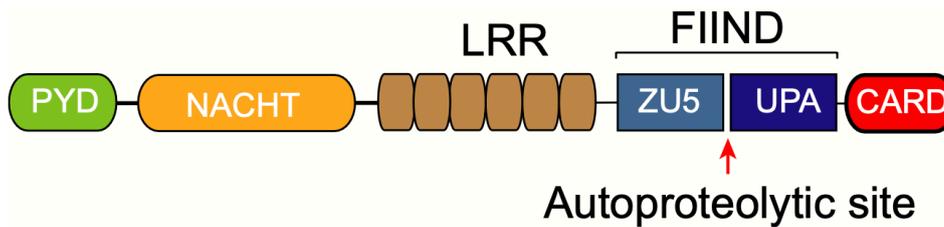


Figura 6. Estructura del NLRP1 humano (25).

2.3 Inflamasoma y eritropoyesis

Finalmente, aunque la relevancia de los inflamasomas en la regulación de la inflamación y la inmunidad es ampliamente conocida y demostrada, su papel en la hematopoyesis apenas comienza a describirse (10,26). Por ejemplo, se ha descubierto que la activación excesiva del inflamasoma NLRP3 puede provocar la muerte de la célula madre hematopoyética por piroptosis y la aparición de síndromes mielodisplásicos y otras neoplasias malignas hematológicas (27). Del mismo modo, se ha descrito en modelo murino que la activación del inflamasoma NLRP1 en progenitores hematopoyéticos puede desencadenar su muerte por piroptosis, incluso en ausencia de IL-1 β , provocando leucopenia (28), lo que sugiere que la inflamación sistémica desencadena la piroptosis de progenitores mieloides.

Diferentes estudios han demostrado en modelos animales la importancia de NLRP1 en la regulación de células madre hematopoyéticas y células progenitoras (10,11,22). En este contexto, se han estudiado posibles reguladores de dicho inflamasoma como ZAK α , una proteína implicada en la fosforilación y activación de NLRP1. Se ha demostrado que nilotinib, un inhibidor de ZAK α aprobado por la FDA, promueve la eritropoyesis en larvas de pez cebra (11). Aunque nilotinib tiene una afinidad muy alta por la quinasa ZAK α , se ha descrito que otras quinasas son diana del inhibidor, como MAPK11 (p38 β) y MAPK12 (p38 α) (29).

Dentro de la misma línea de investigación, se ha descrito que el inflamasoma NLRP1 desempeña un papel fisiológico previamente no descrito en la regulación de la decisión del linaje eritroide-mieloide tanto en células madre hematopoyéticas de larvas de pez cebra como en humanos (11). No obstante, aunque el papel que desempeña NLRP1 en la eritropoyesis es claro, no se ha estudiado en el contexto de las anemias congénitas, que han sido objeto de estudio de esta Tesis doctoral.

A nivel clínico, la afectación de cualquiera de las rutas descritas conlleva a una hiperproducción o deficiencia en el número de hematíes maduros circulantes denominándose respectivamente poliglobulia y anemia. En este trabajo nos vamos a dedicar al estudio de las anemias, y más concretamente en las anemias de origen congénito.

Atendiendo a su etiopatogenia, las anemias congénitas se clasifican en anemias por fallo medular y anemias hemolíticas hereditarias. Dentro del primer grupo encontramos: la eritroblastopenia congénita o enfermedad de Blackfan Diamond, la anemia diseritropoyética congénita y la anemia sideroblástica congénita; mientras que en el segundo grupo se incluyen las hemoglobinopatías estructurales y talasemias, las membranopatías y enzimopatías. En los siguientes capítulos nos centraremos en la enfermedad de células falciformes (ECF), la talasemia y la anemia congénita sideroblástica (ACS).

3. ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES

La ECF es un tipo de hemoglobinopatía estructural, de transmisión autosómica recesiva producida por una mutación puntual en el gen que codifica para la cadena β de globina, localizado en el cromosoma 11 (11p 15.4). Esta mutación, conlleva un cambio en un aminoácido de la cadena polipeptídica de β -globina provocando una alteración estructural de la molécula de Hb y la formación de HbS, que afectará secundariamente a la morfología del hematíe (30).

Se trata de una enfermedad multisistémica, con afectación orgánica progresiva asociada a episodios agudos de exacerbación clínica secundarios a la presencia de HbS (31).

Con el término ECF se incluyen los casos homocigotos para HbS, a los dobles heterocigotos para HbS y otra variante estructural de hemoglobina (HbC, HbD, HbE) o a los dobles heterocigotos para HbS y β -talasemia (32).

3.1 Epidemiología

La ECF es la enfermedad monogénica más frecuente en el mundo (33). La distribución de los casos a nivel mundial es reflejo de dos factores: la selección de portadores en regiones endémicas de malaria, debido a la protección parcial que le confiere frente a la infección por *Plasmodium falciparum*, y a los movimientos migratorios (31). Así, la prevalencia es alta en África subsahariana, la cuenca mediterránea, Oriente Medio y la India, registrándose el mayor número de nuevos casos en Nigeria, República Democrática del Congo e India (33).

El registro de nuevos casos en regiones prevalentes como la africana es muy difícil, debido a los escasos recursos económicos, a la ausencia de procedimientos diagnósticos rutinarios y de un cribado neonatal universal, que conllevan a retrasos e infraestimación en el diagnóstico (31).

3.2 Diagnóstico

Las técnicas diagnósticas más empleadas son la electroforesis capilar, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el isoelectroenfoque. Todas ellas son útiles en la detección de HbS, pero no son suficientes para diagnosticar una posible talasemia asociada. Para estos casos y para la determinación del genotipo, se dispone de técnicas moleculares complementarias como la secuenciación de ADN tradicional (Sanger), PCR-gap, la técnica de MLPA (amplificación de sondas tras ligación múltiple), Array de GCH y la secuenciación por NGS (30,32).

El objetivo diagnóstico y las técnicas empleadas difieren según la edad, diferenciándose tres periodos claves por las implicaciones terapéuticas y en medida de prevención (32):

Periodo preconcepcional, destinado a identificar potenciales portadores asintomáticos en poblaciones de regiones endémicas para la enfermedad. Las parejas en la que ambos progenitores sean portadores pueden elegir cómo método de concepción la fecundación *in vitro* con diagnóstico genético preimplantacional (34).

Periodo prenatal, se ofrece en caso de que ambos progenitores sean heterocigotos. La obtención del ADN fetal se lleva a cabo por medio de la biopsia de vellosidades coriónicas en la novena semana de gestación. En la actualidad, se están desarrollando otras técnicas no invasivas, todavía en periodo de investigación, como la detección de ADN fetal circulante en sangre materna en la cuarta semana de gestación (34).

Cribado neonatal, se realiza una electroforesis capilar en una muestra de sangre del talón obtenida a las 48h de vida, confirmándose posteriormente los resultados en una muestra de venopunción. Se conoce, que la principal causa de mortalidad entre los niños con ECF son las infecciones por microorganismos encapsulados, principalmente por *Streptococcus pneumoniae*. La instauración precoz de la profilaxis con penicilina oral ha demostrado reducir en un 84% (35) la tasa de infecciones por este germen, convirtiéndose así en un estándar de tratamiento para niños entre 0-5 años edad (36). De la necesidad de instaurar una medida terapéutica precoz con el fin de conseguir una disminución de la mortalidad infantil, se implantó en Francia en el año 2000 el cribado neonatal de ECF, limitado a la población de regiones con mayor prevalencia de enfermedad, iniciándose en

el 2006 en Reino Unido un cribado neonatal universal (37,38). En nuestro país, el cribado universal de la ECF se incorpora a la cartera de servicios del sistema nacional de salud en el 2014, iniciándose en la Región de Murcia en marzo de 2016 (39,40).

3.3 Fisiopatología

La Hb del adulto o HbA, es un tetrámero formado por dos cadenas polipeptídicas de α -globina y dos cadenas de β -globina, con un grupo hemo por cada subunidad proteica formado por un anillo de protoporfirina y un átomo de hierro (Fe^{2+}) (41).

La HbS se produce por el cambio de una adenina por una timina en el codón 6 del gen de la cadena β de globina, que conlleva a la codificación del aminoácido valina en lugar del ácido glutámico (*HBB*: c.20A>T, p. Glu7Val) (30). Este cambio provoca que, en condiciones de desoxigenación, la molécula de Hb polimerice, dando lugar a la formación de hematíes falciformes que ven modificada su deformabilidad y adhesividad al endotelio vascular (30,42). Así, estos hematíes falciformes se vuelven rígidos e inestables, con la consiguiente aparición de fenómenos vasooclusivos de repetición y hemólisis. Esto se traduce a nivel sistémico en un estado procoagulante con activación plaquetaria, disfunción endotelial, estrés oxidativo e inflamación sistémica, que derivan en una vasculopatía progresiva y daño multiorgánico (42,43).

3.3.1 Morfología eritrocitaria

El hematíe utiliza el 90% de la glucosa fundamentalmente para la obtención de ATP (metabolismo energético) a través de la Vía Embden-Meyerhof. El resto de glucosa se metaboliza por la vía de las pentosas-fosfato para producir nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que se acoplará con el ciclo del glutati6n para incrementar la actividad antioxidante (44).

En situaci6n de hipoxia, en el hematíe se activa la vía metab6lica de Rapoport-Luebering, por el que se produce m6s 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) con el fin de disminuir la afinidad de la Hb por el oxígeno (la curva de disociaci6n de la Hb se desplaza hacia la derecha), potenciando la liberaci6n de oxígeno a los tejidos e intentando

compensar el daño tisular inducido por hipoxia. En el hematíe, la banda 3 es la proteína de membrana más abundante. Su dominio N-terminal sirve de anclaje para la Hb desoxigenada y las enzimas glucolíticas. En situación de hipoxia, la Hb desoxigenada se une al dominio N-terminal desplazando a las enzimas glucolíticas al citoplasma, donde promoverán la síntesis de ATP y 2,3-BPG favoreciendo aún más la liberación de oxígeno a los tejidos (44).

La HbS tiene menor afinidad por el oxígeno que la HbA, lo que favorece un incremento de la fracción de HbS desoxigenada que promueve la polimerización y la formación de hematíes falciformes. En estos hematíes, existe de manera fisiológica niveles elevados de 2,3-BPG, reduciendo más la afinidad por el oxígeno y empeorando la falciformación (34).

La polimerización provoca cambios en la composición de la bicapa lipídica y estructura proteica de la membrana. Así, los hematíes falciformes exponen fosfatilserina a la superficie incrementando la hemólisis y la adhesión, y presentan disfunción de canales de membrana como los cotransportadores Cl-K favoreciendo la deshidratación. Esto produce un cambio en la morfología del hematíe, que ve alterada su deformabilidad y propiedades reológicas, favoreciendo la aparición de fenómenos vasooclusivos. Estos cambios en la conformación de la membrana y la deshidratación del hematíe provocan la falciformación irreversible del hematíe (34) (**figura 7**).

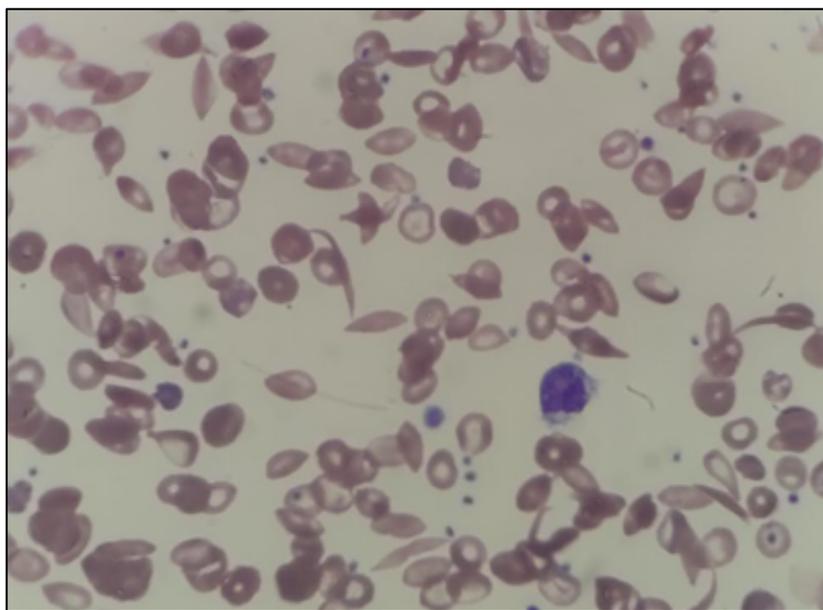


Figura 7. Extensión de sangre periférica de paciente con ECF con fenotipo SS (tinción May-Grünwald Giemsa; objetivo 50X).

3.3.2 Crisis vasooclusivas

Las crisis vasooclusivas (CVO) son el resultado de una interacción dinámica entre los eritrocitos falciformes rígidos y el endotelio vascular, que provoca oclusiones episódicas de la microvasculatura e isquemia, seguidas del restablecimiento del flujo sanguíneo a dicho nivel, lo que favorece el daño tisular mediado por la reperfusión (31). Para que se produzca esta vasooclusión, además de la polimerización de la HbS se requiere de un “*target*” que desencadene la obstrucción vascular que suele ser un fenómeno inflamatorio como una infección. Esto es debido a la baja disponibilidad de óxido nítrico (NO) y a la inflamación sistémica, que produce una activación endotelial y un aumento de las interacciones con los eritrocitos y leucocitos (45). Esta activación endotelial, conlleva un incremento de la expresión de moléculas como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1), la proteína de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), la P-selectina, la E-selectina, el antígeno de superficie leucocitaria CD47, la $\alpha V\beta 3$ integrina y los residuos de heparansulfato y fosfatidilserinas responsables de dichas interacciones (34,46,47).

Estos ciclos vasooclusivos de isquemia y reperfusión causan a su vez más estrés oxidativo e inflamación, que favorecen la expresión a nivel endotelial de moléculas de adhesión y la síntesis de citoquinas inflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF), que contribuyen con la inflamación crónica y la leucocitosis objetivada en las crisis. Esta leucocitosis se asocia con una mayor morbimortalidad, puesto que los neutrófilos activados presentan mayor expresión de la integrina $\alpha M\beta 2$ incrementado su adherencia al endotelio vascular, plaquetas y hematíes falciformes, empeorando la obstrucción (31,34,45).

En el mecanismo fisiopatológico de las CVO, las plaquetas activadas juegan también un papel esencial puesto que expresan niveles elevados de integrina $\alpha IIb\beta 3$ y P-selectina que median su interacción con el resto de las células hematopoyéticas favoreciendo la oclusión (48).

3.3.3 Hemólisis

Otro de los fenómenos fisiopatológicos importantes de la ECF es la hemólisis, de predominio extravascular a nivel de los macrófagos del bazo, aunque existe un componente intravascular que representa alrededor de un tercio del total (33).

La hemólisis es igualmente consecuencia de la polimerización de la HbS: por un lado, altera la estructura de la bicapa lipídica y la conformación de las proteínas de membrana con una menor hidratación del hematíe; y, por otro lado, el incremento del estrés oxidativo en el hematíe falciforme puede provocar un daño en la membrana eritrocitaria y envejecimiento precoz del hematíe con el consiguiente incremento en la lisis (31,33,42).

Además de ser causa de anemia y formación de cálculos biliares, la hemólisis contribuye al desarrollo de una vasculopatía crónica al disminuir la biodisponibilidad de NO. El NO es un potente vasodilatador de liberación endotelial con capacidad inhibitoria sobre la activación plaquetaria y sobre la expresión de moléculas de adhesión dependientes del factor nuclear κ B (49–51). La depleción del NO plasmático se produce por dos mecanismos: por un lado, la hemólisis libera al plasma arginasa-1 eritrocitaria que metaboliza la arginina plasmática en ornitina, disminuyendo el sustrato necesario para la síntesis del NO; por otro lado, la Hb libre produce radicales de oxígeno (ROS) que consumen el NO plasmático (50–53).

Así, la depleción crónica de NO y arginina, junto con la formación de microvesículas eritrocitarias de un potente activador del factor tisular como es la fosfatidilserina, podrían estar contribuyendo al estado protrombótico existente en las anemias hemolíticas (**figura 8**) (54–56).

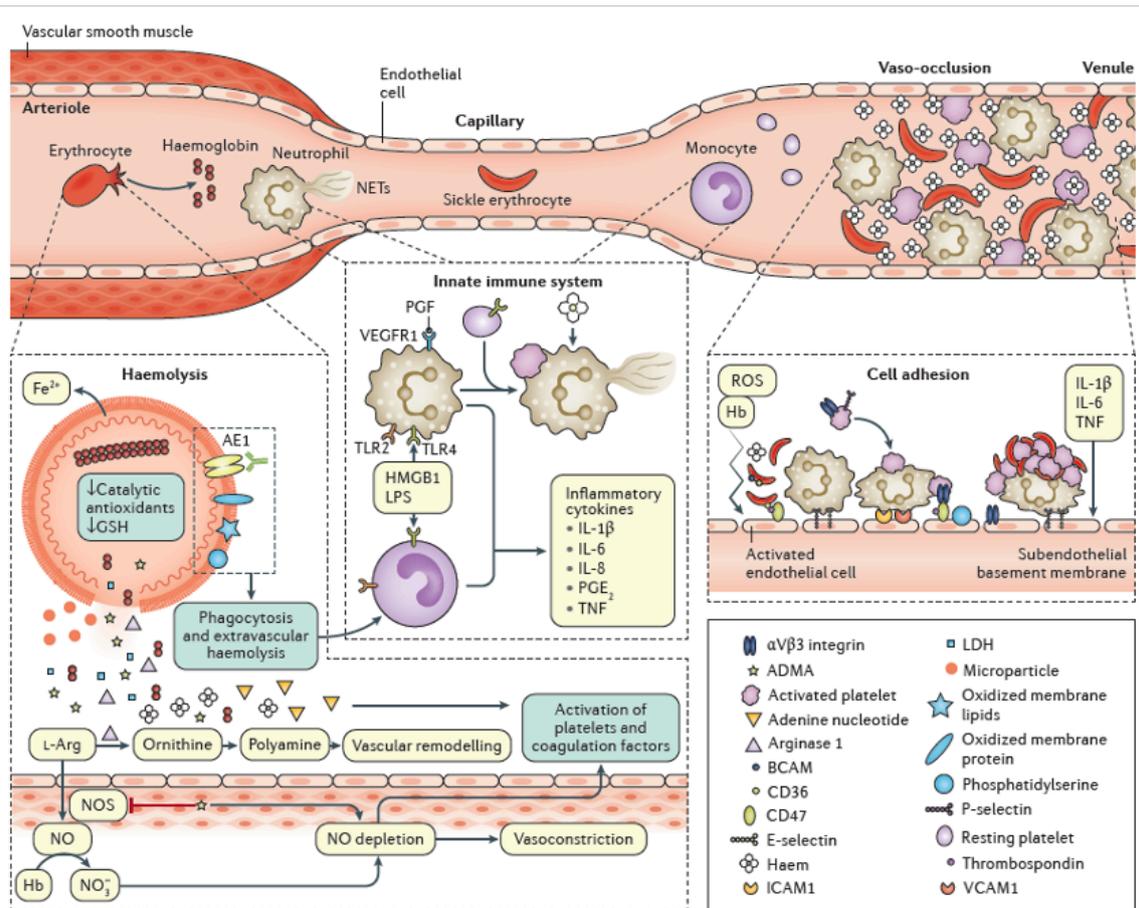


Figura 8. Fisiopatología de la ECF. La polimerización del hemátie provoca, por un lado, la exposición en la membrana eritrocitaria de residuos de fosfatidilserina, lo que favorece su fagocitosis por los macrófagos del bazo y la hemólisis extravascular; y por otro lado hemólisis intravascular secundaria a los cambios conformacionales en la membrana. Como consecuencia de la hemólisis intravascular, disminuye el óxido nítrico (NO), lo que favorece la vasoconstricción y la remodelación del endotelio vascular, con la consiguiente activación plaquetaria y de la coagulación. El hemo libre activa también el sistema inmunitario innato, promoviendo un estado inflamatorio que provoca mayor activación del endotelio vascular. En este endotelio activado se unen las células sanguíneas circulantes contribuyendo con el fenómeno de vasooclusión.

En la figura se muestran algunos ejemplos de interacciones receptor-ligando entre el endotelio y las células circulantes.

AE1: proteína transportadora; BCAM: molécula de adhesión celular basal; GSH: glutatión; HMGB1: proteína B1 del grupo de alta movilidad; ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1; LDH: lactato deshidrogenasa; LPS: lipopolisacárido; PGE $_2$: prostaglandina E $_2$; PGF: factor de crecimiento placentario; TNF: factor de necrosis tumoral; VCAM1: proteína de adhesión celular vascular 1; VEGFR1: receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (34).

3.3.4 Eritropoyesis ineficaz

Datos recientes indican que en la ECF la eritropoyesis ineficaz juega un papel importante. En la ECF una proporción significativa de eritroblastos durante la diferenciación terminal (eritroblastos policromáticos y ortocromáticos) experimentan

apoptosis en esta etapa, a diferencia de la talasemia que ocurre en las fases intermedias, y que la hemoglobina fetal (HbF) desempeña un papel antiapoptótico importante durante esta fase de diferenciación eritroide terminal. Esto ocurriría como consecuencia de una cinética diferencial distinta del atrapamiento citoplasmático de HSP70 en los eritroblastos talasémicos y falciformes en función de la síntesis de globina. Así, en los talasémicos las cadenas de α -globina forman agregados tan pronto se expresan, atrapando a HSP70 en el citoplasma y facilitando la escisión de GATA1 en el núcleo, mientras que, en la ECF, la HbS tarda más tiempo en formar polímeros, ya que este proceso depende del ambiente hipóxico medular y la concentración intracelular de HbS (57) (**figura 9**).

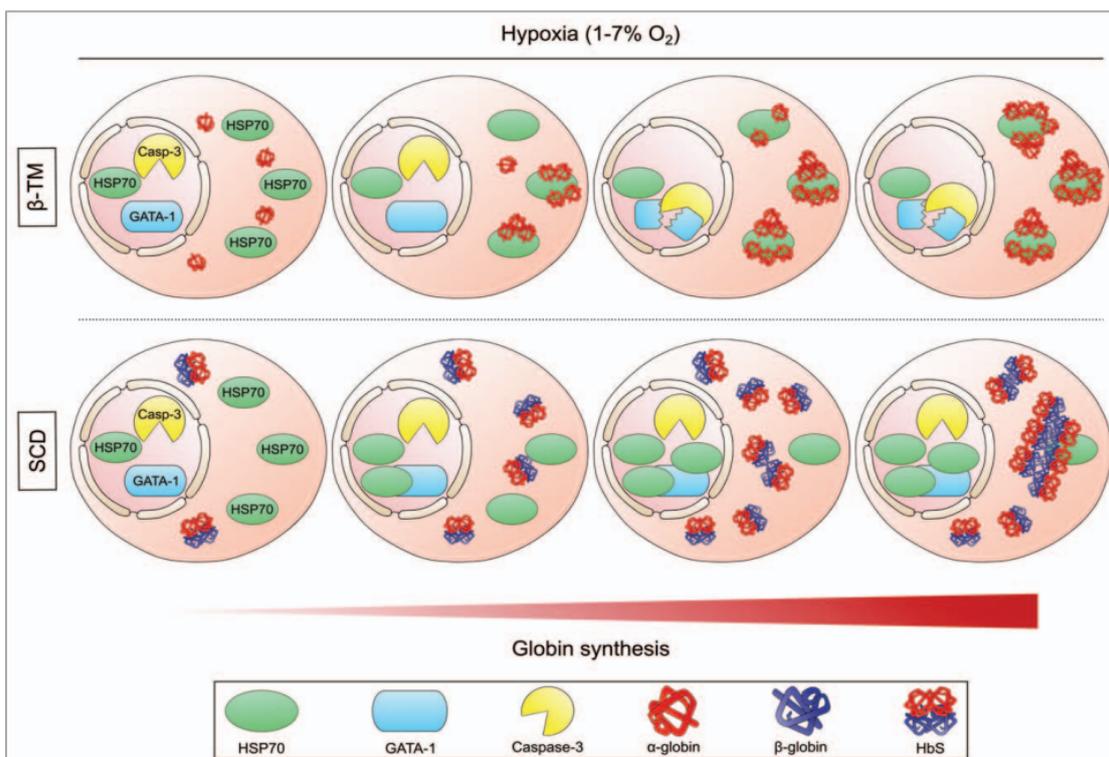


Figura 9. Eritropoyesis ineficaz. Se describe el atrapamiento de HSP70 en el citoplasma de eritroblastos talasémicos (β -TM) y falciformes (SCD) en diferenciación en función de la síntesis de globina (57).

3.4 Evolución clínica y complicaciones asociadas

La ECF es una enfermedad multisistémica, de evolución variable, con afectación orgánica progresiva asociada a episodios agudos de exacerbación clínica. Tradicionalmente, las complicaciones más conocidas eran las agudas, en las que el dolor era la principal manifestación. Actualmente, con el aumento de la supervivencia, se están detectando muchas más complicaciones derivadas del daño orgánico crónico.

3.4.1 Complicaciones agudas

Las crisis doloras son la complicación más frecuente de la ECF, representando más del 70% de las consultas en los servicios de urgencias (42,58). El dolor agudo es consecuencia de la lesión por isquemia-reperusión e infarto tisular producido en el contexto de la vasooclusión y puede implicar a una o múltiples localizaciones, siendo las regiones más afectadas las extremidades, el tórax, la espalda y el abdomen (42). En ocasiones, estas crisis dolorosas pueden complicarse con necrosis ósea y secundariamente infección, dando lugar a osteomielitis y artritis séptica (32).

Otra complicación frecuente es el síndrome torácico agudo, segunda causa de hospitalización y una de las principales causas de mortalidad entre los pacientes con ECF (59). Se presenta clínicamente con un cuadro de tos, disnea e hipoxemia, y una imagen de consolidación en las pruebas radiológicas. Entre los desencadenantes del cuadro se encuentran las infecciones, los embolismos grasos e infartos pulmonares (60).

Las infecciones bacterianas por gérmenes encapsulados como *S. pneumoniae*, *H. influenza* y especies no tifoideas de *Salmonella*, son una causa importante de morbimortalidad infantil (61). Esta mayor susceptibilidad, se debe a la asplenia funcional secundaria a infartos indolentes de repetición a nivel de bazo, defectos en la activación del complemento, déficits nutricionales e isquemia tisular (31).

En la actualidad, la incidencia de bacteriemias por microorganismos encapsulados ha disminuido notablemente con una mejora en la supervivencia global en estos pacientes. Esto es debido, a la instauración precoz de un tratamiento profiláctico con penicilina oral en niños menores de 5 años tras la detección de la variante estructural en el cribado neonatal, y a la inmunización con vacunas conjugadas (61,62).

La anemia aguda, es otro tipo de complicación aguda. Es definida como el descenso de 2 g/dL de Hb respecto al nivel basal. Puede ser resultado del secuestro eritrocitario a nivel de bazo o hígado (63,64), primoinfección por parvovirus B19 (65) o por hemólisis secundaria a aloinmunización (66).

Otras complicaciones agudas son: el accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, por afectación de las arterias carótida interna y cerebral media, o secundario

a vasculopatía extracraneal (31,67); y el priapismo, siendo la causa isquémica la forma de presentación más común (95%) (68).

3.4.2 Complicaciones crónicas

Debido al aumento en la supervivencia, cada vez son más evidentes déficits neurológicos sutiles que pueden pasar inadvertidos a la exploración debidos a infartos cerebrales silentes, que pueden llegar a afectar al 38% de los adultos a la edad de 18 años (69).

Derivadas de la vasculopatía crónica aparecen complicaciones como la hipertensión pulmonar, importante causa de morbimortalidad entre los adultos con ECF. Alrededor del 50% de los casos son precapilares, causada por la afectación endotelial secundaria a los fenómenos vasooclusivos reiterados, inflamación sistémica y depleción de NO. El resto de los casos son por afectación postcapilar, debidas a insuficiencia del ventrículo izquierdo por el incremento del gasto cardiaco y la sobrecarga de volumen secundaria a la anemia crónica (70).

A nivel renal, factores como la hipoxia, la acidosis y la vasculopatía producen una afectación microvascular crónica. Entre las manifestaciones de dicho daño crónico encontramos hiperfiltración, hipostenuria y microalbuminuria (71). La enfermedad renal crónica estadio III-IV se objetiva hasta en el 4-18% de los adultos (32).

Además de los episodios agudos de dolor, los pacientes con ECF pueden presentar dolor crónico que se ve incrementado con la edad, llegándose a presentar en el 30-40% de los adultos (72). La cronificación del dolor suele estar en relación con la afectación del sistema nervioso central y periférico, y con complicaciones vasculares como la necrosis avascular (72,73). La implicación del sistema nervioso no está hoy en día bien dilucidada, pero un estudio en pacientes asintomáticos con ECF demostró la existencia en el 19,6% de los individuos analizados de hallazgos electromiográficos de desmielinización y axonopatía (72).

3.5 Tratamiento actual

Los avances en técnicas diagnósticas, materia de prevención y tratamiento han conseguido una mejora notable en la supervivencia de los pacientes con ECF.

En la actualidad, el tratamiento se basa en hidroxiurea, transfusiones de concentrados de hematíes y trasplante alogénico.

3.5.1 Hidroxiurea

La hidroxiurea es un inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa que ha demostrado tener especial eficacia en el tratamiento de los pacientes con genotipo SS y S β^0 . Actúa por medio de tres mecanismos de acción (30,74,75):

- Aumenta la expresión del gen de la cadena de γ -globina, aumentando secundariamente la HbF. La HbF tiene mayor afinidad por el oxígeno, estabilizando la molécula de Hb y reduciendo la polimerización.
- Tiene un papel antiinflamatorio, reduciendo el número de leucocitos, plaquetas y la expresión de moléculas de adhesión al endotelio vascular.
- Tiene un efecto sobre el endotelio vascular, aumentando la producción del NO plasmático y favoreciendo la vasodilatación.

En pacientes con ECF el tratamiento con hidroxiurea ha demostrado reducir las CVO, y secundariamente los ingresos hospitalarios y la mortalidad. Debido a sus resultados beneficiosos y a su excelente perfil de seguridad, es el estándar de tratamiento recomendándose su uso desde el periodo de lactancia (30,74).

Entre sus efectos adversos encontramos: la mielosupresión, como efecto adverso más frecuente; oligo-azoospermia en hombres y disminución de la reserva ovárica en mujeres sin ser clara causa de infertilidad; y teratogenicidad en modelo animal que no ha sido demostrada en el ser humano (30,74).

3.5.2 Hemoterapia

Con la transfusión se consigue una reducción de los hematíes falciformes circulantes, disminuyendo secundariamente el daño endotelial y mejorando el aporte de oxígeno a los tejidos presentando como limitaciones el aumento de la viscosidad (31,76).

Actualmente, se realizan principalmente dos tipos de transfusión: la transfusión simple y el recambio eritrocitario. Ambas técnicas pueden emplearse como prevención primaria en pacientes con alto riesgo de accidente cerebrovascular o como prevención secundaria de CVO con clínica de gravedad o episodios graves de repetición, anemia aguda sintomática e ictus (30,31,76).

Como potenciales riesgos derivados de la transfusión encontramos: la aloinmunización; reacción transfusional hemolítica retardada; y la sobrecarga férrica, hoy en día menos frecuente tras la incorporación al arsenal terapéutico de los quelantes orales (30,31).

3.5.3 Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (PPHH) es actualmente el único tratamiento curativo existente. Tiene indicación en pacientes jóvenes sintomáticos, preferiblemente menores de 16 años, con un hermano HLA-idéntico, reservando el trasplante de donante alternativo para pacientes con daño orgánico sin hermano HLA-idéntico y en el contexto de un ensayo clínico (30,77).

Entre las posibles complicaciones del trasplante encontramos las derivadas del acondicionamiento, las de la mielosupresión prolongada y la enfermedad de injerto contra receptor (77).

3.6 Opciones futuras de tratamiento: Terapia génica

Hay dos mecanismos de edición génica que se están explorando en la ECF. Por un lado, las técnicas que se basan en la corrección de la mutación subyacente de la enfermedad y tiene como objetivo la restauración del gen de la β -globina; por otro lado, están las que tiene como objetivo el incremento de la HbF mediante la supresión de *BCL11A* o exa-cell (exagamglogene Autotemcel) (77). Esta última está aprobada en la actualidad para formas graves de ECF.

4. TALASEMIA

Las talasemias son hemoglobinopatías de transmisión autosómica recesiva caracterizadas por una disminución o ausencia de la cadena de globina, dando lugar a fenotipos clínicos variables que engloban desde individuos asintomáticos hasta pacientes con anemia crónica severa dependiente de transfusión (78).

Tradicionalmente, se ha clasificado según las manifestaciones clínicas en talasemia mayor (TM), talasemia intermedia (TI) y talasemia menor (6).

La TM incluía a los pacientes con anemia severa dependiente de transfusión desde la infancia. La talasemia menor o forma heterocigota (rasgo), es la forma más leve de presentación, y se caracteriza por una anemia leve asintomática. Con el término TI se englobaba a pacientes con un espectro clínico variado, desde anemia leve-moderada a moderadamente grave, que solo requerían transfusiones de manera ocasional pero que desarrollaban complicaciones propias de la TM como hematopoyesis extramedular, hipertensión pulmonar, sobrecarga férrica y retraso en el crecimiento (79,80).

Debido a una mayor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad, en el año 2012 la Federación Internacional de Talasemia adoptó la nueva terminología para la clasificación clínica de la talasemia, haciendo distinción entre talasemia dependiente de transfusión (TDT) y talasemia no dependiente de transfusión (NTDT), incluyendo en este último grupo la α -talasemia intermedia (HbH), la β -talasemia intermedia, los doble heterocigotos HbE/ β -talasemia y otras dobles heterocigosis (81) (**figura 10**).

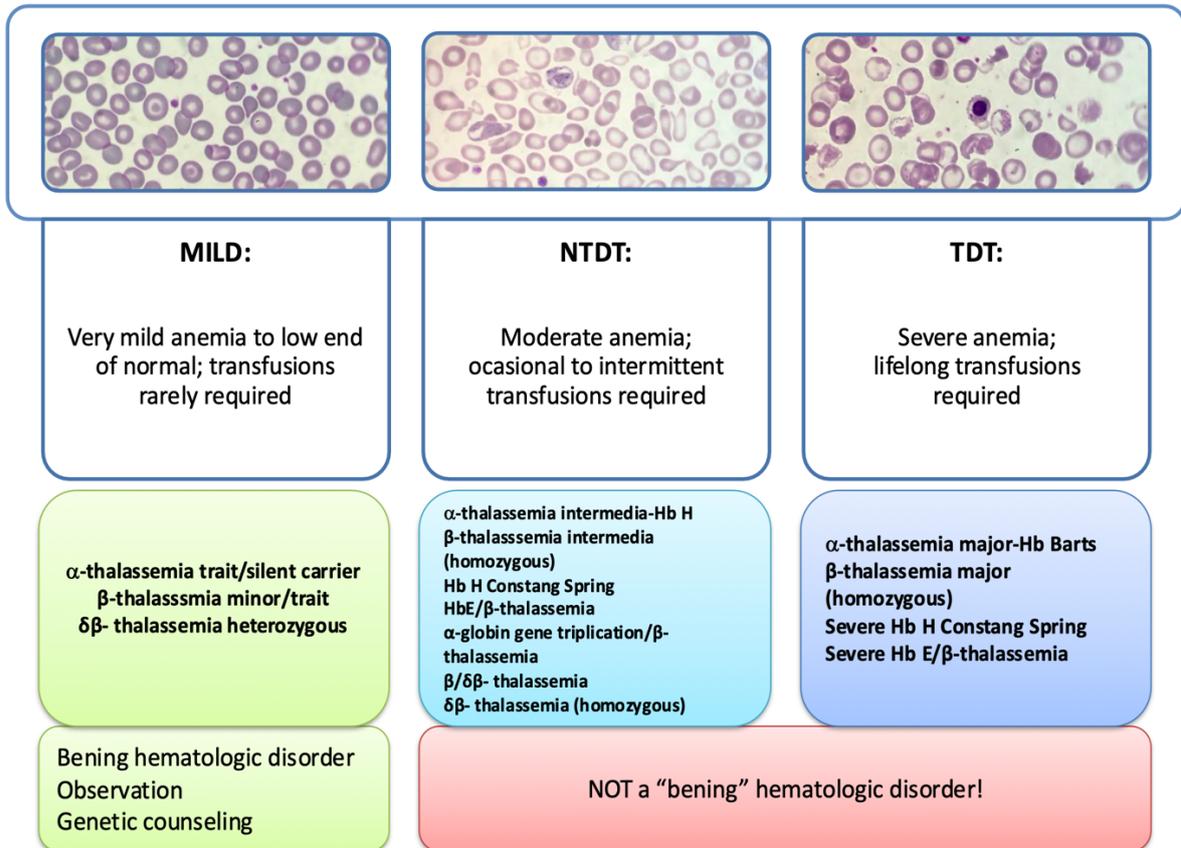


Figura 10. Tipos de talasemia. Asociación genotipo-fenotipo. Las talasemias α y β son enfermedades genéticamente heterogéneas. El manejo clínico con transfusiones de hematíes es un factor esencial para clasificarlas como talasemia dependiente de transfusión (TDT) o talasemia no dependiente de transfusión (NTDT). Los pacientes con TDT necesitan transfusiones regulares de por vida, mientras que los pacientes con NTDT no necesitan transfusiones regulares y normalmente presentan más tarde en la infancia o incluso en la edad adulta una anemia leve/moderada que sólo requiere transfusiones ocasionales en circunstancias clínicas concretas (infecciones, embarazo, cirugías o crisis aplásicas). Sin embargo, suelen presentar las complicaciones típicas de la TDT, como hematopoyesis extramedular, sobrecarga de hierro, úlceras en las piernas y osteoporosis. Los pacientes con TDT incluyen aquellos con β -talasemia mayor o formas graves de β -talasemia intermedia, HbE/ β -talasemia o HbH. La NTDT engloba principalmente tres formas: β -talasemia intermedia (β -TI), HbE/ β -talasemia (formas leve y moderada) y α -talasemia intermedia (HbH) (6).

4.1 Epidemiología

Tradicionalmente, la talasemia ha sido una enfermedad propia de países de la cuenca mediterránea, norte y centro de África, el sudeste asiático y Oriente Medio. Sin embargo, como resultado de los flujos migratorios, podemos encontrarlas en otras regiones tradicionalmente no endémicas para la enfermedad, como son el norte de Europa y Norteamérica (82).

4.2 Diagnóstico

Hay que sospechar talasemia en pacientes con anemia en grado variable (moderada-grave), microcítica ($VCM < 70$ fl) e hipocroma ($HCM < 20$ pg). En la morfología de sangre periférica destaca una anisopoiquilocitosis severa con presencia de eritroblastos, siendo característica de la α -talasemia intermedia o Hb H los cuerpos de inclusión en tinción de azul de cresilo (**figura 11**). Por el contrario, los pacientes heterocigotos suelen presentar microcitosis e hipocromía con anemia leve o niveles de Hb dentro del rango de la normalidad, y alteraciones morfológicas leves con ausencia de eritroblastos (81).

Para detectar variantes de Hb, cantidad y tipo de Hb presente se emplean técnicas como la electroforesis capilar y la HPLC, ampliamente utilizadas en el diagnóstico de β -talasemia (81).

Para la detección de la mutación causante en el gen de la β globina o para el diagnóstico de α -talasemia se requieren técnicas de biología molecular basadas en el estudio del ADN (81).

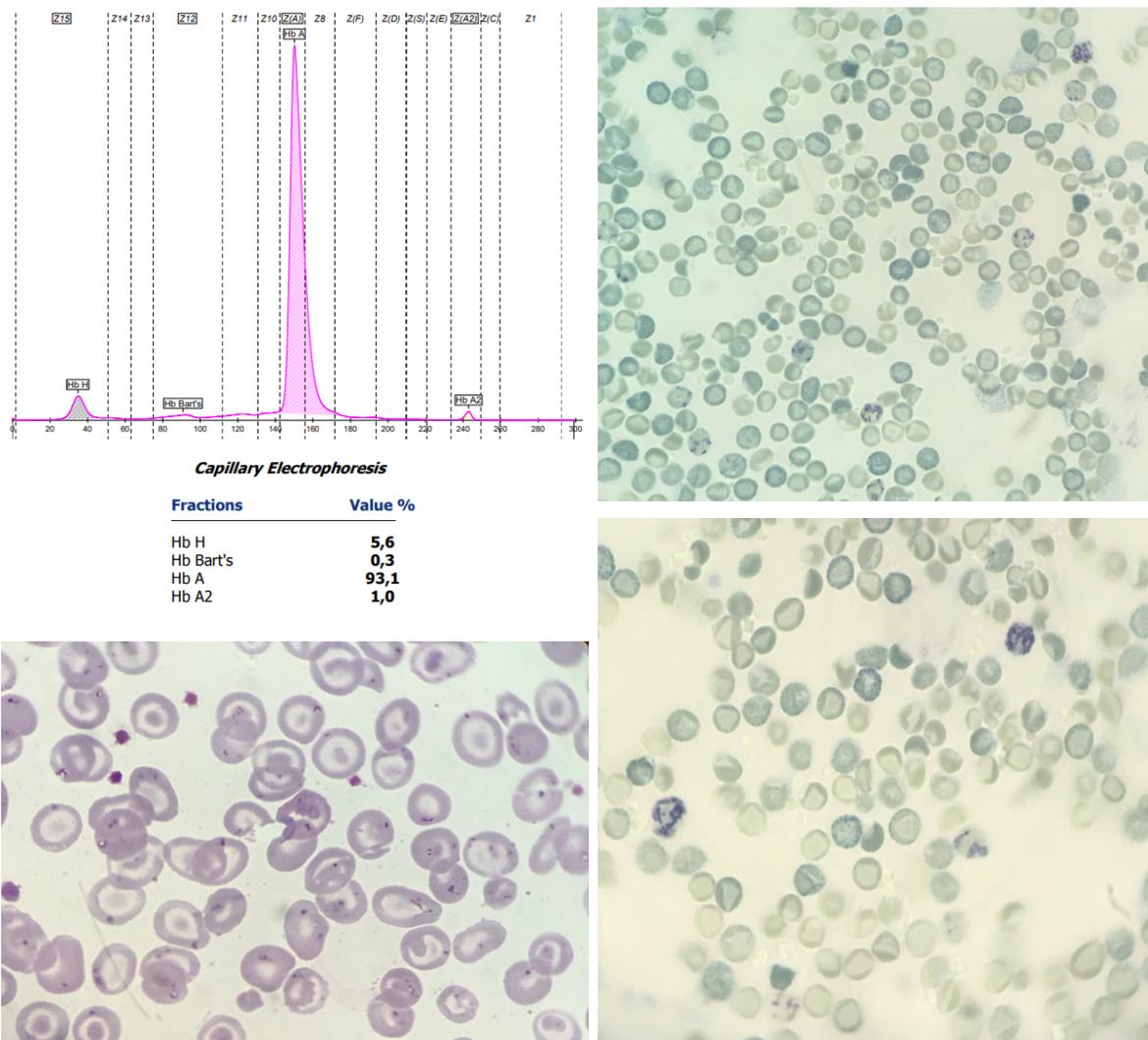


Figura 11. Electroforesis capilar y extensiones de sangre periférica de un paciente con Hb H. A) Electroforesis capilar donde se observa pico de Hb H. **B)** Hematíes con punteado basófilo y alteración de la hemoglobinización (May-Grünwald Giemsa). **C)** Hematíes con cuerpos de inclusión (Azul de cresilo).

4.3 Fisiopatología

Hay tres factores principales en la fisiopatología de la talasemia: anemia crónica, eritropoyesis ineficaz y sobrecarga de hierro (**figura 12**).

4.3.1 Eritropoyesis ineficaz

El desbalance de cadenas genera un exceso de cadenas inestables que precipita dentro de los progenitores eritroides provocando un deterioro de la membrana celular y finalmente su lisis. Esto provoca una alteración del ambiente medular, con un desequilibrio de citoquinas que hace que los progenitores eritroides proliferen, pero con una maduración inadecuada, denominándose eritropoyesis ineficaz. El desequilibrio de citoquinas y la eritropoyesis ineficaz severa son causa de eritropoyesis extramedular (79,81).

Así, el principal desencadenante de la anemia es la eritropoyesis ineficaz, mientras que los determinantes secundarios son la hemólisis de los eritrocitos maduros y la disminución global de la síntesis de Hb (79,81).

Como se comentó anteriormente, la eritropoyesis es un proceso mediado en una primera fase por EPO y una segunda fase por hierro. En condiciones fisiológicas, cuando aumentan las demandas de oxígeno como en situaciones de hipoxia o hemorragia, aumenta la secreción de EPO que estimula la producción de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) que protege a GATA1 de la escisión por FAS/FASL y de la activación de caspasa. Paralelamente con el incremento de EPO, se reduce la expresión de GDF11 con la consiguiente supresión de TGF- β , favoreciendo la maduración terminal del hematíe (6).

En talasemia, la eritropoyesis ineficaz se desencadena así por dos mecanismos: por un lado, los agregados formados por la cadena sobrante de globina secuestran la proteína HSP70 en el citoplasma, inhibiendo su translocación al núcleo y facilitando la escisión de GATA1 por caspasas. Por otro lado, el desbalance de cadenas aumenta la formación de ROS (producidos también por la sobrecarga férrica), que activan GDF11 y secundariamente la vía de SMAD2/3 inhibiendo la diferenciación eritroide terminal (6).

4.3.2 Sobrecarga de hierro

La sobrecarga férrica es uno de los principales eventos patogénicos de la talasemia. Además, de la sobrecarga de hierro secundaria a la transfusión en pacientes con TDT, hay un aumento de la absorción a nivel intestinal tanto en pacientes TDT como en NTDT (83,84).

El acumulo de eritroblastos durante la eritropoyesis ineficaz aumenta la secreción de ERFE, que disminuye a su vez la expresión de hepcidina. Niveles bajos de hepcidina favorecen la expresión de la ferroportina, proteína transportadora de hierro situada en la membrana basolateral del enterocito, aumentando la absorción de hierro en duodeno y su liberación a nivel reticuloendotelial (83,84).

En NTDT, el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15), miembro de la familia de TGF- β regulada al alza en eritropoyesis ineficaz, puede contribuir en la disminución de la hepcidina (85).

4.4 Complicaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas se hacen evidentes alrededor de los 6-12 meses de vida en pacientes con TDT, coincidiendo con el descenso de HbF y la síntesis de la HbA ($\alpha_2\beta_2$), y en torno a los 2-6 años en pacientes con NTDT (80).

Antiguamente, en pacientes con TDT con tratamiento transfusional insuficiente se veían complicaciones como retraso en el crecimiento, hepatoesplenomegalia, masas extramedulares, deformaciones óseas y úlceras cutáneas, que en la actualidad con la intensificación del régimen transfusional ya no son tan comunes de ver en la práctica clínica diaria (6,80).

Aunque los pacientes con NTDT tienen independencia transfusional y niveles de Hb más altos, presentan la mayoría de las complicaciones asociadas a la enfermedad apareciendo en pacientes con TDT a edades más tardías. Entre las complicaciones clínicas encontramos:

4.4.1 Sobrecarga férrica

Como ya se ha comentado, estos pacientes presentan sobrecarga de hierro secundaria a la terapia transfusional, en los pacientes con TDT, y al aumento de la absorción intestinal de hierro secundaria a supresión de hepcidina. El exceso de hierro (incremento de 1 mgFe/g partiendo de una hemosiderosis de 5 mgFe/g) se relaciona con múltiples complicaciones a nivel sistémico como: hepatitis, carcinoma hepático, cardiopatía, hipotiroidismo, hipogonadismo, osteoporosis y proteinuria secundaria a tubulopatía (86,87).

4.4.2 Hipercoagulabilidad

El incremento de ROS secundario al desbalance de cadenas y al hierro libre, altera la estructura de la membrana del hematíe. Se forman así, hematíes senescentes rígidos y deformados que expresan en la superficie de membrana fosfatidilserina, viendo incrementada su adhesividad al endotelio vascular. La expresión de E-selectina, IL-1, factor von Willebrand y la molécula de adhesión celular vascular-1 hacen pensar que la activación del endotelio vascular puede ser otro desencadenante patogénico en la enfermedad. La mayoría de las complicaciones trombóticas reportadas en la literatura son de pacientes con NTDT (88).

4.4.3 Hipertensión pulmonar

Igual que otros pacientes con hemólisis crónica estos pacientes pueden desarrollar hipertensión pulmonar tipo I o precapilar por incremento de la hipercoagulabilidad y disminución de vasodilatadores como el NO y su sustrato arginina secundario a la hemólisis (89).

4.4.4 Endocrinopatías

A pesar de que la afectación endocrina es mayor en pacientes con TDT, en pacientes con NTDT la prevalencia de diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo e insuficiencia suprarrenal sigue siendo elevada, especialmente en pacientes de mediana edad (90–92).

4.4.5 Osteoporosis

Los pacientes con TDT y NTDT sufren una disminución marcada de la densidad mineral ósea (DMO) a pesar de tratamientos preventivos con suplementos y de la optimización del régimen transfusional. Los mecanismos propuestos para explicar la pérdida de la DMO incluyen la expansión ósea secundaria a la proliferación eritroide anómala, el aumento de EPO secundario a esta mayor proliferación celular, toxicidad ósea por el acumulo de hierro y a trastornos endocrinos derivados al aumento del estrés oxidativo (déficit de GH-IGF-1, hipogonadismo, déficit de vitamina D) (93).

Cada vez, hay más datos que avalan relación existente entre eritropoyesis, metabolismo óseo y homeostasis del hierro. Se ha descrito recientemente en pacientes talasémicos, un mecanismo de activación de osteoclastos que podría tener relación con la alteración del eje RANK/RANKL/OPG (94,95).

Se ha publicado que la ERFE secuestra a algunos de los miembros de la familia de la BMP, principalmente BMP2, BMP6 y BMP2/6 que suprime la expresión de hepcidina mediante la inhibición de la señalización BMP/SMAD. Las BMP están implicadas en la formación y el remodelado óseo por osteoblastos. Así, la ERFE al modificar la disponibilidad de las BMP, puede ser un nexo entre la eritropoyesis ineficaz, el metabolismo del hierro y la pérdida de DMO (94,95). Podría ser, que la disminución de ERFE al mejorar la disponibilidad de BMP favorezca la osteogénesis (95). Sin embargo, los niveles elevados de ERFE en talasemia son osteoprotectores, existiendo un efecto paradójico no explicado. Otros datos indican que la baja disponibilidad de BMP (por niveles elevados de ERFE), aumenta la DMO por inhibición sobre osteoclastos y la activación de la vía Wnt, hipotetizando que la pérdida de ERFE conllevaría una disminución de la DMO por un incremento de la expresión esclerostina y de RANKL (94,95).

Así, en casos de eritropoyesis ineficaz donde existe un incremento de ERFE, las proteínas BMP2 y BMP6 secuestradas, disminuyen la señalización de las vías BMP/Smad y ERK, dando lugar a una disminución de la expresión de SOST y RANKL (Rankl/OPG) con una reducción de la osteoclastogénesis.

Los efectos adversos relacionados con la intensificación de la terapia transfusional y la quelación, sobre todo en pacientes con TDT, conlleva una adherencia terapéutica deficiente y un detrimento en la calidad de vida de los pacientes, con un incremento en la morbimortalidad. En los últimos años, se han aprobado o están en ensayo clínico, varios tratamientos modificadores de la enfermedad que tienen por objetivo disminuir las demandas transfusionales intentando mejorar la anemia y la eritropoyesis ineficaz (96).

4.5.1 Luspatercept

Es una proteína de fusión recombinante que se unen a ligandos específicos de la superfamilia de TFG- β , como GDF11 o actina B, bloqueando la señalización vía SMAD2/3 y potenciando secundariamente la maduración tardía del eritrocito. Luspatercept es así un fármaco de maduración eritroide aprobado en enfermedades con eritropoyesis ineficaz como síndrome mielodisplásico o β -talasemia, en las que la expresión de la vía SMAD es muy elevada (96).

La aprobación de Luspatercept en pacientes con TDT se basó en los resultados obtenidos del ensayo BELIEVE (NCT02604433), un fase III que cumplió con el endpoint primario consiguiendo una reducción de la tasa de transfusión de un 33% entre las semanas 13-24 y llegando hasta el 50% entre la semana 37-48 (97). En NTDT la aprobación se basó en los resultados del ensayo doble ciego en fase II BEYOND (NCT03342404), en el que el 77% de los pacientes en tratamiento alcanzaron el objetivo principal, un aumento medio de Hb $\geq 1,0$ g/dl con respecto al valor inicial, frente a 0 de 49 pacientes (0%) del grupo de placebo ($P < 0,0001$), en ausencia de transfusión (98).

4.5.2 Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

El trasplante alogénico de PPHH es actualmente la única terapia curativa disponible. Está indicado en pacientes con TDT, preferiblemente menores de 16 años y con hermano HLA-idéntico, para reducir el riesgo derivado de las complicaciones del trasplante. Otras modalidades de trasplante de entrada no son una opción, aunque cada vez hay mejores resultados con trasplante de intensidad reducida o haploidéntico y se podrían plantear en pacientes sin comorbilidades y sin donante HLA-idéntico disponible o en el contexto de un ensayo clínico (99).

4.6 Otras terapias en ensayo clínico

4.6.1 Mitapivat

Activador alostérico de la enzima piruvato quinasa que aumenta la síntesis de ATP en el eritrocito favoreciendo su estabilidad. Hay datos de eficacia de Mitapivat en modelo murino y en pacientes con NTDT, donde se consiguió una mejora en los niveles de Hb y probablemente en la sobrecarga férrica y de la eritropoyesis ineficaz. Actualmente en ensayo en pacientes TDT y NTDT (100).

4.6.2 Terapia génica

Actualmente hay dos estrategias en terapia génica aprobadas: la transducción del gen normal de β -globina mediado por lentivirus en células hematopoyéticas autólogas (betibeglogén autotemcel); y la edición génica mediante la técnica de CRISPR/Cas9 que escinde el gen *BCL11A* inhibiendo de esta forma la represión de la expresión de cadenas gamma y por tanto induciendo la síntesis de HbF (exagamglogene Autotemcel) (101).

5. ANEMIA CONGÉNITA SIDEROBLÁSTICA

Las ACS son un grupo heterogéneo de trastornos hematopoyéticos raros y hereditarios que se caracterizan por el acumulo patológico de hierro en las mitocondrias de los precursores eritroides, lo que conlleva a una sobrecarga férrica y eritropoyesis ineficaz. Son causadas por la mutación en genes involucrados en el metabolismo mitocondrial del hierro, clasificándose en tres grupos según su fisiopatología: defectos en genes relacionados con la síntesis del grupo hemo, relacionados con la síntesis y transporte de los grupos hierro-azufre (Fe-S) y los involucrados en la síntesis de la cadena respiratoria mitocondrial (102).

La mutación de genes que codifican para enzimas o transportadores implicados en cualquiera de estas vías o rutas metabólicas conllevan una utilización defectuosa del hierro compatibles con las manifestaciones clínicas y citológicas (**figura 13**) características de la anemia sideroblástica.

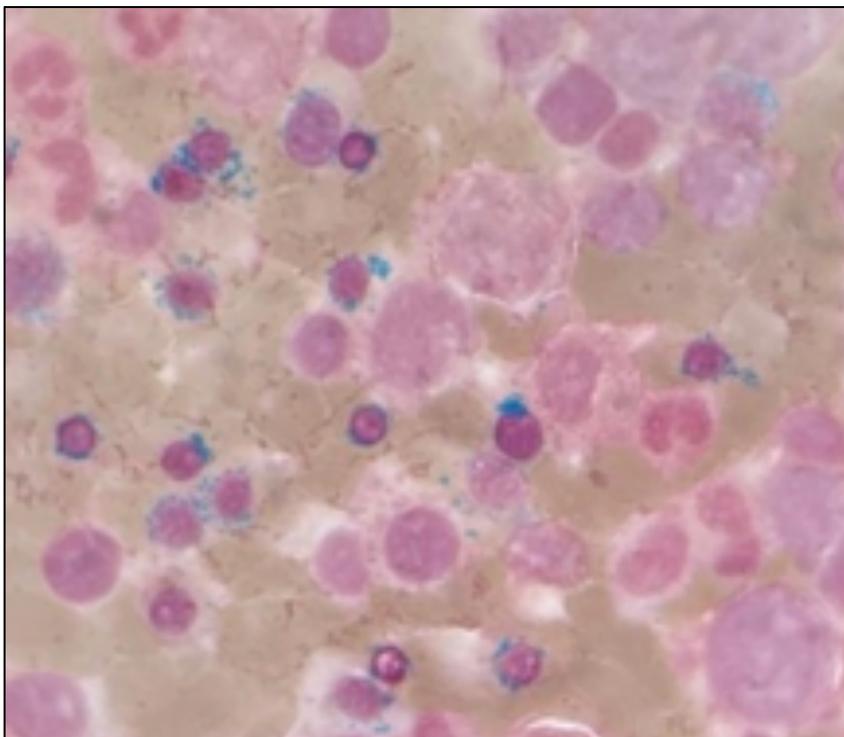


Figura 13. Extensión de MO de un paciente con ACS donde se observan sideroblastos en anillo (tinción de Perls; objetivo 50X).

5.1 Síntesis del grupo hemo en el eritroblasto

El transportador de membrana mitocondrial SLC25A38 internaliza la glicina al interior mitocondrial, donde en combinación con la succinil-coenzima A (CoA) son utilizadas por la enzima δ -aminolevulinato sintetasa (ALAS) en la síntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA). Esta enzima, engloba dos isoformas denominadas ALA1 y ALA2, requiriendo esta última de piridoxina como cofactor para realizar su función. Una vez sintetizado el ALA, es transportado al citoplasma por el SLC25A38, donde sufre una serie de reacciones oxidativas hasta formar el protoporfirinógeno (PPgen IX), empleado en la mitocondria por PPgen oxidasa para la síntesis de protoporfirina IX (102–104).

La síntesis del grupo hemo es dependiente del hierro disponible en los precursores eritroides. Los complejos transferrina-hierro férrico (Fe^{3+}) circulantes son endocitados por medio de los transportadores de transferrina. En el interior del eritroblasto, dichos complejos son escindidos y el Fe^{3+} libre es reducido a Fe^{2+} por la feroreductasa STEAP3 (105). El Fe^{2+} es externalizado fuera del endosoma por el transportador divalente 1 (DMT1) y entra en la mitocondria donde se combina con la protoporfirina IX por acción de la ferroquelatasa (FECH) para sintetizar el grupo hemo (103,104,106) (**figura 14**).

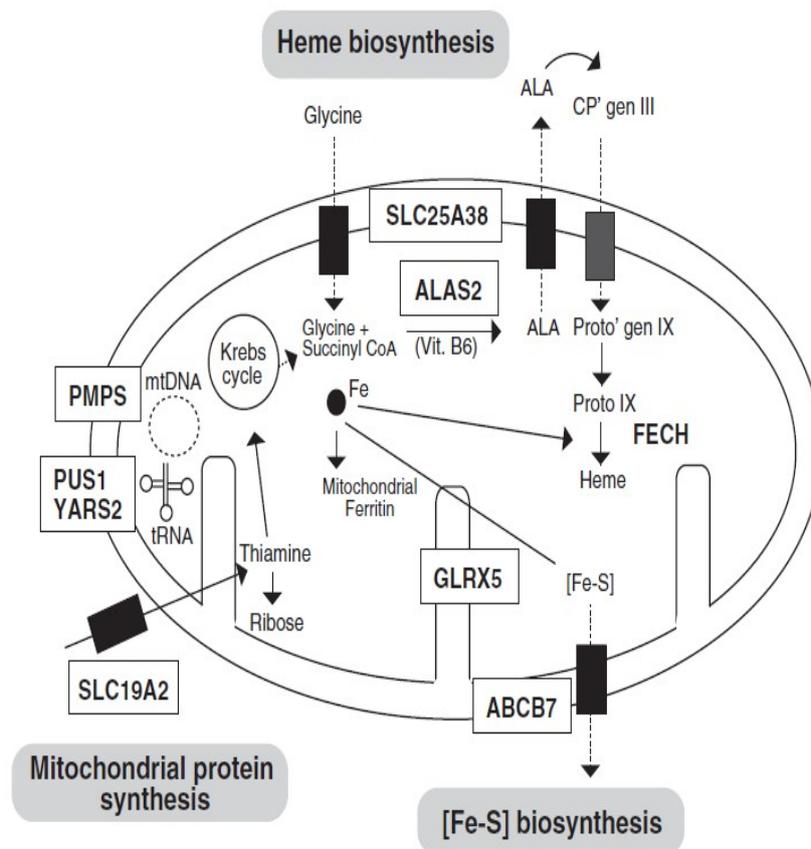


Figura 14. Principales vías afectadas en los diferentes grupos de ACS: Biosíntesis del grupo hemo y del complejo hierro-azufre (Fe-S) y afectación de la cadena respiratoria mitocondrial.

(ALAS2: δ -aminolevulinato 2 sintetasa; FECH: ferroquelatasa; GLRX5: glutarredoxina 5; ADNmt: ADN mitocondrial; PLP; PMPS, síndrome médula-páncreas de Pearson; PUS1: pseudouridina sintetasa 1; SLC19A2: transportador de tiamina de alta afinidad; SLC25A38: proteína transportadora mitocondrial; YARS2: tirosil-ARNt sintetasa mitocondrial 2) (107).

Hasta la fecha, se han descrito tres mutaciones implicadas en la etiopatogenia de la anemia sideroblástica por alteración en la síntesis del grupo hemo. En todas ellas encontramos anemia microcítica en rango variable y sobrecarga férrica, careciendo de la afectación sistémica característica de otros subtipos de ACS (**tabla 1**).

5.1.1 Anemia sideroblástica ligada al cromosoma X por mutación en el gen *ALAS2*

Esta es la forma más prevalente de ACS. Se debe habitualmente a una mutación missense en el gen *ALAS2*, localizado en el cromosoma Xp11.21. Es propia de varones menores de 40 años que presentan anemia, generalmente leve-moderada, microcítica e hipocrómica. La sobrecarga férrica es una constante, e independiente de la frecuencia transfusional, que suele ser inusual en este subtipo de ACS (108–112). En cuanto al

tratamiento, alrededor de la mitad de los casos diagnosticados responden a suplementos orales de piridoxina, al incrementar la actividad de la ALAS2 actuando como cofactor (108–110).

5.1.2 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *SLC25A38*

Es la segunda forma más prevalente de ACS. Es causada por una mutación en homocigosis en el gen *SLC25A38* situado en el cromosoma 3p22.1 y que codifica para el transportador mitocondrial *SLC25A38* (113). Este transportador de membrana mitocondrial es el encargado de internalizar la glicina a la mitocondria para ser empleado por la ALAS (114,115). Se suele diagnosticar al nacimiento o a edades muy tempranas de la vida, presentando las personas afectas una anemia microcítica severa con alta carga transfusional. El tratamiento se basa en transfusiones periódicas de concentrados de hematíes y quelación, no presentando respuesta a la suplementación con piridoxina ni glicina (115). En la actualidad, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es el único tratamiento curativo (116).

5.1.3 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *FECH* (protoporfiria eritropoyética)

Es secundaria a la mutación en el gen *STEAP3* también conocido como *TSAP6*, que codifica para la ferredoxina endosomal necesaria para la utilización eficiente del hierro por parte de los precursores eritroides. Reduce el Fe³⁺ a Fe²⁺, que en combinación con el anillo de protoporfirina formará el grupo hemo (105). La forma de transmisión es autosómica recesiva, aunque se han descrito casos en la literatura de mutaciones heredadas en heterocigosis por baja expresión/silenciamiento del alelo sano. Suele diagnosticarse en la infancia, con anemia moderada-severa microcítica e hipocrómica y sobrecarga férrica (117).

5.2 Síntesis del complejo Fe-S

El Fe mitocondrial es utilizado por los precursores eritroides para la síntesis del grupo hemo tras su unión a la protoporfirina IX, formación de ferritina y síntesis del complejo Fe-S (102).

En la síntesis del complejo Fe-S participan la enzima mitocondrial ISCU con su chaperona HSC20 y la glutarredoxina 5 (GLRX5), siendo exportado por el transportador B7 dependiente de ATP (ABCB7). En el citoplasma, el complejo Fe-S citosólico activa las proteínas reguladoras de hierro (IRP) con actividad aconitasa que participan en la regulación postranscripcional de ALAS2. En condiciones de déficit de hierro, los IRP se combinan con los elementos dependientes del hierro (IRE) suprimiendo la traducción de ALAS2, mientras que con su unión con el complejo Fe-S favorece su traducción (104,118).

Así el complejo, Fe-S tiene un papel decisivo en la homeostasis del hierro, conllevando su alteración al acumulo del hierro mitocondrial y a la formación defectuosa del grupo hemo (119).

Actualmente, se conocen tres genes implicados en la alteración de la función de los clústeres de Fe-S.

5.2.1 Anemia sideroblástica por mutación del gen GLRX5

Los excepcionales casos descritos en la literatura son homocigotos para una mutación en el gen *GLRX5* que afecta a la conformación del ARN mensajero o dobles heterocigotos para dos mutaciones missense en el gen *GLRX5* (120,121). Como consecuencia, se produce una alteración en la traducción de ALAS2, con el consiguiente déficit enzimático, y una disminución en la actividad de la FECH al restringirse la disponibilidad de los complejos FE-S necesarios en el ensamblaje de esta enzima (122,123). En lo referente a la presentación clínica, los pocos casos publicados se trataban de varones de mediana edad con anemia leve-severa microcítica e hipocroma, sobrecarga de hierro y hepatoesplenomegalia (102,104).

5.2.2 Anemia sideroblástica por mutación en el gen ABCB7

Subtipo raro de ACS ligada al cromosoma X. En su etiopatogenia están implicadas mutaciones en el gen *ABCB7* situado en Xp13.3, el cual codifica para un transportador de membrana mitocondrial encargado de exportar el complejo Fe-S al citoplasma (104). La alteración de *ABCB7* provoca así un bloqueo del hierro a nivel mitocondrial, traduciéndose en una disminución de la función de las enzimas citosólicas dependientes del complejo Fe-S. El prototipo de paciente afecto suele ser un varón con anemia leve

microcítica, retraso motor y disfunción espinocerebelosa con ataxia no progresiva e hipoplasia grave cerebelosa (124–126). Se han descrito casos de mujeres heterocigotas para la mutación con afectación hematológica leve, pero sin clínica neurológica (124).

5.2.3 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *HSPA9*

Es debida a una mutación en el gen *HSPA9* localizado en el cromosoma 5q31.2, que codifica para la proteína de choque térmico 9 implicada en la síntesis del complejo Fe-S a nivel mitocondrial (127). El tipo de herencia es autosómica recesiva, aunque se han descrito casos en los que han coexistido una mutación en un alelo con pérdida grave de función con un polimorfismo de nucleótido único heredado en *trans* con alteración en la expresión de ARNm, resultando en un patrón pseudodominante (104,128).

5.3 Genes implicados en la síntesis de la cadena respiratoria mitocondrial

La alteración de los genes implicados en la cadena respiratoria mitocondrial produce formas sindrómicas de ACS con herencia autosómica recesiva.

La cadena respiratoria mitocondrial está formada por cinco complejos enzimáticos formados por subunidades proteicas codificadas por ADN mitocondrial (ADNmt) y el *NDUFB11* (NADH subunidad ubiquinona oxidorreductasa B11 mitocondrial), y están implicadas en reacciones de fosforilación y oxidación. La disrupción a dicho nivel puede provocar acidosis láctica y una reducción de la actividad enzimática del citocromo C oxidasa, responsable de preservar el hierro en estado reducido (Fe^{2+}), lo que se traduce en una alteración en la síntesis del grupo hemo y acumulo del hierro férrico (Fe^{3+}) a nivel mitocondrial (102,104).

Así, la alteración en el ADNmt o en los genes involucrados en el metabolismo del ARN ribosómico mitocondrial conllevan a la supresión de la traducción de proteínas indispensables para la conformación del grupo hemo, siendo este el sustrato etiopatogénico sobre el que se sustenta este tipo de ACS (104). Actualmente, se conocen seis genes implicados: *PUS1* (pseudouridina sintetasa 1), *YARS2* (tirosil-tRNA sintetasa), *TRNT1* (tRNA nucleotidil transferasa 1), *LARS2* (leucil-tRNA sintetasa 2), *NDUFB11* y genes del ADN mt.

5.3.1 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *PUS1* o en el gen *YARS2*

El gen *PUS1* está localizado en el cromosoma 12q24.33 y codifica la enzima pseudouridilato sintetasa. Esta enzima sintetiza de pseudouridina, nucleósido utilizado en la formación del ARN de transferencia (ARNt) mitocondrial. Mutaciones en el gen *PUS1* afectan así a la síntesis de proteínas en los ribosomas mitocondriales, traducándose en un déficit enzimático de los complejos que conforman la cadena respiratoria mitocondrial (129,130).

El gen *YARS2* se encuentra en el cromosoma 12p11.21 y codifica para la enzima tirosil-ARNt sintetasa mitocondrial. Su mutación, puede afectar al ARNt igual que la mutación en el gen *PUS1* (131).

La repercusión a nivel sistémico es similar en ambas mutaciones, con un tipo de transmisión autosómica recesiva. Los pacientes suelen debutar en la infancia con encefalomiopatía, acidosis láctica y anemia sideroblástica (MELAS) (129–131). El tratamiento en la actualidad es meramente sintomático, y tiene una alta tasa de mortalidad infantil.

5.3.2 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *LARS2*

Este tipo de ACS se debe a la mutación en el gen *LARS2* localizado en el cromosoma 3p21.3 y que codifica para la enzima leucil-ARNt sintetasa mitocondrial, que une la leucina al ARNt. Aunque se desconoce el mecanismo molecular subyacente, el déficit enzimático secundario a la mutación en el gen *LARS2* provoca una disminución en la proteína que conforma el complejo I, lo que explicaría los distintos fenotipos con los que se presenta la enfermedad. Hay muy pocos casos descritos en la literatura, homocigotos y doble heterocigotos, con clínica de fallo ovárico precoz y pérdida de audición (síndrome de Perrault) o con acidosis láctica, hidropesia, anemia sideroblástica y fallo multiorgánico (132,133).

5.3.3 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *TRNT1*

Causada por mutaciones en el gen *TRNT1* localizado en el cromosoma 3p26.1 y que codifica la ARNt nucleotidil transferasa 1 (TRNT1), implicada en la adición del trinucleótido citosina, citosina y adenina al extremo 3' de los ARNt mitocondriales y

citoplasmáticos, constituyendo una modificación post-transcripcional vital para los ARNt (134).

Mutaciones en el gen *TRNT1* causan amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde una enfermedad multisistémica compleja de inicio en la infancia que incluyen el síndrome de SIFD (anemia sideroblástica, inmunodeficiencia de linfocitos B, fiebre recurrente y retraso en el desarrollo), hidropesía, cardiomiopatía, nefrocalcinosis, sordera neurosensorial, hasta una microcitosis asintomática y retinosis pigmentaria de aparición en la edad adulta (135–138).

En los pacientes que debutan en el periodo neonatal con afectación multisistémica, el tratamiento es sintomático, con alta mortalidad en la primera década de la vida (138). Son anecdóticos los casos de síndrome de SIFD y trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, aunque parece revertir las manifestaciones inmunológicas y hematológicas, por lo que se postula como una alternativa terapéutica razonable en estos pacientes (139)

5.3.4 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *NDUFB11*

ACS secundaria a mutaciones en el gen *NDUFB11* localizado en el cromosoma X p11.23 y que codifica subunidades proteicas no catalíticas del complejo I de la cadena mitocondrial.

El fenotipo clínico es variable y dependiente del tipo de mutación. Se han descrito casos con anemia sideroblástica, miopatía, acidosis láctica o baja talla; casos en los que han coexistido disgenesia de órganos y alteraciones del neurodesarrollo; mientras que otros casos han presentado microoftalmia y defectos cutáneos lineales (síndrome MLS) o cardiomiopatía histiocitoide sin anemia (140,141).

5.3.5 Anemia sideroblástica por mutación en el gen *SLC19A2*

Debida a la mutación en el gen *SLC19A2* localizado en el cromosoma 1q23.3, que codifica para un transportador de membrana de tiamina. La reducción intracelular de tiamina provoca una disminución en la síntesis de succinil-CoA por la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa, que requiere de tiamina como cofactor para realizar su función. La succinil-CoA sintetizada actúa como sustrato de la enzima mitocondrial

ALAS, conllevando así un defecto en su síntesis a una alteración en la conformación del grupo hemo (141,142).

También conocida como anemia megaloblástica respondedora a tiamina o síndrome de Roger, este tipo de ACS se caracteriza por presentar en la infancia anemia megaloblástica, diabetes mellitus y sordera neurosensorial, pudiendo coexistir con otras manifestaciones como atrofia del nervio óptico, cardiopatía, talla baja y accidentes cerebrovasculares (143).

En cuanto al tratamiento, los niveles de Hb suelen mejorar con el aporte oral de tiamina, persistiendo la alteración en parámetros eritrocitarios como la macrocitosis. La pérdida de audición suele ser irreversible, obteniendo respuestas variables en lo referente a la diabetes (143).

5.3.6 Anemia sideroblástica por mutación en el ADN mitocondrial

El ADNmt codifica para proteínas ribosomales, ARN ribosómico y de transferencia que participan en la formación de los complejos enzimáticos que conforman la cadena respiratoria mitocondrial (104).

Como máximo exponente de los síndromes por afectación en el ADNmt encontramos el síndrome de Pearson, que cursa característicamente con anemia macrocítica hipo-arregenerativa, citopenias moderadas-severas, vacuolización en precursores eritroides y mieloides en médula ósea e insuficiencia pancreática exocrina. Los pacientes afectados pueden presentar también tubulopatía pudiendo progresar a un síndrome de Fanconi, hepatomegalia, desordenes endocrinológicos, trastornos cardiacos, oculares y neuromusculares. Las manifestaciones clínicas se hacen evidentes en el periodo neonatal, y suelen propiciar la muerte prematura del paciente frecuentemente por sepsis, acidosis láctica y/o fallo multiorgánico antes de los cinco años (144,145).

El tratamiento es sintomático con transfusiones, quelantes, complejos enzimáticos, vitaminas liposolubles, suplementos de bicarbonato, prevención de las infecciones..., no siendo efectivos los análogos de la eritropoyetina ni de la trombopoyetina en el tratamiento de las citopenias. El trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos se postula como posible tratamiento en pacientes con citopenias graves

a partir de 3-4 años, presentando como complicaciones su alta mortalidad y su efecto incierto sobre el resto de las manifestaciones sistémicas (144,145).

ALTERACION EN GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DEL GRUPO HEMO					
Gen	Tipo de herencia	Fenotipo asociado	Edad de presentación	VCM	Tratamiento
<i>ALA2</i>	Ligada al X	---	< 40años	↓	Piridoxina (B6)
<i>SLC25A38</i>	AR	---	Infancia	↓	Soporte
<i>FECH</i>	AR	Fotosensibilidad	Infancia	↓	Soporte
AFECTACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA FUNCIÓN DE LOS COMPLEJOS FE-S					
<i>GLRX5</i>	AR	---	Mediana edad	↓	Soporte
<i>ABCB7</i>	Ligada al X	Retraso motor Ataxia Hipoplasia cerebelosa	Infancia	↓/N	Soporte
<i>HSPA9</i>	AR	---	Infancia	↓/N	Soporte
ALTERACIÓN EN LOS GENES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL					
<i>PUS1</i>	AR	Encefalomiopatía Acidosis láctica	Infancia	↑/N	Soporte
<i>YARS2</i>	AR	Encefalomiopatía Acidosis láctica	Infancia	↑/N	Soporte
<i>LARS2</i>	AR	Síndrome de Perrault Acidosis láctica Hidropesia Fallo multiorgánico	Infancia	↓	Soporte
<i>TRNT1</i>	AR	SIFD Nefrocalcinosis Cardiomiopatía Retinosis pigmentaria	Infancia	↓	Soporte
<i>NDUFB11</i>	Ligada al X	Miopatía Acidosis láctica Baja talla MLS Cardiomiopatía histiocitoide	Infancia precoz	N	Soporte
<i>SLC19A2</i>	AR	DM Sordera neurosensorial Atrofia nervio óptico Cardiomiopatía Talla baja	Infancia precoz	↑	Tiamina (B1)
<i>ADNmt</i>	Herencia materna	Síndrome de Pearson Tubulopatía Hepatomegalia Trastornos cardíacos y neuromusculares	Infancia	↑/N	Soporte

Tabla 1. Cuadro resumen de las principales características de cada tipo de ACS.

AR: autosómico recesivo; SIFD: anemia sideroblástica, inmunodeficiencia de linfocitos B, fiebre recurrente y retraso en el desarrollo; MLS: microoftalmia y defectos cutáneos lineales; DM: diabetes mellitus.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar la incidencia de la ECF y otras hemoglobinopatías estructurales en la población neonatal de la Región de Murcia.
2. Evaluar el beneficio que ha supuesto el cribado neonatal de la ECF en la Región de Murcia.
3. Estudiar la implicación del inflamasoma en la eritropoyesis de un paciente diagnosticado de ACS.
4. Evaluar la posible implicación de la ferroptosis en la activación del inflamasoma.
5. Estudiar si la inhibición del inflamasoma puede restaurar la eritropoyesis en células *ex vivo* de un paciente diagnosticado de ACS.
6. Analizar las diferencias de expresión génica en pacientes con diagnóstico de TDT, NTDT, ACS y ECF.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Análisis de variantes de hemoglobina en el cribado neonatal

La técnica inicial utilizada en el cribado neonatal fue la electroforesis capilar utilizando el kit Capillary Neonatal suministrado por la casa comercial Sebia®. Para su detección, se trabajó con muestras de 3.6 mm de diámetro de sangre impregnada en papel perforadas mediante el equipo Panthera Puncher™9 de la casa comercial Perkin Elmer® y depositadas en segmentos de 8 pocillos. Para realizar el hemolizado se añadía 50 µL de agua ultrapura a cada pocillo de cada segmento y posteriormente se incubaba durante 20-24h en una cámara humidificada a 2-8°C permitiendo la hemólisis de los hematíes, cuya Hb puede analizarse directamente utilizando el sistema de electroforesis capilar-Sebia 2 NeonatFast™. La trazabilidad completa de los resultados se aseguraba mediante la numeración completa de las muestras a través de códigos de barras.

Cuando se detectaba una variante estructural de Hb en el cribado, la familia se derivaba al Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), donde se realizaban las pruebas confirmatorias de los resultados obtenidos en el recién nacido, se ampliaba el estudio a los progenitores y se proporcionaba consejo genético en todos los casos.

Tras obtener el consentimiento informado, se obtenía por venopunción una muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA y se sometía en primer lugar a electroforesis capilar mediante el sistema MINICAP (Sebia®), que realizaba automáticamente todas las etapas de la electroforesis. El sistema lee los códigos de barras de los tubos de muestras y realiza la dilución de las muestras utilizando cúpulas de reactivos desechables, que incluyen un depósito anódico. Utiliza dos tubos capilares y los limpia utilizando diferentes soluciones (solución de lavado MINICAP, agua destilada y/o tampón de análisis). En cada columna previamente se realizaba un control de calidad interno. A continuación, se inyectaban las muestras en los capilares poniendo en contacto uno de sus extremos con las muestras diluidas, aspirando un volumen muy pequeño de muestra en cada capilar. Posteriormente, se realizaba la migración a temperatura constante utilizando un sistema de efecto Peltier y se detectaban las fracciones separadas mediante espectrofotometría de absorbancia. Por último, los resultados eran editados mediante el programa informático PHORESIS (Sebia®, Lisses, Francia).

Tras la detección de una variante de Hb, se realizaba el estudio mutacional del gen de β -globina mediante el método Globin StripAssay[®] (ViennaLab, Viena, Austria), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una hibridación inversa. Se trata de una prueba genética cualitativa para análisis específico de deleciones y mutaciones puntuales frecuentes de los genes de las subunidades β (*HBB*), $\alpha 1$ (*HBA1*) y $\alpha 2$ (*HBA2*) de la Hb en ADN aislado de sangre periférica humana. El procedimiento incluye tres pasos: aislamiento del ADN, amplificación de la PCR mediante cebadores biotinilados e hibridación de productos de amplificación en una Test-strip que contenga sondas de oligonucleótidos alelo específicas inmovilizadas como una matriz de líneas paralelas. Las secuencias biotiniladas unidas se detectan mediante sustratos de color y fosfatasa alcalina-estreptavidina.

El ensayo β -Globin StripAssay[®] MED cubría las 22 mutaciones más frecuentes del gen de la β -globina en el área mediterránea (>90% de los defectos de β -globina encontrados en los países mediterráneos) (**figura 15**):

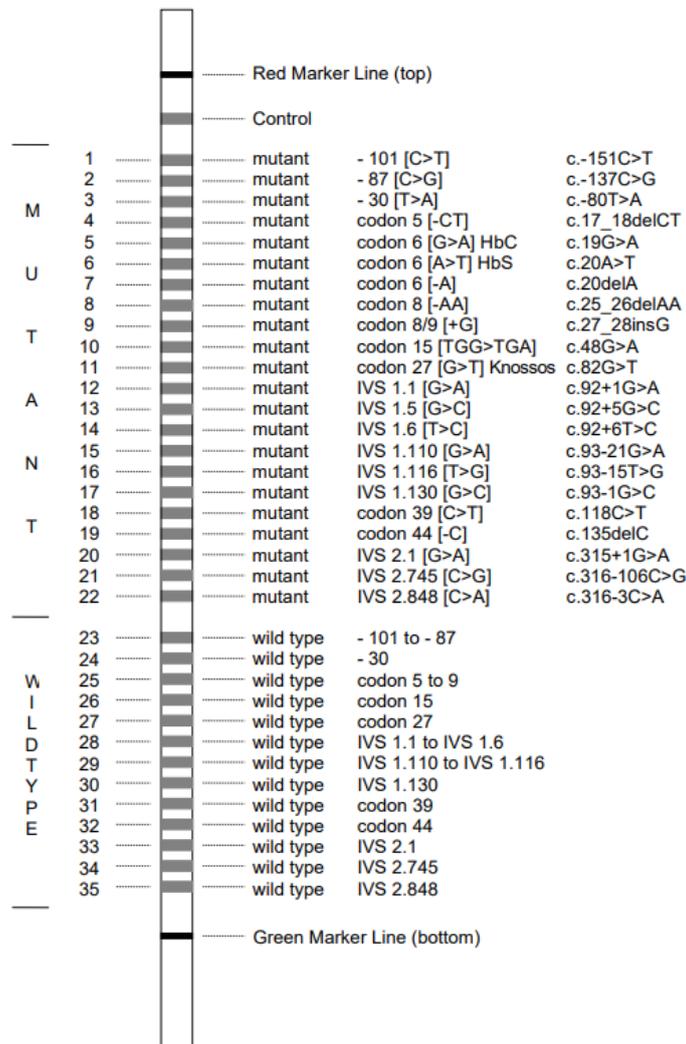


Figura 15. β -Globin StripAssay® con las 22 mutaciones descritas más frecuentes.

En casos seleccionados en los que la fracción de Hb variante era significativamente baja (**tabla 2A**), se procedía a descartar α -talasemia mediante el ensayo α -Globin StripAssay®, que permite detectar las siguientes mutaciones del locus del gen de la α -globina (**tabla 2B**):

A

HEMOGLOBINA C HETEROCIGOTA	
HbC ≤ 30%	Delección - α3.7 heterocigota (-α ^{3.7} /αα)
HbC ≤ 25%	Delección - α3.7 homocigota (-α ^{3.7} /-α ^{3.7})
HEMOGLOBINA S HETEROCIGOTA	
HbC ≤ 35%	Delección - α3.7 heterocigota (-α ^{3.7} /αα)
HbC ≤ 30%	Delección - α3.7 homocigota (-α ^{3.7} /-α ^{3.7})

B

Nombre anterior	Nomenclatura HGVS	Ref. SNP
1 -3,7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2 -4,2 kb	n.d.	--
3 -20,5 kb	NG_000006.1:g.15164_37864del22701	--
4 --MED-I	NG_000006.1:g.24664_41064del16401	--
5 --SEA	NG_000006.1:g.26264_45564del19301	--
6 --THAI	NG_000006.1:g.10664_44164del33501	--
7 --FIL	NG_000006.1:g.11684_43534del31851	--
8 Triplicación de genes anti-3,7	n.d.	--
9 cd 14 [G>A]	HBA1:c.44G>A	rs63750090
10 cd 59 [G>A] Hb Adana	HBA1:c.179G>A	rs28928878
11 initiation cd [T>C]	HBA2:c.2T>C	rs111033603
12 cd 19 [-G]	HBA2:c.60delG	rs886041399
13 IVS1-5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG	rs41474145
14 cd 59 [G>A]	HBA2:c.179G>A	rs281864846
15 cd 125 [T>C] Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C	rs41397847
16 cd 142 [T>C] Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C	rs41464951
17 cd 142 [T>A] Hb Icaria	HBA2:c.427T>A	rs41464951
18 cd 142 [A>T] Hb Pakse	HBA2:c.429A>T	rs41412046
19 cd 142 [A>C] Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C	rs41321345
20 polyA-1 [AATAAA>AATAAG]	HBA2:c.*+94A>G	rs63751269
21 polyA-2 [AATAAA>AATGAA]	HBA2:c.*+92A>G	rs63750067

Tabla 2. A) Proporción por electroforesis de variantes estructurales de cadena β en combinación con α talasemia. **B)** Mutaciones del locus del gen de la α-globina detectadas mediante el ensayo α-Globin StripAssay®.

2. Cultivo celular

Se emplearon células K562 (CRL-3343; American Type Culture Collection) que se mantuvieron en medio de cultivo RPMI suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FCS), 2 mM de glutamina y un 1% de penicilina-estreptomina (Life Technologies). Las células fueron autenticadas mediante perfiles de STR y se descartó contaminación por mycoplasma. El subcultivo celular se realizó cada 72h antes de la confluencia. Para su diferenciación, las células fueron tratadas con 50 μM de hemina (#16009-13-5, Sigma-Aldrich), preparada según lo descrito en la bibliografía (146), en presencia de 0,1% de DMSO o del inhibidor de CASP1 VX-765 (100 μM), (MedChemExpress). La recogida de las células se efectuó a las 0, 24, 48, 72 y 96h de la adición de hemina, se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS, almacenándose a -80°C para su posterior análisis.

Otra línea celular empleada fueron las células HEK293 que expresan de forma estable ASC GFP (donadas por el Dr. E. Meunier) que se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 1% de penicilina-estreptomina (Gibco), 10% FBS (Cytiva HyClone

SV30160.03) y 1% 100X L-glutamina a 37°C y 5% de CO₂. Previo a la estimulación, se sembraron en placa de 24 pocillos 100 000 células de HEK293 ASC GFP o HEK293 ASC GFP transfectadas con variantes de NLRP1 en un medio completo.

3. Obtención de células mononucleadas de sangre periférica y diferenciación eritroide

Se obtuvieron muestras de sangre periférica en tubo de heparina de litio de 10 ml de varios donantes sanos y del paciente diagnosticado de ACS. Las muestras fueron proporcionadas por el Servicio de Hematología del HCUVA conforme a lo aprobado en el comité de ética (2021-11-9-HCUVA; 2023-3-5-HCUVA). Se aislaron las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (Cytiva) (REF17544202). Las células recolectadas se sembraron por duplicado en placas de 6 pocillos, a una concentración de 1 millón/pocillo, incubándose a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante 15 días. El medio empleado para el crecimiento celular fue medio Dulbecco modificado de Iscove (Gibco, 12440-053) compuesto por un 2% de plasma humano AB (SeraCare 501973), un 3% de suero humano AB (Atlanta Biologicals S40110), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina (Gibco), 3 UI/mL de heparina (ReigJofre 608737. 4), 200 µg/mL de holotransferrina humana (Sigma-Aldrich, T0666-1G), 3 UI/mL de EPO (Gibco PHC2054), 10 µg/mL de insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich, I9278), 10 ng/mL de factor de células madre humanas (PeproTech 300-07) y 1ng/mL de interleucina 3 (IL-3) (PeproTech, 200-03). Las células se recogieron durante 12 días tras la siembra, se centrifugaron a 1500-1700 rpm y se lavaron con PBS al 1X, almacenando el pellet celular a -80°C previa a su cuantificación proteica e inmunotransferencia. Para el estudio por microscopía o CMF, se analizaron suspensiones celulares recién recogidas a diferentes días de diferenciación.

4. Ensayo de unidades formadoras de colonias eritroides

Tras su aislamiento, se cultivaron los PBMCs (100.000 células) en 1 mL de MethoCult™ Methylcellulose-Based Media (Stemcell) en presencia del inhibidor de CASP1 VX-765 (100 µM) (HY-13205 MedChemExpress), Ferrostatin-1 (1 µM) (HY-100579 MedChemExpress) o DMSO como control. Las células se incubaron y cultivaron

a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂, contándose en lupa a los 14 días del cultivo las CFU-E.

5. Mutagénesis

En el ensayo de mutagénesis se empleó el kit Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Labs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con anterioridad, se diseñaron los cebadores con la mutación puntual a estudio en Sigma-Aldrich. Para comprobar por secuenciación los plásmidos que incorporaban la mutación deseada.

6. Citometría de flujo

Las suspensiones celulares (100.000 células) se conjugaron durante 30 minutos en oscuridad con los anticuerpos anti-CD71-FITC (14-0719-82, Invitrogen) y anti-Ter-119-PE (12-5921-82, Invitrogen). A continuación, se lavaron con BSA al 5% en PBS, y se analizaron mediante la técnica FACS (BD LSR Fortessa X-20, BD Bioscience) al séptimo día de la diferenciación eritroide.

7. Evaluación de la oligomerización de ASC mediante citometría de flujo

Las células sanguíneas se trataron durante 30 minutos con MCC950 (10 µM) o PLX-4720 (10 µM) previa a la estimulación con anisomicina (1 µM) durante 3h. Posteriormente, se lisaron los hematíes en medio hipotónico, y se fijaron y preservaron los leucocitos con la solución de lisado/fijación FACS (#349202, BD Biosciences). Los monocitos se marcaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 conjugado con fluoresceína (FITC) (clon M5E2; catálogo nº 557153; BD Biosciences, 1:10). La detección en monocitos de ASC se realizó mediante la técnica de evaluación del inflammasoma por Time-of-Flight (TOFIE), tal como se ha descrito recientemente (147,148), empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ASC conjugado con ficoeritrina (PE) (clon HASC-71; #653903; BioLegend, 1:500) y el citómetro de flujo FACS-Canto (BD Biosciences).

8. Inmunofluorescencia

Se sembraron 50000 células primarias en 100 µl sobre un cubreobjetos de Poly-L-Lys Cellware de 12 mm (Corning), dejándose que se adhirieran al cubreobjetos a temperatura ambiente durante diez minutos; seguidamente, se añadió medio de cultivo

con hemina y los compuestos adecuados. Tras la adición de los compuestos, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos, se incubaron a temperatura ambiente con glicina 20 mM durante otros 20 minutos, se permeabilizaron con NP40 al 0,5% y se dejaron en bloqueo con BSA al 2% durante 1h. Posteriormente, se marcaron las células con el anticuerpo primario elegido diluido al 1/200, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 o de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 diluido al 1/400 (ThermoFisher Scientific). Las muestras se montaron mediante un medio de montaje Dako y se analizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 y un software Leica Microsystems. Las imágenes se adquirieron en formato 1.024×1.024 píxeles en modo de barrido secuencial para evitar la diafonía entre los fotogramas. Se empleó un objetivo HCX PL APO CS $\times 63$, con valor del Pinhole de 1, equivalente a $114,73 \mu\text{m}$.

9. Inmunotransferencia (Western Blot)

Las células recolectadas se lisaron en 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% (p/v) NP-40 e inhibidor de proteasas (1/20, #P8340, Sigma-Aldrich). La cuantificación proteica se hizo con el kit BCA, empleando BSA como estándar. Con los lisados celulares obtenidos (40 μg) en tampón de SDS, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida, transfiriéndose posteriormente a membranas de nitrocelulosa. A continuación, las membranas se incubaron con TTBS con un 5% (p/v) de leche desnatada en polvo o un 2% (p/v) de BSA durante 1h, sometándose posteriormente a inmunotransferencia en el mismo tampón a 4°C durante 16h con los diferentes anticuerpos primarios diluidos a 1/1000 (**tabla 3**). Posteriormente, los blots se lavaron con TTBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1h con diferentes anticuerpos secundarios conjugados con HRP diluidos 2.500 veces en leche desnatada al 5% (p/v) o en BSA al 2% (p/v) en TTBS (**tabla 3**). Tras numerosos lavados con TTBS, se detectó la señal con reactivo de quimioluminiscencia mejorada y ChemiDoc XRS Biorad.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
GATA 1 de conejo (#3535, Cell Signaling)	1/1000	anti-rabbit (#A6154, Sigma-Aldrich)	1/2500
NLRP1 N-term (#AF6788, R&D Systems y #67980, Biolegend)	1/1000	anti-sheep (#31480, Thermofisher)	1/2500
NLRP1 C-term (#ab36852, Abcam)	1/1000	anti-rabbit (#A6154, Sigma-Aldrich)	1/2500
CASP1 (#sc-56036 Santa Cruz Biotechnology)	1/1000	anti-rabbit (#A6154, Sigma-Aldrich)	1/2500
HSP70 (#1674872S, Cell Signaling)	1/1000	anti-rabbit (#A6154, Sigma-Aldrich)	1/2500
ACTB-HRP (#sc-47778, Santa Cruz Biotechnology)	1/1000		

Tabla 3. Cuadro resumen de los anticuerpos primarios y secundarios empleados.

10. Secuenciación de nueva generación (NGS)

Las muestras de sangre se extrajeron en tubo de heparina de 10 ml en el HCUVA previa firma del consentimiento informado por los pacientes, realizándose el análisis posterior en una empresa externa mediante el secuenciador Illumina NovaSeq.

11. Ensayo de Specks

Se transfectaron células HEK293 ASC GFP y HEK293 ASC GFP NLRP1+ con lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), sometiéndose posteriormente durante 3-4h a diferentes estímulos y tiñéndose con Hoechst (H3570, Invitrogen). Con el microscopio de fluorescencia Leica DMI8, se tomaron imágenes de los núcleos (fluorescencia azul) y de los specks (fluorescencia verde) a diferentes aumentos (4X y 20X), realizándose la cuantificación posterior con el programa Fiji. A continuación, se

aplicó un umbral, se utilizó el analizador de partículas para realizar el recuento celular total y el instrumento multipunto para el conteo de los specks. Finalmente, se creó un gráfico para representar el porcentaje de specks con relación al número total de células.

12. Ensayo de inducción de ferroptosis

Las células KO K562 para NLRP1 disponibles en el laboratorio se transfectaron con el plásmido correspondiente utilizando el 4D-nucleofector (Lonza), siguiendo las instrucciones del fabricante del SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit.

A las 24h de la transfección, se trataron las células con hemina (10 μ M) e hidroperóxido de cumene (20 μ M) (247502, Sigma-Aldrich) o erastina (10 μ M) (#17754, Cayman Chemical) ambos inductores de la ferroptosis. Tras 24h con el tratamiento, las células se recogieron, se centrifugaron y lavaron con PBS, almacenándose a -80°C para su posterior análisis por inmunotransferencia.

13. Secuenciación de ARN

El proceso de secuenciación comenzó con la extracción del ARN en tubos PAXgene, para lo que se utilizó el kit NluceoSplin RNA blood mid (Macherey-Nagel). Seguidamente, se preparó la librería de ARN utilizando el QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD (Lexogen).

Previamente a la secuenciación, se midió la concentración inicial de ARN, y se verificó la Calidad de la librería mediante el dispositivo QIAxcel Advanced System (Qiagen).

Por último, se secuenciaron todas las muestras según el protocolo establecido por Illumina en un equipo Hiseq XTen (150x2). Los datos crudos obtenidos de la secuenciación se obtuvieron en formato FASTQ y fueron utilizados en el análisis bioinformático posterior.

14. Control de Calidad y alineación con el genoma de referencia

La empresa realizó la limpieza de las secuencias de los datos crudos según calidad (trimming), eliminando de las secuencias los adaptadores de secuenciación. A continuación, se utilizó la herramienta FastQC2 para estudiar la calidad de los ficheros

FASTQ generados, los cuales deben tener un buen dato de %Q20, ausencia de Ns en las lecturas, ausencia de adaptadores, secuencias poliA, etc.

Al tratarse de un protocolo con amplificación de la región 3', las lecturas en el proceso de trimming fueron específicamente recortadas en el extremo 3', para eliminar posibles regiones poliA del mensajero que pudieran interferir en la eficiencia del proceso de mapeado posterior.

Las lecturas generadas se mapearon contra el genoma referencia mediante el software STAR, que es un software diseñado específicamente para tener en cuenta las dificultades en el mapeo, al considerar las posibles separaciones por splicing.

15. Cuantificación de la expresión

A continuación, se empleó el programa HTSeq-count para calcular los conteos de cada gen utilizando el fichero de regiones *.gtf obtenido de nuevo del ensamblaje del NCBI. Cuanto mayor es el número de lecturas asignadas a un gen, se intuye que la expresión de dicho gen será también mayor, sin embargo, para poder realizar estas comparaciones, es necesario normalizar los datos en base a distintas variables.

La normalización lleva a cabo un proceso de modelación y manipulación de los conteos que facilita su comparación entre muestras. Posteriormente, los conteos normalizados se comparan para encontrar genes con diferencias significativas de expresión entre los grupos de interés. En este caso, el pipeline desarrollado empleó el programa informático DESeq para procesar la información de expresión obtenida.

16. Análisis de componentes principales y análisis de expresión diferencial

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el lenguaje de programación R, junto con otros programas bioinformáticos, para procesar y filtrar los datos y extraer conclusiones a partir de los datos de conteos generados por HTSeq.

Se utilizó PCA (análisis de componentes principales) para evaluar la similitud entre las muestras a partir de los recuentos normalizados con el fin de estimar la calidad del experimento. La similitud de expresión entre las muestras se utilizó para clasificar la información obtenida según las características clínicas de cada uno de los grupos a estudio.

Para el análisis de expresión diferencial se emplearon paquetes disponibles en Bioconductor (R) como DESeq2, ggplot, pheatmap, stringr, etc. Softwares que ayudan en el procesamiento y visualización de los datos, con el fin de conseguir una perspectiva más comprensible de los resultados finales.

17. STRING

String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) es una base de datos que integra la información existente sobre interacciones entre genes y proteínas. Para ello, combina resultados de predicciones computacionales, datos experimentales y el estudio de la información publicada en la literatura científica. Los datos obtenidos, se estructuran en forma de red, donde los nodos simbolizan genes o proteínas, y los enlaces las interacciones físicas o funcionales entre ellos. Cada una de estas interacciones tiene un valor de confianza “p value” en base a la evidencia científica disponible.

Así, esta base de datos permitió visualizar complejas redes entre genes y proteínas, y filtrar las interacciones entre ellos según criterio del investigador, en nuestro caso incrementando el nivel de confianza de las interacciones a 0.9. Facilitando el análisis posterior de relaciones funcionales en contextos biológicos diferentes.

18. Análisis estadísticos

Se empleó el software estadístico de análisis predictivo GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software) para el cálculo de medidas de tendencia central (media \pm desviación estándar), test paramétricos como la t de student y test no paramétricos como la prueba de la ANOVA unidireccional y prueba de Sidak (para más de 2 muestras).

**CAPÍTULO 1: CRIBADO NEONATAL DE
HEMOGLOBINOPATÍAS EN LA REGIÓN DE MURCIA**

RESULTADOS

Los resultados de este capítulo están basados en un estudio retrospectivo en la Región de Murcia. Entre los años 2016 y marzo de 2023 se estudiaron 104.083 recién nacidos (RN) en la Región de Murcia, de los cuales 501 fueron remitidos desde las distintas áreas de salud a la consulta de hematología del HCUVA por detección de una variante anómala de Hb en el cribado neonatal (**figura 16**).

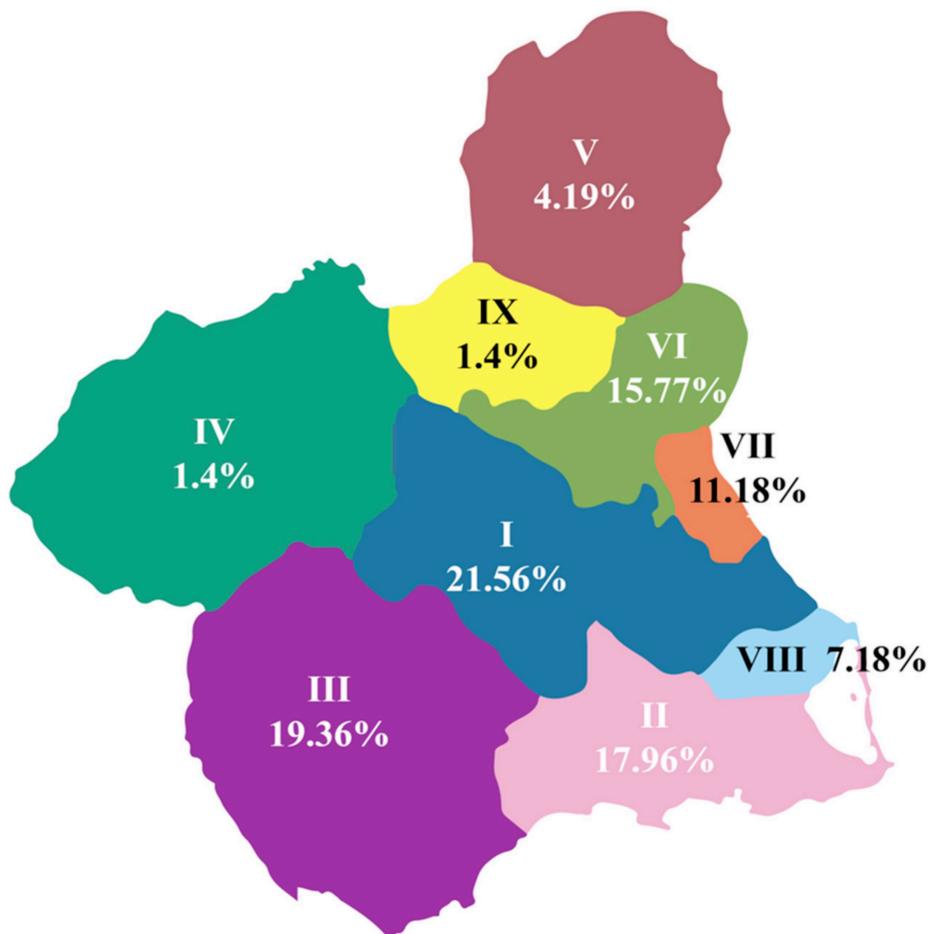


Figura 16. Proporción de RN derivados desde las diferentes áreas de salud.

La incidencia por 100.000 habitantes en la región fue de 3,02, siendo la incidencia por 100.000 habitantes entre las distintas áreas de salud similar. La mayor incidencia se reportó en el área III, probablemente debido al mayor flujo migratorio (**tabla 4**) (40).

Área de Salud	%	Casos totales	Población	Incidencia (por 100,000)
I	21,56	108,0156	269.627	4,01
II	17,96	89,9796	288.536	3,12
III	19,36	96,9936	180.577	5,37
IV	1,4	7,014	69,947	1,00
V	4,19	20,9919	60.828	3,45
VI	15,77	79,0077	272.042	2,90
VII	11,18	56,0118	204.969	2,73
VIII	7,18	36,0219	109,851	3,28
IX	1,4	7,014	54.874	1,28
Total	100	501	1.511.251	
Incidencia media				3,02

Tabla 4. Incidencias de variantes estructurales de hemoglobina por área de salud.

El total de casos detectados con alguna variante de hemoglobina fue de 498 (4,8 de 1000 casos). De ellos, 5 RN fueron homocigotos para HbS (SS, fenotipo neonatal FS) (0,05 de 1000 casos), y otros 5 fueron doble heterocigotos para HbSC (0,05 de 1000 casos). Por lo tanto, los síndromes falciformes globales detectados en nuestro estudio fueron de 10 casos (0,1 de 1000 casos).

El resto de las variantes de hemoglobina (sin síndromes falciformes) detectadas correspondieron a 285 portadores (2,7 de 1000 casos) de HbS (fenotipo neonatal FAS), 182 casos de portadores de HbC (fenotipo neonatal FAC) y 17 casos fueron portadores de otras variantes de Hb (HbG-Philadelphia, HbD, HbE, HbJ, HbO-Arabia, o doble heterocigotos HbC-Korle Bu) y de α -talasemia.

Cabe destacar que 4 casos fueron homocigotos para HbC (CC), una condición que puede asociarse con anemia moderada secundaria a un estado hemolítico crónico. Por último, se detectaron 3 casos de fallo de cribado o falsos positivos (0,6%), en los que no se confirmó la presencia de ninguna variante (**tabla 5**).

En cuanto a las variantes de hemoglobina detectadas, el 2,8% de los RN fueron homocigotos o doble heterocigotos para variantes estructurales de cadena β (SS, SC y CC), lo que confirmó la heterocigosidad en el grueso de los RN analizados (**tabla 5**). De este último grupo, en el 4,8% de los casos estudiados, ambos progenitores resultaron ser doble heterocigotos: 3,4% AS/AS, 0,2% AS/AC, 0,2% AS/O-Arabia y 1% AS/ α -talasemia.

Variante de Hemoglobina	Número (%)
Síndromes drepanocíticos	
SS	5 (1)
SC	5 (1)
Portadores (heterocigotos)	
HbS	285 (57)
HbC	182 (36,5)
HbG-Philadelphia	7 (1,4)
HbD	4 (0,8)
HbE	1(0,2)
HbJ	1 (0,2)
HbO-Arabia	1 (0,2)
Otras	
CC	4 (0,8)
α -talasemia	2 (0,4)
HbC/Korle-Bu	1 (0,2)

Tabla 5. Variantes de hemoglobina detectadas en RN en el cribado neonatal.

SS: homocigoto para HbS; CC: homocigoto para hemoglobina C; SC: doble heterocigoto para HbS y HbC.

Del total de RN estudiados, sólo en el 3,6% de los casos ambos progenitores eran de origen europeo, siendo en el resto de los casos estudiados, al menos uno de los progenitores de origen africano o sudamericano (hispano). De los 943 padres analizados, el 70% procedían del continente africano, aunque el país de origen sólo se recogió en 700 de ellos (**figura 17**).

De los 943 padres estudiados, el 1,7% fueron homocigotos o doble heterocigotos para una variante estructural de cadena β : 0,1% SS, 0,6% SC y 1% CC (**tabla 6**).

Aunque no era un objetivo del cribado neonatal, se detectó un 1,2% de portadores silentes de α -talasemia. De este grupo, el 27,3% tuvo descendencia con α -talasemia, en el 27,3% no fue detectado, y el 45,4% de los RN no fue estudiado por muestra insuficiente.

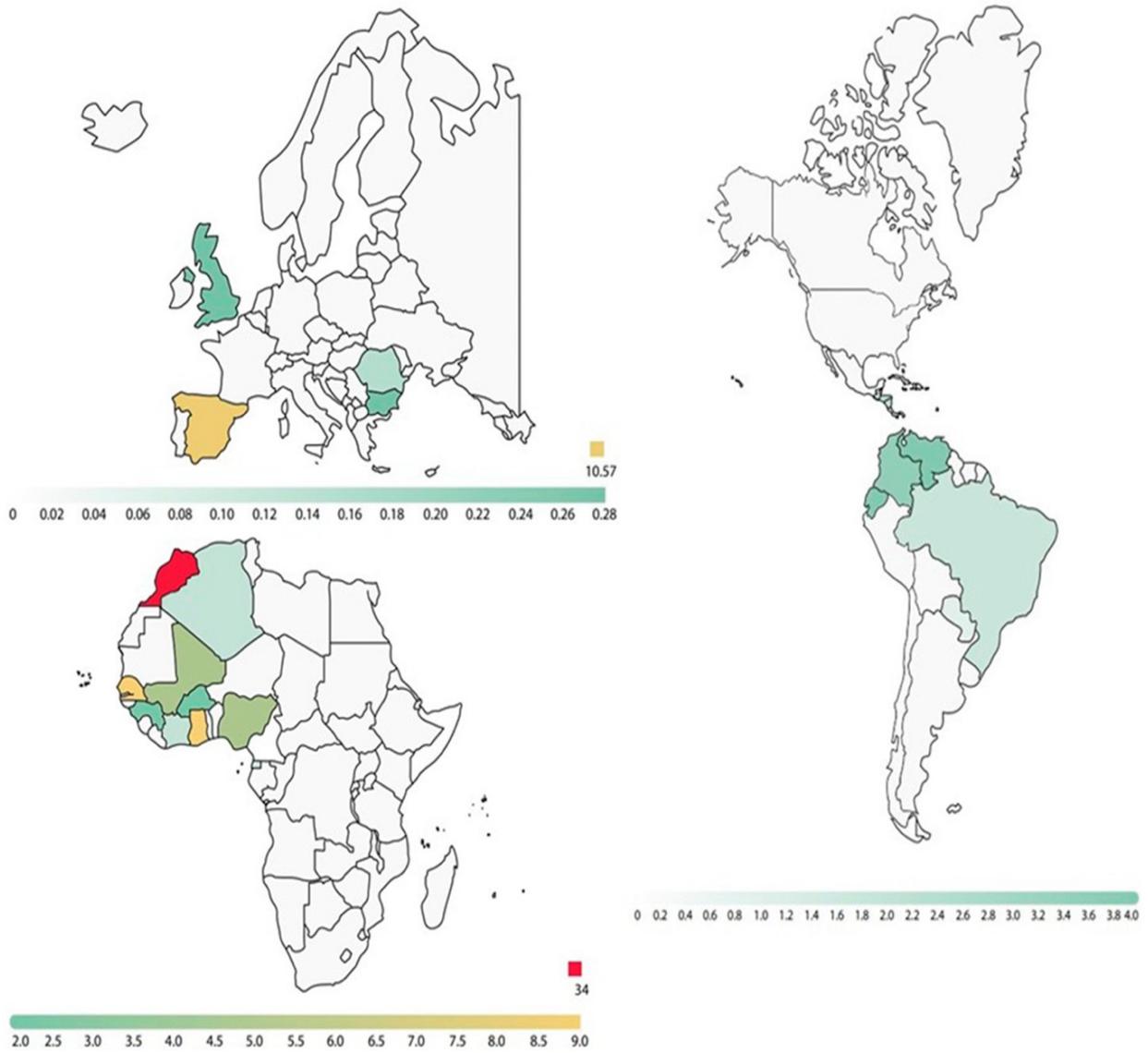


Figura 17. Gráfico de intensidad de color que muestra la procedencia de los progenitores.

Regiones	Variantes de hemoglobina detectadas en los padres					
	AS	AC	SS	CC	SC	Otras
Norte	57 (6%)	67 (7.1%)	-	2 (0.2%)	1 (0.1%)	2 (0.2%)
Occidental	102 (10.8%)	49 (5.2%)	-	6 (0.6%)	4 (0.4%)	-
África	Central	4 (0.4%)	-	-	-	-
	Oriental	-	-	-	-	-
	Sur	-	1 (0.11%)	-	-	-
Desconocido	32 (3.4%)	22 (2.3%)	-	2 (0.2%)	1 (0.1%)	2 (0.2%)
América	57 (6%)	20 (2.1%)	1 (0.1%)	-	-	1 (0.1%)
Canadá	1 (0.1%)	-	-	-	-	-
Europa	9 (1%)	4 (0.4%)	-	-	-	6 (0.6%)

Tabla 6. Frecuencia de las variantes de hemoglobina detectadas en los progenitores según el país de origen.

AS: portador de HbS; AC: portador de HbC; SS: homocigoto para HbS; CC: homocigoto para HbC; SC: doble heterocigoto para HbS y HbC; Otras variantes en heterocigosis: HbD, E, J, O-Arabia, G-Philadelphia y Korle Bu.

DISCUSIÓN

Es la primera vez que se analizan los datos del cribado neonatal en la Región de Murcia desde su implantación en marzo de 2016. La prevalencia de la ECF en nuestra región es de aproximadamente 1 caso por 10.000 RN, inferior a los datos publicados por otras comunidades autónomas como Cataluña (1/3155), Islas Baleares (1/6756) y Madrid (1/5552), donde el influjo migratorio es mayor (39). A excepción de estas comunidades, nuestros datos coinciden con lo reportado en otras regiones de España como Andalucía Occidental (1/12356) (39,149).

En nuestra región, el cribado neonatal de la ECF se implantó dentro de las medidas preventivas incluidas en los programas de salud pública, que tienen como objetivo la intervención médica precoz en beneficio del RN (Comité de detección de trastornos metabólicos y genéticos hereditarios) (150).

Desde su implantación en 2016, el cribado neonatal ha tenido dos objetivos principales: la detección de RN con ECF para su derivación precoz a la consulta de hematología infantil con los objetivos de iniciar una profilaxis antibiótica con penicilina oral y de un programa de vacunación precoz, además de informar y educar a los padres en la detección de las crisis dolorosas y la atención precoz de estas. También se ha ofrecido asesoramiento genético a todos los portadores de la Región de Murcia con el fin de reducir el número de personas afectas con la ECF. En el 3,8% de los progenitores a los que se ofreció consejo genético, ambos eran heterocigotos para una variante estructural de la cadena β (3,4% AS/AS, 0,2% AS/AC y 0,2% AS/O-Arabia) y por tanto con riesgo de tener un hijo con un síndrome drepanocítico.

El asesoramiento genético es difícil de aplicar en la práctica diaria debido a las barreras idiomáticas y a los problemas socioculturales y laborales inherentes a la población más susceptible. Estos problemas se traducen en estudios familiares incompletos (6%), ausencia en las citas médicas y dificultad para comprender el consejo genético. No obstante, se hace necesario un mayor asesoramiento genético para evitar las variantes más severas de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta que la mortalidad en menores de 5 años es elevada, un 30%, y a pesar de que la incidencia no es tan alta como en otras regiones y que en todos los

casos detectados los padres eran de origen no europeo, creemos que el cribado de la ECF debería ser universal, tal y como recomienda la ANHI (151). Los síndromes drepanocíticos, como se explicó en la introducción, engloban a los homocigotos para HbS pero también a los dobles heterocigotos para otras variantes estructurales de cadena β (HbC, HbE, HbD) y para β -talasemia, hemoglobinopatía más prevalente en nuestro país (152). De ahí, la importancia de un cribado universal que nos permita detectar a portadores de hemoglobinopatías con el objetivo de disminuir el nacimiento de RN con formas graves de drepanocitosis. Sin embargo, algunos grupos consideran que el cribado selectivo es más eficaz (153,154).

En España existe poca información sobre la incidencia real de las diferentes formas de hemoglobinopatías. Nuestros datos pueden contribuir a un mejor conocimiento de la incidencia de la ECF en las diferentes regiones mediterráneas, y animar a extender el cribado a aquellas regiones donde no está implantado.

Debido al aumento de los movimientos migratorios, los programas de cribado neonatal en los países occidentales se han hecho indispensables. El diagnóstico precoz de la ECF permite un tratamiento óptimo con una disminución de la morbimortalidad infantil. Todos los RN detectados en el programa se han beneficiado de una atención médica precoz, están en seguimiento en nuestra unidad pediátrica y no han desarrollado ninguna complicación durante el seguimiento del estudio.

A pesar de su dificultad, es necesario seguir mejorando las habilidades de comunicación con los padres, y ofrecer consejo genético a todos los portadores detectados de forma sencilla y en un lenguaje que puedan entender, y confirmar siempre que el mensaje transmitido ha sido comprendido.

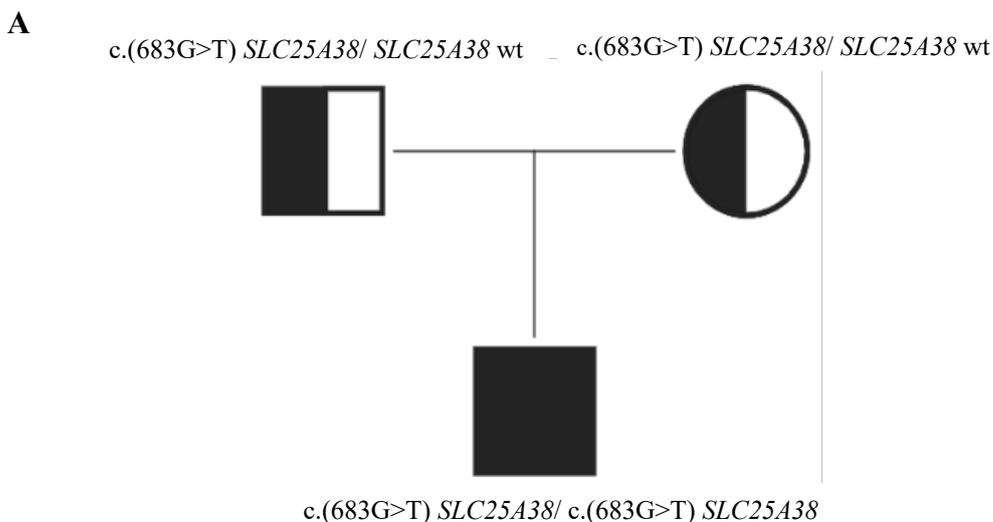
Al tratarse de un estudio retrospectivo, no pudieron recogerse todos los datos. En algunas ocasiones, no tuvimos acceso a ambos progenitores o éstos no acudieron a su cita en consulta. Esto es debido a la situación social de esta población, compuesta en su mayoría por inmigrantes con pocos recursos económicos. Sin embargo, el estudio tiene como punto fuerte que es el primero realizado en la Región de Murcia que ofrece una estimación sobre la prevalencia de la ECF y de otras hemoglobinopatías. Al ser una comunidad autónoma pequeña, nos ha permitido implantar no sólo el cribado universal sino el consejo genético universal para todos los portadores (rasgo falciforme).

CAPÍTULO 2: PAPEL DEL INFLAMASOMA EN LA ANEMIA CONGÉNITA SIDEROBLÁSTICA

RESULTADOS

1. Implicación de NLRP1 en la etiopatogenia de la anemia congénita sideroblástica

Para dilucidar las implicaciones clínicas del inflamasoma en la eritropoyesis, estudiamos el inflamasoma en la ACS por mutación en el gen *SLC25A38*. Se seleccionó este tipo de anemia por ser una enfermedad extremadamente rara, sin tratamiento en la actualidad, y con gran impacto en la calidad de vida de los pacientes. El paciente de nuestro estudio es un varón de 20 años diagnosticado en la infancia de ACS con mutación en homocigosis c.(683G>T) en el gen *SLC25A38* (**figura 18A**). Desde su nacimiento, el paciente ha sido tratado con múltiples suplementos vitamínicos (piridoxina, tiamina, glicina) sin respuesta, encontrándose actualmente en régimen transfusional intensivo de 3 CH cada dos semanas, manteniendo cifras de Hb basal en torno a 7 g/dl y rechazando el trasplante de PPHH como única alternativa curativa. Como complicaciones secundarias a su enfermedad de base presenta una nefrocalcinosis grado II bilateral en tratamiento con citrato potásico, sobrecarga férrica cardiaca en tratamiento con doble quelación oral con deferasirox y deferiprona, y una leve disfunción sistólica de ventrículo izquierdo en seguimiento en la unidad de cardiología (**figura 18B**). La imagen de la médula ósea muestra los típicos sideroblastos en anillo causados por el acumulo de hierro a nivel mitocondrial (**figura 18C**).



B

Características clínicas		Parámetros
Genotipo		<i>SLC25A38</i> : c.(683G>T) en homocigosis
Enfermedades concomitantes		Nefrocalcinosis bilateral grado II
Tratamiento crónico		Deferasirox (1800 mg x5 días, 1440 mg x2 días) Deferiprona (1000 mg/8h) Citrato potásico 1080 mg/24h Ácido fólico 5 mg/24h Vitamina D 25000 UI/mensual
Estado Óseo	Metabolismo óseo	Vitamina D 17.6 ug/L, PTH 15.9 pg/ml, Ca 8.54 mg/dL, P 3.6 mg/dL
	Densitometría	Z-score -0.7
Parámetros hematimétricos		Hb 7-8 g/dL, VCM 84.8 fL, reticulocitos $4.6 \times 10^3/uL$ (0.19%)
Eritropoyetina		859 U/L
Sobrecarga férrica	Patrón ferrocínético	Hierro 278 ug/dL, ferritina 502 ng/ml, transferrina 172 mg/dL, IST 100%
	RM cardíaca	T2* 14 mseg
	RM hepática	70 micromol/gr
Tratamientos recibidos	Infancia	Piridoxina 150 mg/24h x 6 meses Tiamina 50 mg/24h x 3 meses Glicina x 12 meses
	Actualidad	Transfusiones (73 CH/año)

C

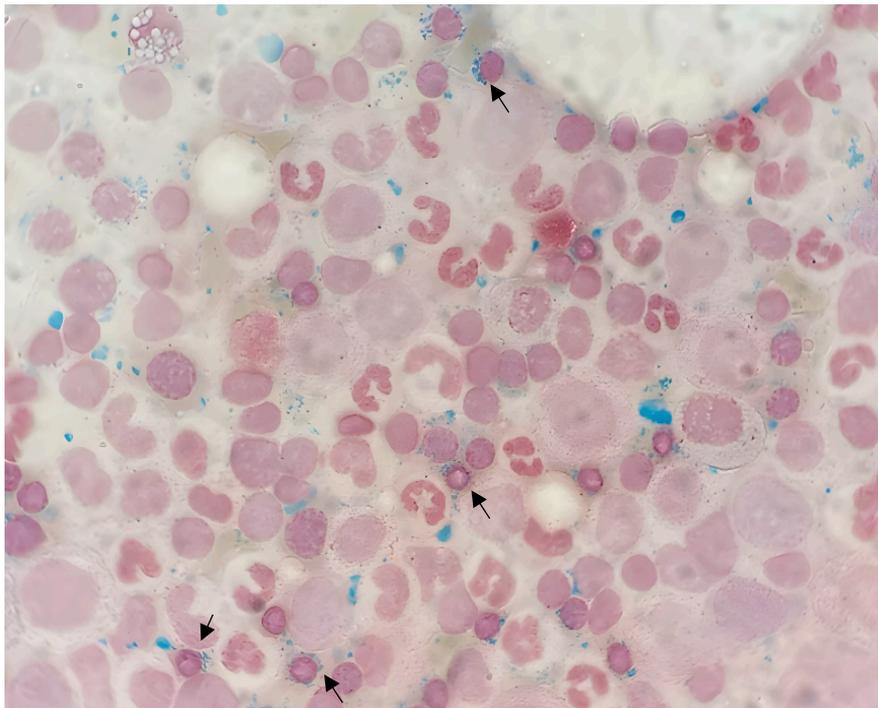
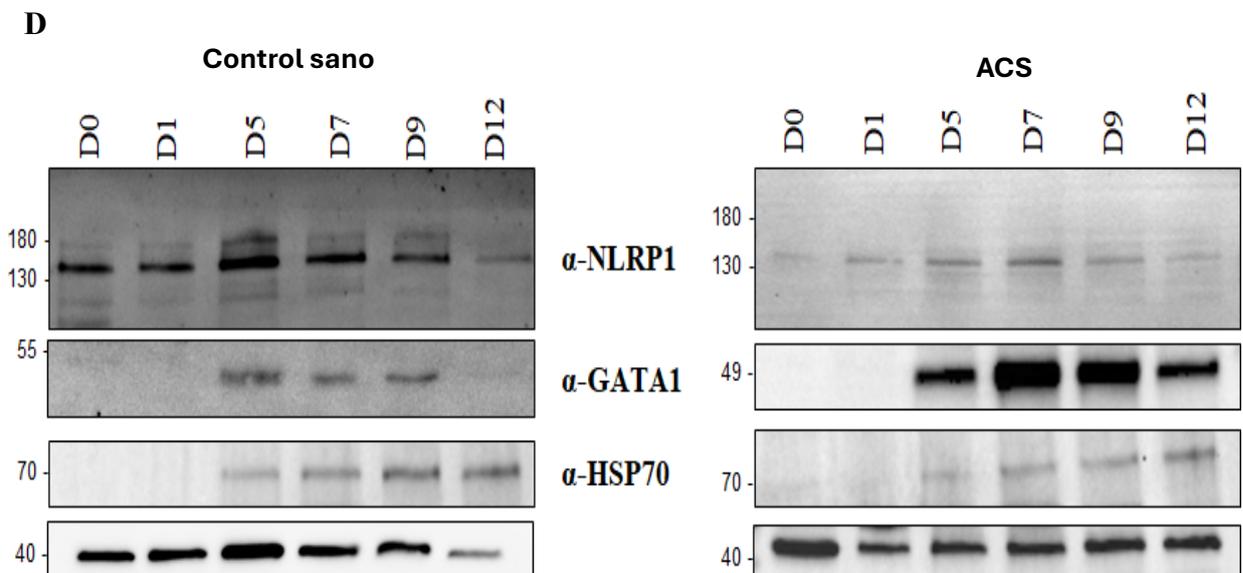
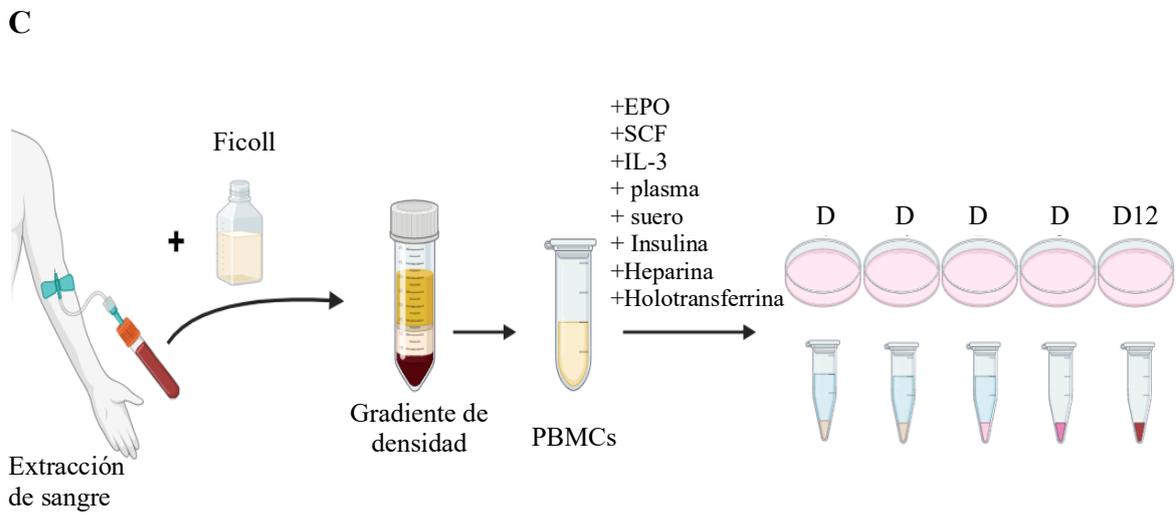
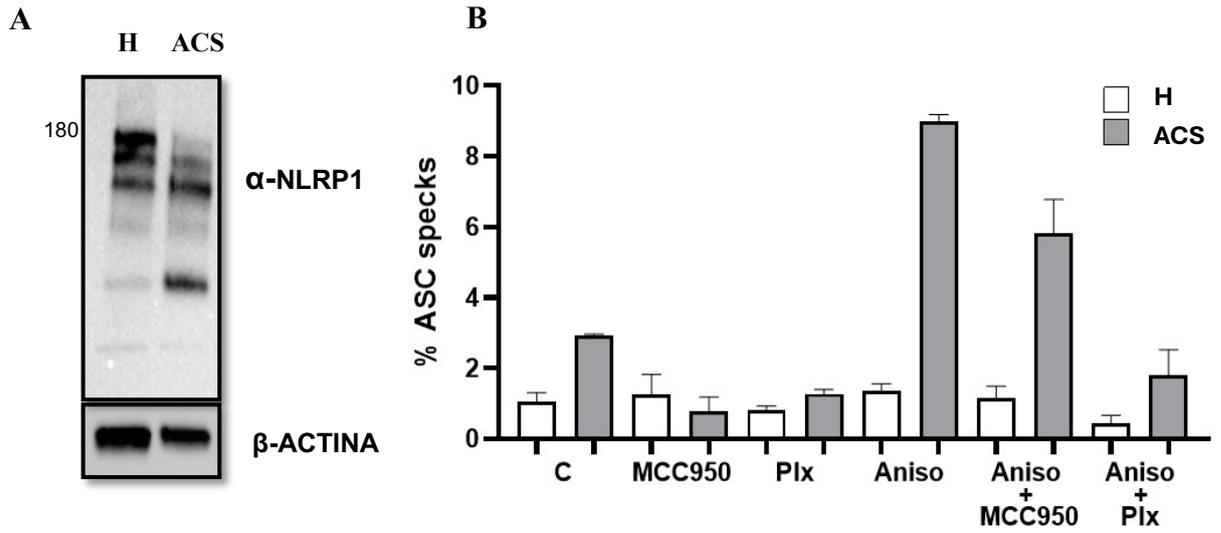


Figura 18. Caracterización genotípica y fenotípica de un paciente con ACS. A) Patrón de herencia. B) Clínica. C) Las flechas muestran sideroblastos en anillo en médula ósea (Tinción de Perls; objetivo 50X).

Considerando la implicación de NLRP1 en la eritropoyesis, comparamos los niveles de esta proteína en PBMCs del paciente con ACS con los niveles encontrados en un donante sano. Sorprendentemente, encontramos que el total de la proteína NLRP1 en este paciente parece estar procesada (**figura 19A**), apareciendo sólo la banda de bajo peso molecular cuando se analiza por western blot con un anticuerpo que reconoce la parte N-terminal de la proteína, en comparación con un donante sano.

Además, observamos en este paciente la activación de NLRP1 en monocitos CD14+ tras su estimulación con anisomicina, un activador de NLRP1 (155), no descrita hasta la fecha (**figura 19B**). Esta activación se observó mediante análisis FACS, y dicha activación se suprimió mediante el tratamiento con PLX-4720, un inhibidor bien descrito de la activación de NLRP1 por anisomicina pero que no afecta a la liberación de IL-1 β inducida por VbP (156), no alterándose mediante MCC950 que es un inhibidor específico de NLRP3 (157). Todos estos datos indican una posible activación del inflamasoma NLRP1 en este paciente. Para profundizar en esta hipótesis, realizamos una diferenciación eritroide en medio líquido a partir de PBMCs del paciente (**figura 19C**) donde confirmamos que el paciente tenía una banda NLRP1 única de menor peso molecular indicativa de un procesamiento completo de NLRP1 en comparación con un donante sano cuando se utilizaba el anticuerpo que reconoce la parte N-terminal de la proteína (**figura 19D**). Además, en donantes sanos, el patrón de GATA1 durante la diferenciación eritroide fue la descrita clásicamente en células pluripotentes: aparición de GATA1 a nivel de BFU-E y CFU-E, incremento progresivo hasta estadio de proeritroblasto y disminución gradual hacia el final de la maduración eritroide (9). Sin embargo, en el paciente con ACS los niveles de GATA1 aumentaron como era de esperar tras la diferenciación inicial, pero no disminuyeron, lo que indica un paro madurativo en la eritropoyesis con la consiguiente eritropoyesis ineficaz característica de esta enfermedad (**figura 19D**). Se estudiaron otros marcadores como la chaperona HSP70, conocida por regular los niveles de GATA1 (158), para excluir su contribución a nuestros hallazgos, observando una expresión similar durante la diferenciación eritrocitaria tanto en el paciente como en el donante sano.

A continuación, comprobamos los niveles de CASP1 durante la diferenciación eritroide en donantes sanos en comparación con el paciente con ACS, encontrando una activación de CASP1 (**figura 19E**), con una clara escisión de proCASP1.



E

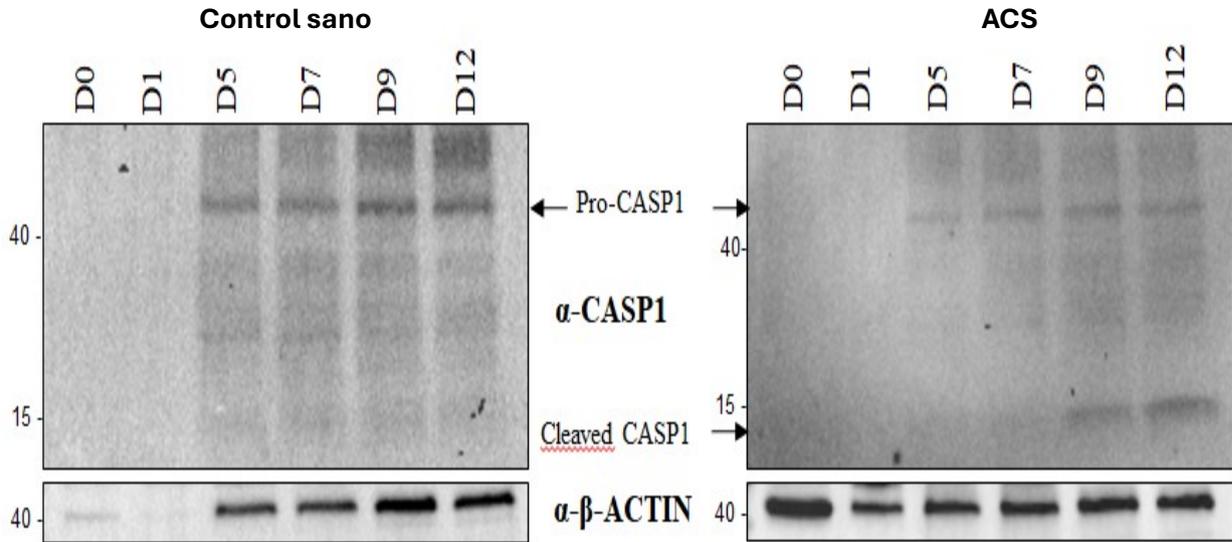
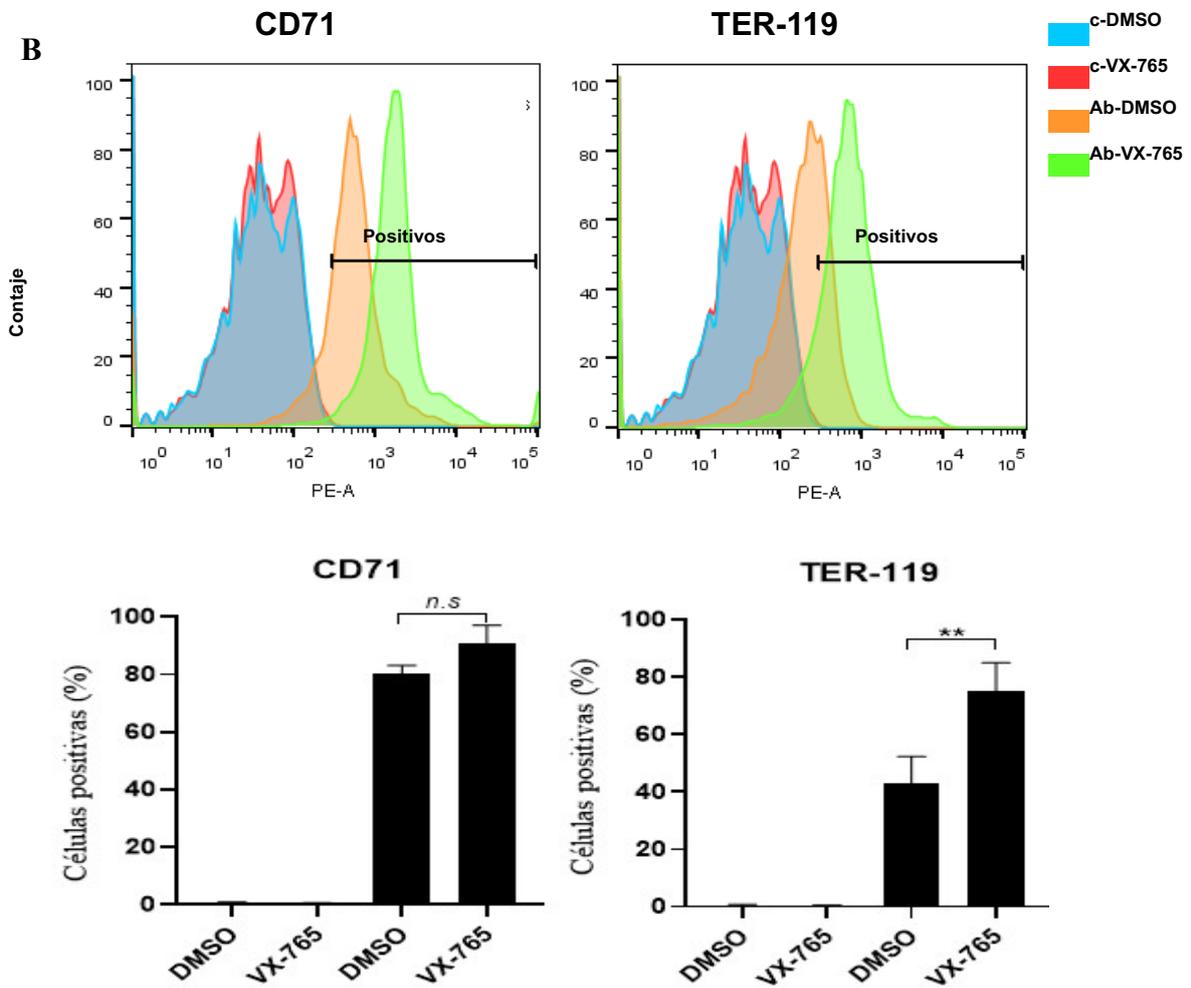
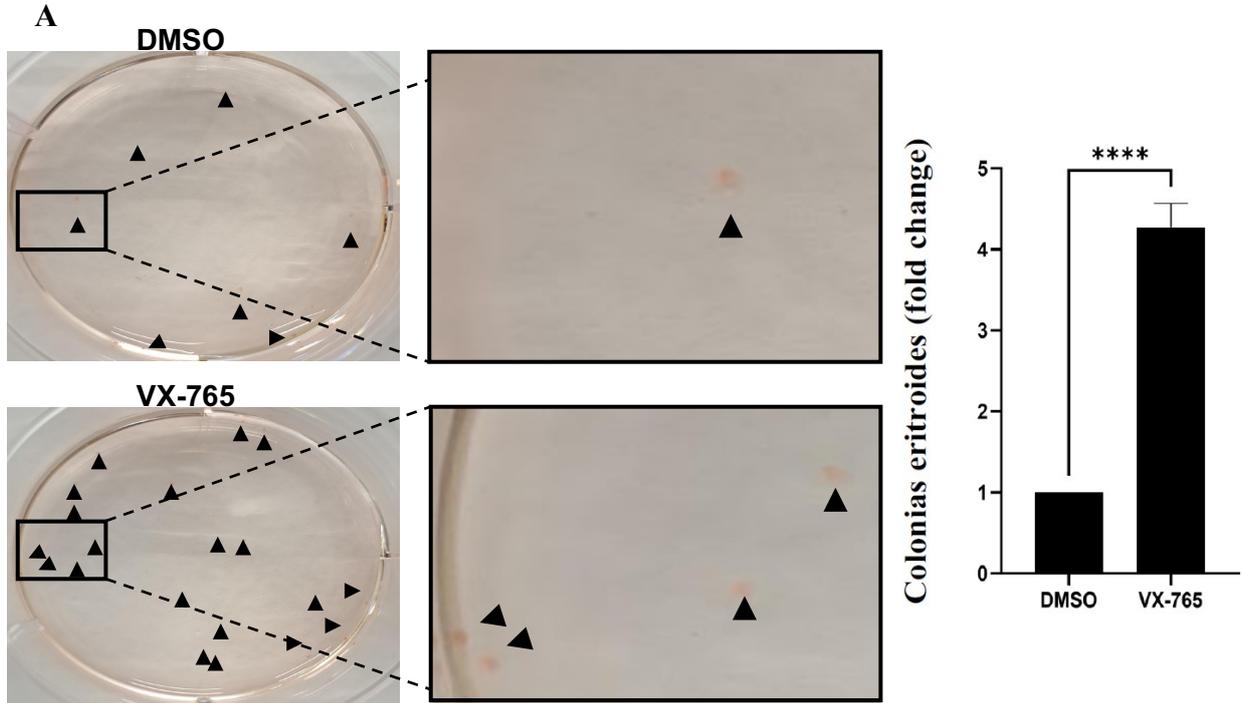


Figura 19. El inflammasoma NLRP1 en pacientes con ACS. A) Expresión de NLRP1 en PBMCs de controles sanos (H) y del paciente con ACS. B) Specks de ASC (%) en PBMCs de controles H y del paciente con ACS tras aplicar diferentes tratamientos. C) Representación esquemática del proceso de diferenciación eritroide en medio líquido. D-E. Inmunoblots de NLRP1, GATA1, HSP70, CASP1 y ACTINA en diferentes estadios de diferenciación eritroide de PBMCs de controles sanos (H) o con ACS.

2. La inhibición del inflammasoma aumenta la formación de eritrocitos en un paciente con anemia congénita sideroblástica

Para explorar la posible repercusión terapéutica de la inhibición del inflammasoma en esta enfermedad, a partir de PBMCs del paciente realizamos tres ensayos de diferenciación de colonias eritrocitarias en presencia y ausencia del inhibidor de CASP1 VX-765. Los resultados obtenidos indican un aumento significativo del número de colonias eritrocitarias tras la inhibición del inflammasoma (**figura 20A**). Los controles de estos experimentos se realizaron mediante marcadores FACS durante la diferenciación de los eritrocitos en cultivos líquidos, donde se observó un aumento de las moléculas de maduración eritrocitaria durante la inhibición del inflammasoma (**figura 20B**). Además, en el día 13 de diferenciación se observó una marcada acumulación de Hb en el precipitado de muestras *ex vivo* del paciente tratadas con el inhibidor del inflammasoma en comparación con las muestras no tratadas (**figura 20C**). Además, se observó una disminución de los niveles de GATA1 en las células del paciente mediante microscopía

confocal tras la inhibición del inflammasoma (**figura 20D**), lo que también indica una aceleración de la maduración eritrocitaria.



C

DMSO VX-765

Día 13 de
diferenciación

D

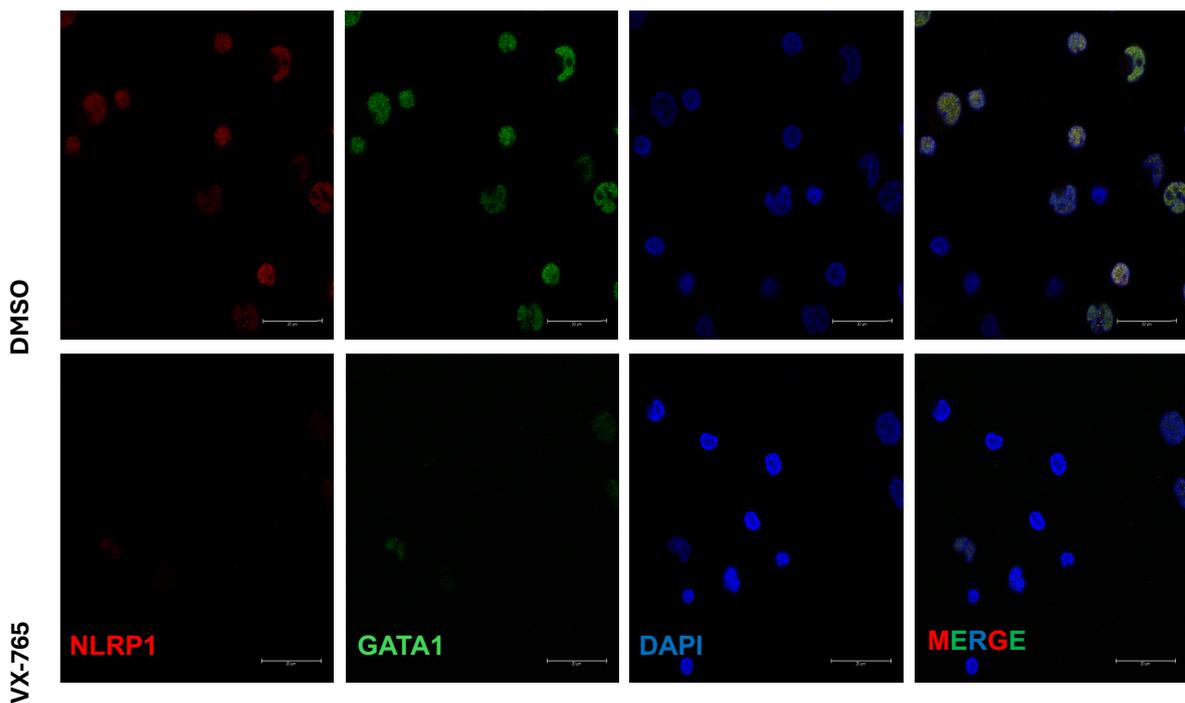


Figura 20. La inhibición de CASP1 en PBMCs de un paciente con ACS estimula la diferenciación eritroide. **A)** Recuento de colonias eritroides a partir de PBMCs de un paciente con ACS en presencia de DMSO o VX-765. **B)** Células CD71 y TER-119 positivas en el día 7 de diferenciación eritroide en ausencia o presencia del inhibidor de CASP1. **C)** Imagen representativa de PBMCs de ACS en el día 13 de diferenciación eritroide. **D)** Expresión de NLRP1 y GATA1 en PBMCs del paciente con ACS en el día 7 de diferenciación.

3. Una nueva variante de NLRP1 encontrada en un paciente con anemia congénita sideroblástica más activa que la variante silvestre

Para estudiar en profundidad el fenotipo NLRP1 y sus posibles implicaciones en la ACS, llevamos a cabo una NGS de células del paciente y encontramos cuatro variantes de NLRP1, tres de ellas presentes en la población normal y una, c.2815G>A p.(Val939Met), probablemente patogénica (**figura 21A**). Desarrollamos un ensayo de mutagénesis en el plásmido NLRP1 silvestre (WT) para sobreexpresar la variante del paciente y medir su capacidad para formar specks indicativos de la activación del inflamasoma. Para ello, utilizamos células HEK293 que expresaban ASC-GFP adquiridas en vivoGene y donadas por el Dr Meunier, tal y como se describió en la sección de materiales y métodos. Estas células, fueron transfectadas con la variante NLRP1 WT o con la identificada en el paciente con ACS (**figura 21B**). Los resultados obtenidos indicaron un aumento de la actividad de NLRP1 en la variante del paciente con respecto a la WT, demostrado por un aumento de la formación de specks con ASC (**figura 21C**).

Paralelamente, se estudió por NGS NLRP1 en los padres, describiéndose la variante c.2815G>A p.(Val939Met) en el padre, en el cual se amplió estudio analítico no objetivando anemia ni sobrecarga férrica. Por lo tanto, la variante de NLRP1 no parece tener por sí sola carácter patogénico pero podría tener una acción moduladora de la enfermedad en el paciente con ACS, tras demostrar *in vitro* un incremento de la actividad del inflamasoma NLRP1.

A

Transcripto	Exón	Alteración codón	Alteración proteína	Patogenicidad
NLRP1 NM_033004	7	c.2815G>A	p.(Val939Met)	Probablemente patogénica
NLRP1 NM_033004	3	c.464T>A	p.(Leu155His)	Probablemente benigna
NLRP1 NM_033004	13	c.3550A>G	p.(Met1184Val)	Probablemente benigna
NLRP1 NM_033004	11	c.3175G>A	p.(Val1059Met)	Probablemente benigna

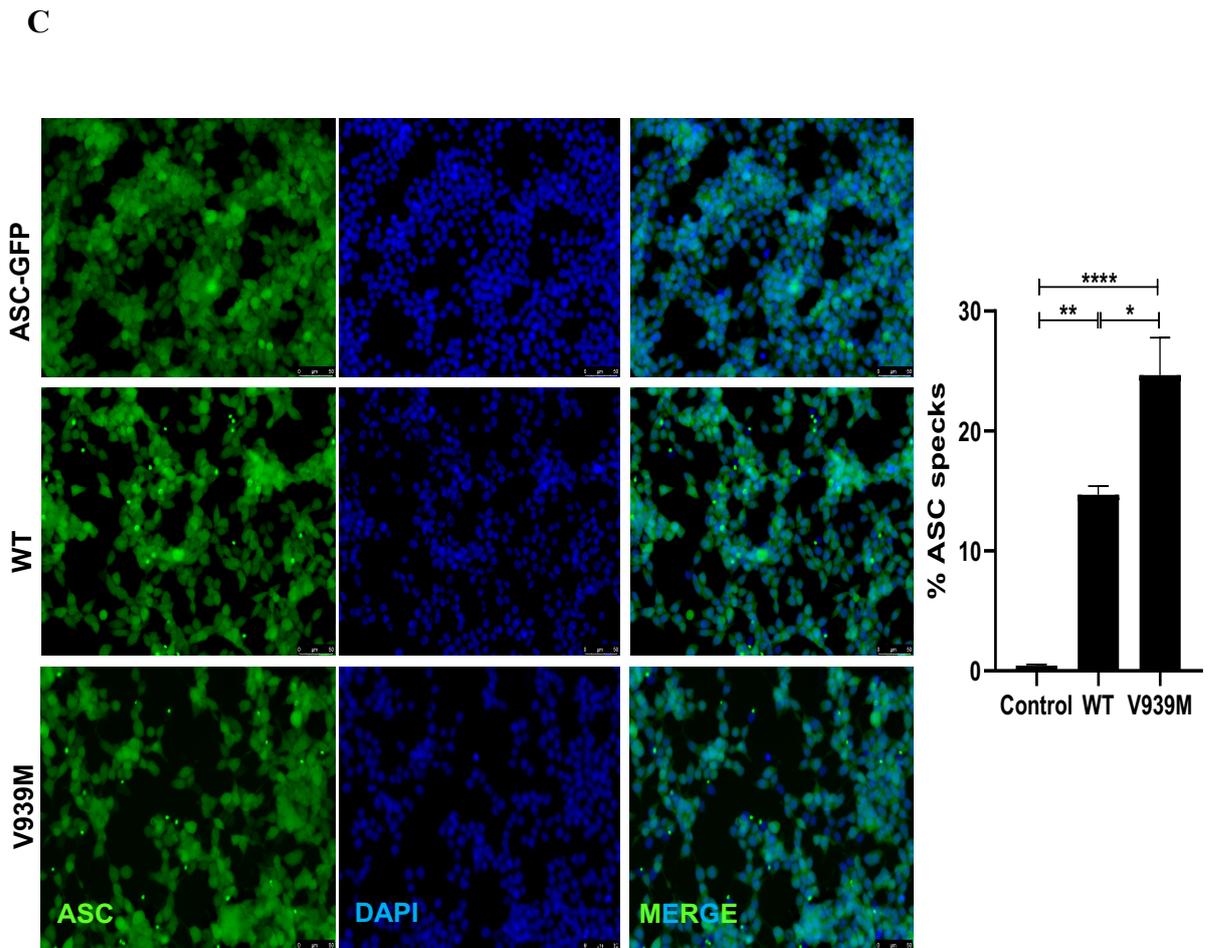
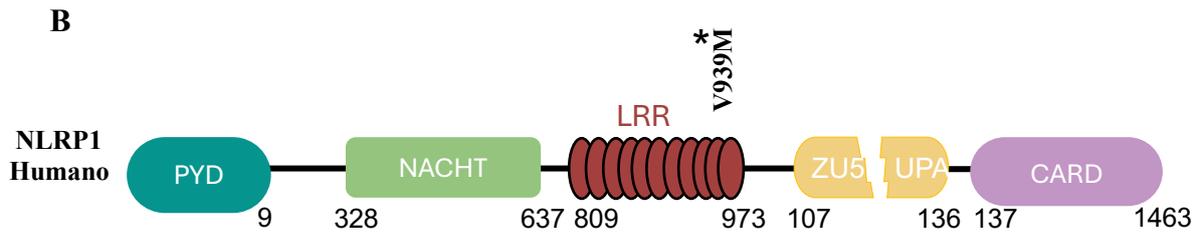
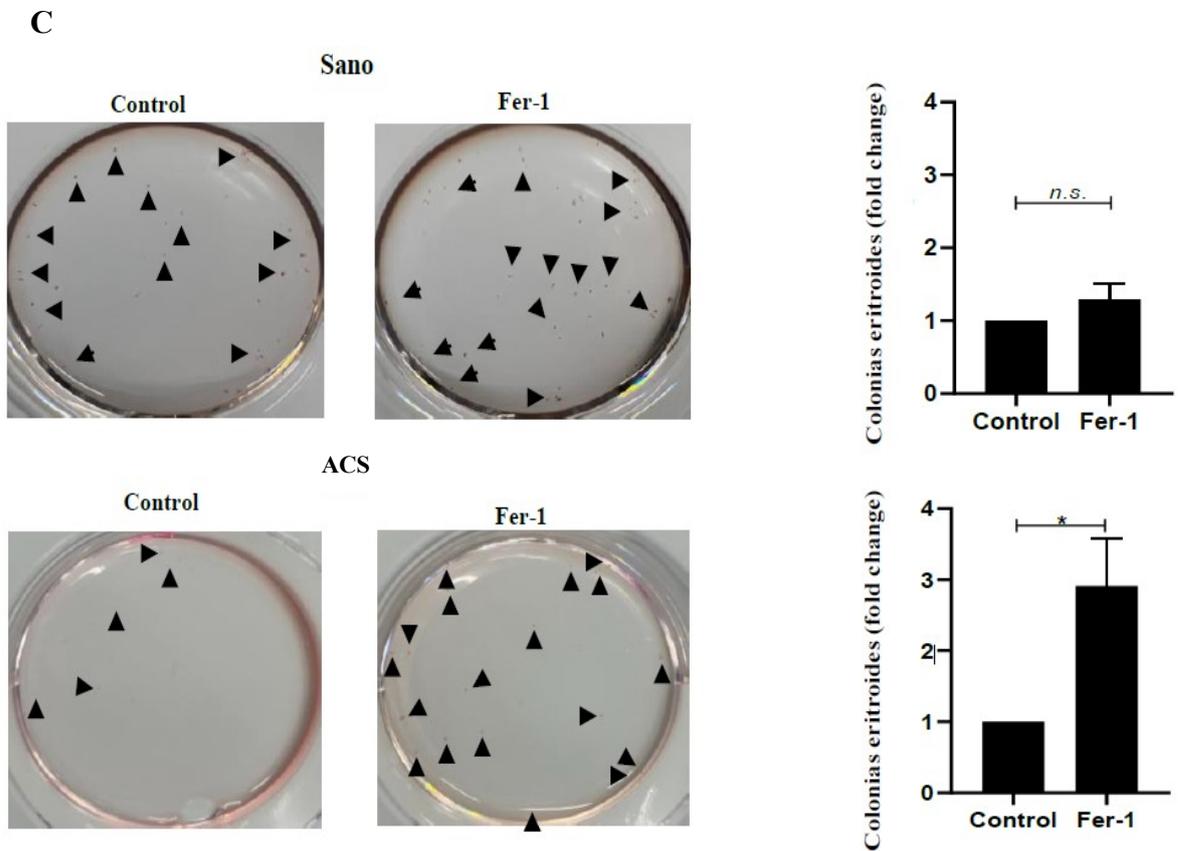
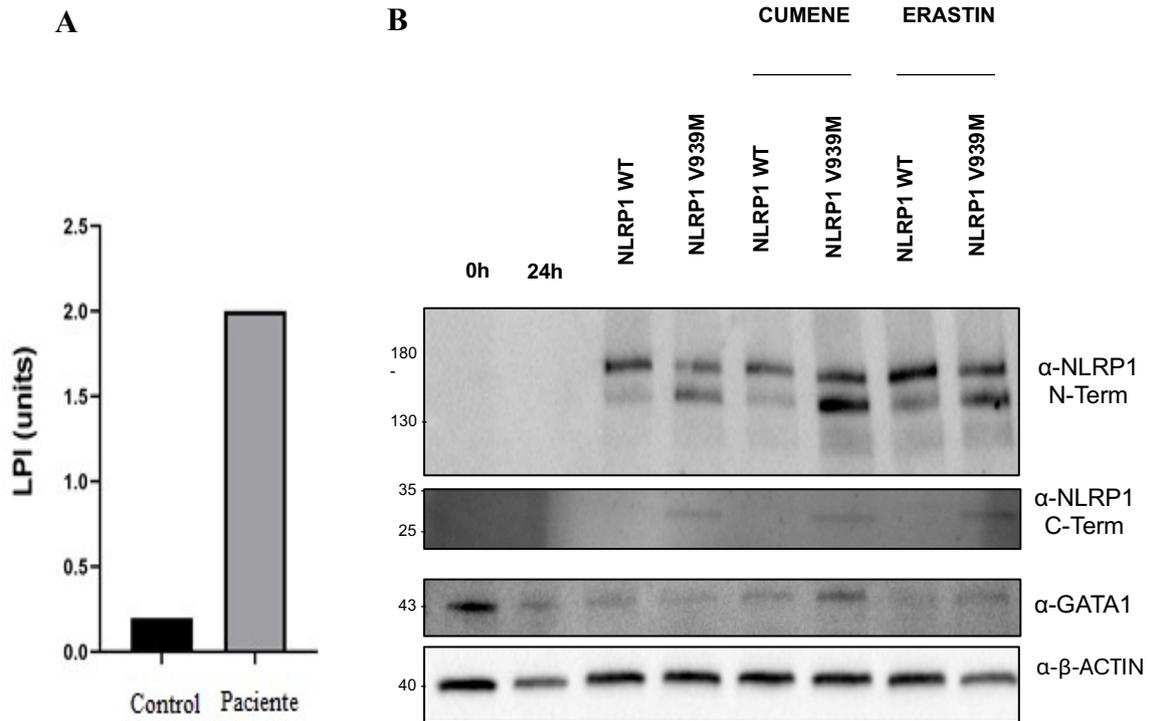


Figura 21. Variantes NLRP1 en paciente con ACS. A) Variantes de NLRP1 encontradas por NGS en el paciente con ACS. B) Esquema de la estructura del NLRP1 humano con la mutación V939M. C) Specks de ASC (%) relativos al número total de células HEK-293 con ASC-GFP transfectadas con la variante WT o V939M de NLRP1 después de 24h post-transfección.

4. La ferroptosis contribuye al procesamiento de NLRP1 y a la gravedad del fenotipo de la anemia sideroblástica

Teniendo en cuenta el fenotipo y las características clínicas del paciente, como la sobrecarga férrica, determinamos el hierro plasmático libre (LPI), que representa el componente de hierro no unido a la transferrina. Como se refleja en la **(figura 22A)**, los niveles en este paciente fueron 10 veces superiores a los del control sano. Por lo tanto, decidimos explorar el efecto de la ferroptosis sobre la actividad de NLRP1 y el procesamiento proteico. Para explorar esta hipótesis, utilizamos las células K562 Knockout de NLRP1 disponibles en el laboratorio para realizar la expresión de la variante NLRP1 WT o V939M presente en el paciente **(figura 22B)**. Encontramos un mayor procesamiento proteico de la variante NLRP1 V939M en comparación con la WT, como ocurría en las muestras de células primarias del paciente, y éste aumentó tras el tratamiento con cumene o erastina, ambos inductores de ferroptosis. Además, en el caso de la variante del paciente observamos con un anticuerpo C-term una banda de bajo peso molecular que aumentó ligeramente con el tratamiento con cumene o erastina. Por último, examinamos los niveles de GATA1, y observamos su acumulación en presencia de la variante del paciente con cumene o erastina indicativa de una alteración de la eritropoyesis. El mismo fenotipo que ya se observó en las muestras *ex vivo* del paciente **(figura 19D)**.

Teniendo en cuenta este efecto, planteamos la hipótesis de que tanto la activación del inflammasoma procesado como la ferroptosis podrían tener un efecto sobre la eritropoyesis. Para confirmar este efecto, utilizamos muestras *ex vivo* del paciente para diferenciar los PBMCs del paciente en eritrocitos en presencia de ferrostatina, un inhibidor de la ferroptosis. Los resultados indican que la inhibición de la ferroptosis tiene un efecto significativo sobre la producción de eritrocitos en células del paciente con ACS, pero no en las células de un donante sano **(figura 22C)**. Además, la inhibición conjunta de la ferroptosis y del inflammasoma, con dos inhibidores diferentes de CASP1, parece tener un efecto sinérgico sobre la producción de colonias eritroides en muestras del paciente con ACS **(figura 22D)**.



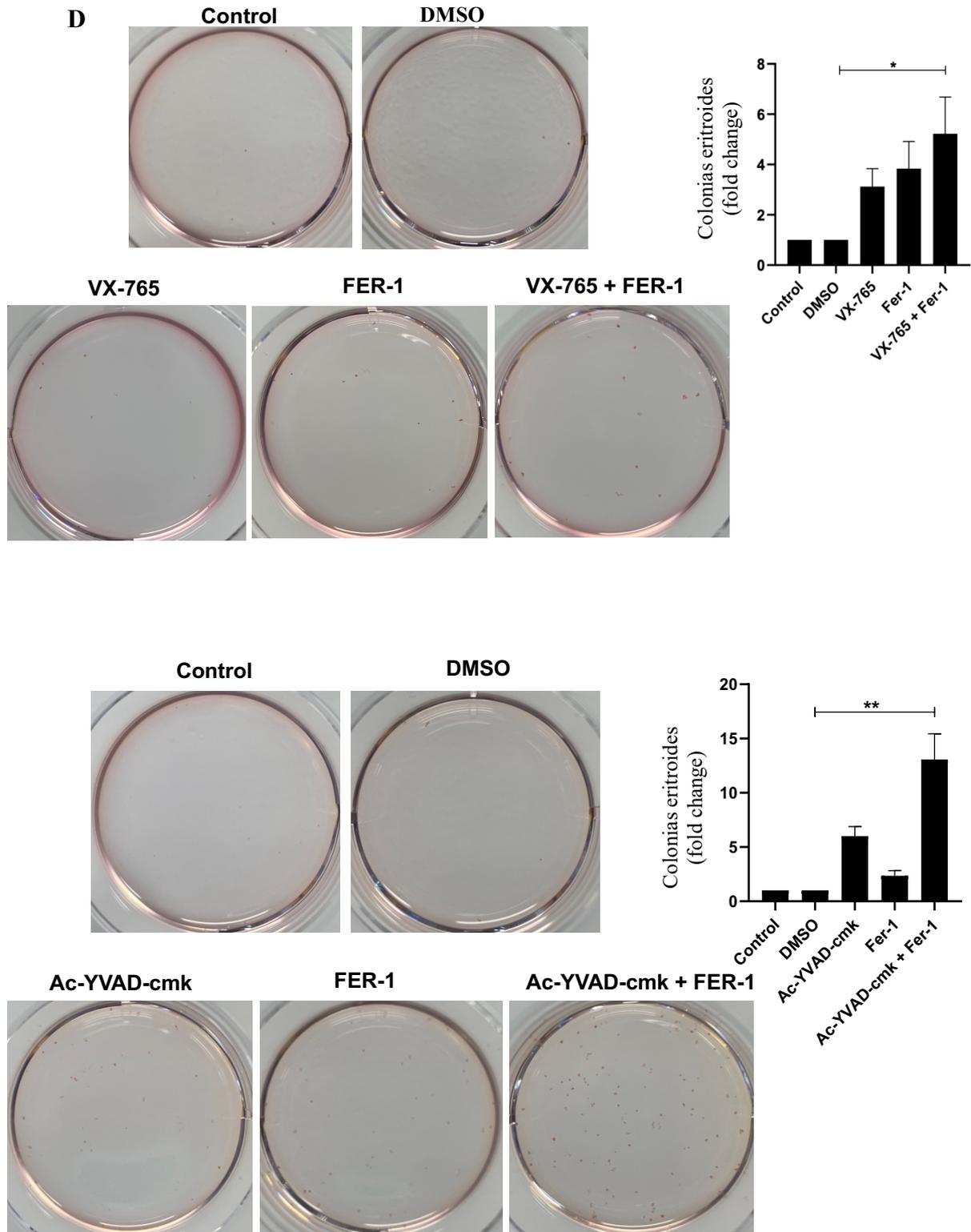


Figura 22. Efecto de la ferroptosis en la producción de eritrocitos. A) Hierro plasmático libre (LPI) en controles sanos y en el paciente con ACS. **B)** Inmunoblots de NLRP1, GATA1 y ACTINA de células K562 NLRP1 KO transfectadas con la variante WT o la variante V939M de NLRP1 y tratadas con cumene o erastina durante 24h en presencia de hemina. **C)** Recuento de colonias eritroides tras la diferenciación de PBMCs de sanos o de ACS en tratamiento con Fer-1. **D)** Recuento de colonias eritroides tras la diferenciación de PBMCs de ACS en tratamiento con inhibidores de CASP1 (Vx-765 o Ac-YVAD-cmk) y/o Fer-1.

DISCUSIÓN

Diferentes estudios han demostrado en modelos animales la importancia de NLRP1 en la regulación de células madre hematopoyéticas y células progenitoras (10,11,22).

Se han asociado determinadas variantes de NLRP1 con cuadros sistémicos (159–161), pero ninguna de ellas se ha relacionado con trastornos de la eritropoyesis. Aquí encontramos una nueva variante parcialmente responsable de la gravedad fenotípica en un paciente con anemia congénita sideroblástica. El NLRP1 humano necesita ser procesado para liberar el fragmento activo del dominio C-terminal (23,24). Se ha descrito que el procesamiento continuo de la proteína ocurre, aunque el fragmento pequeño generado se encuentre asociado con la proteína completa en una forma inactiva unida a la proteína DPP9 (24). Sin embargo, en células humanas K562 se ha demostrado que DPP9 no está unida a NLRP1 (11), por lo que otro mecanismo podría estar implicado en líneas celulares hematopoyéticas.

La ACS es un trastorno complejo con una importante variabilidad clínica y genética (161). Los tratamientos actuales se centran en el control de los síntomas y de las complicaciones, pero ningún tratamiento se dirige a la fisiopatología de la enfermedad (162). En este estudio, observamos que la ACS por mutación del gen *SLC25A38* se asocia a un procesamiento anómalo de NLRP1 durante la diferenciación eritroide de PBMCs de un paciente con ACS. Además, se observan *in vitro*, niveles elevados y mantenidos de GATA1 a lo largo de la diferenciación eritroide, junto con una acumulación reducida de la Hb. Lo que se traduce a nivel clínico en un incremento de la eritropoyesis ineficaz, que es lo que observamos en el paciente. Se han descrito en la literatura asociaciones entre eritropoyesis ineficaz y alteraciones en GATA1 (9). En la anemia de Blackfan Diamond se debe a un defecto en la expresión del ARNm (163), y en hemoglobinopatías como ECF y β -talasemia está causada por la proteólisis en el núcleo de GATA1 por Caspasa-3 debida a la acumulación en el citoplasma de HSP70 (57,84). En nuestro caso, no detectamos ninguna alteración en HSP70, pero observamos una clara acumulación de GATA1 durante la diferenciación eritroide que perjudica la diferenciación eritroide terminal. Esquema representativo en **figura 23**.

Como se comentó en la introducción, la ACS se caracteriza por la alteración del metabolismo del hierro a nivel mitocondrial, y la ferroptosis es una forma de muerte celular programada caracterizada por la peroxidación lipídica dependiente de hierro (164). Este tipo de muerte celular es distinta de otras formas como la apoptosis, la necrosis y la piroptosis, y está impulsada por la acumulación de ROS derivadas de reacciones mediadas por hierro (165,166). Sin embargo, la ferroptosis comparte con diferentes tipos de necrosis y piroptosis la participación de ninjurina-1 como ejecutor final de la lisis de membrana (167). Así, nuestro estudio proporciona una comprensión innovadora del papel del inflamasoma y la ferroptosis en la ACS por mutación en el gen *SLC25A38*. Se han descrito variantes de NLRP1 en los dominios PYD, NATCH y UPA relacionadas con diferentes enfermedades (21), pero solo se ha descrito una variante en el LRR p.L813P en homocigosis con ganancia de función (21) y una delección de esta misma región asociada a queratosis liquenoide crónica (168). Nuestra variante identificada en el dominio LRR, aunque en heterocigosis, parece tener un fenotipo similar al de p.L813P.

Finalmente, la identificación de una nueva variante NLRP1 y la demostración de que la inhibición de ambas vías, inflamasoma y ferroptosis, en muestras *ex vivo* de este paciente puede mejorar la anemia abre nuevas vías de investigación y opciones terapéuticas futuras. Estos nuevos hallazgos que relacionan la activación del inflamasoma NLRP1 con la ACS son cruciales para comprender la fisiopatología de la enfermedad y desarrollar terapias dirigidas.

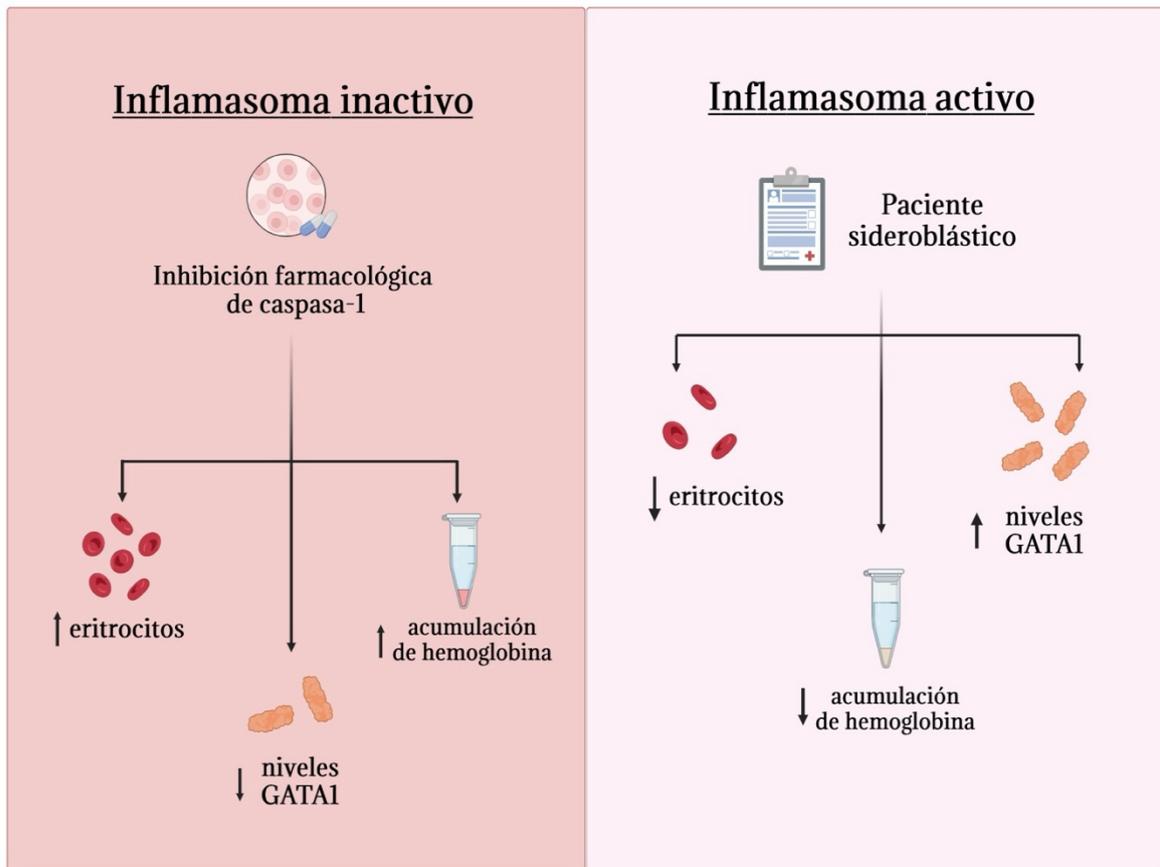


Figura 23. Esquema resumen en el que se expone la repercusión de la activación del inflammasoma en la anemia sideroblástica. La inhibición farmacológica de CASP1 favorece la eritropoyesis, lo que observamos por medio de la formación de colonias eritroides, la acumulación de hemoglobina y la disminución de los niveles de GATA1. En el caso del paciente con ACS, observamos el efecto contrario, una reducción del recuento de colonias eritroides y de los niveles de hemoglobina, junto con un aumento sostenido en el tiempo de los niveles de GATA1.

**CAPÍTULO 3: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO EN
SANGRE TOTAL DE PACIENTES CON ANEMIAS
CONGÉNITAS**

RESULTADOS

1. Perfil de expresión génica de diferentes anemias congénitas respecto a donantes sanos

Se realizó un análisis de expresión diferencial en sangre total de 15 pacientes en seguimiento en el servicio de eritropatología del HCUVA con diagnóstico de anemia congénita. De los 15 pacientes estudiados, 4 (27%) fueron diagnosticados de TDT, 6 (40%) de NTDT, 4 (27%) de ECF y 1 (6%) de ACS. La paciente incluida con el déficit de piruvato kinasa (PKD) también tenía β -talasemia heterocigota, por lo que, para facilitar el análisis, se incluyó en los pacientes con TDT. Las características clínicas de los pacientes se recogen en la **tabla 7 (A-D)**.

A

Paciente	Genotipo	Fenotipo	Talasemia
T1	<i>HBB</i> : c.17_18del p.(Pro6Argfs*17) / <i>HBB</i> : c.20del p.(Glu7Glyfs*13)	β^0 / β^0	TDT
T2	<i>HBB</i> : c.93-21G>A en homocigosis	β^+ / β^+	TDT
T3	<i>HBB</i> : c.27dupG heterocigota + <i>PKLR</i> : c.1010G>A p.(Arg337Gln) / <i>PKLR</i> : c.1456C>T p.(Arg486Trp)	β^0 / PK déficit	TDT
T4	<i>HBB</i> : c.315+1G>A / <i>HBB</i> : c.93-21G>A	β^0 / β^+	TDT
T5	<i>HBB</i> : c.251del p.(Gly84Alafs*6) / Ganancia bialélica de dos copias de los genes $\alpha\alpha$ anti 3.7 / $\alpha\alpha$ anti 3.7 de <i>HBA</i>	Triplicación bialélica $\alpha\alpha^{3.7} / \beta^0$	NTDT
T6	Delección patogénica homocigota que afecta a los genes <i>HBB</i> y <i>HBD</i> de forma completa	$\delta\beta$ -homocigota	NTDT
T7	<i>HBB</i> : c.92+6T>C en homocigosis	β^+ / β^+	NTDT
T8	Delección patogénica homocigota que afecta a los genes <i>HBB</i> y <i>HBD</i> de forma completa	$\delta\beta$ -homocigota	NTDT
T9	<i>HBB</i> : c.20del p.(Glu7Glyfs*13) / <i>HBB</i> : c.92+6T>C	β^0 / β^+	NTDT
T10	<i>HBA</i> : c.377T>C p.(Leu126Pro), conocida como HbQuong Sze / <i>HBA</i> --SEA	$\alpha^0\alpha^0 / \alpha^0\alpha$ (HbH)	NTDT

B

Características clínicas	TDT	NTDT
Tamaño de la muestra	n=4	n=6
Fenotipo	$\beta^0/\beta^0=1$ $\beta^0/\beta^+=1$ $\beta^+/\beta^+=1$ Pk/ $\beta^0=1$	$\beta^+/\beta^0=1$ $\beta^+/\beta^+=1$ HH=1 $\beta^0/\alpha\alpha\alpha\text{anti}^{3,7}=1$ $\beta\delta/\beta\delta=2$
Sexo (H/M)	M=3 H=1	M=3 H=3
Edad	23,5 (20-32)	41,8 (21-56)
Índice de masa corporal (IMC)	21,6 (18,5-24,2)	24,58 (17,9-29,4)
Enfermedad concomitante (Sí/No)	No=4	Fa paroxística =1 Hipotiroidismo, IS=1
Osteopenia/Osteoporosis (OP/OT)	OP=1 OT=2	OP=4
Bilirrubina (mg/dL)	2,85 (1,1-5,3)	2,2 (1-3,67)
LDH (UI/L)	369,3 (128-999)	354,7 (220-783)
EPO (mU/ml)	179,8 (35-375)	68 (28-100)
RST(mg/L)	6,7 (3,3-9)	6,5 (0,7-13,1)
Hemoglobina (g/dL)	8,2 (7-8,8)	10,4 (8,6-11,6)
Reticulocitos /L	38025 (17400-58300)	185300 (88700-340300)
Ferritina (ng/ml)	1151 (713-1590)	587 (267-1540)
ÍST (%)	94,5 (88,3-100)	56,3 (32,7-87,3)
Sobrecarga férrica (Sí/No)	Sí=3 No=3	No=6
Tratamiento quelante (Sí/No)	Sí=4	Sí=4 No=2
Transfusiones (CH/año)	43,5 (41-47)	---
Aclaramiento de creatinina (CG)	138,2 (115,9-167,8)	123 (89,6-148,8)
Función tubular	Microhematuria=1 Proteinuria=1	Microhematuria =2

C

Características clínicas	Enfermedad de Células Falciformes			
	S1	S2	S3	S4
Genotipo	S/ β^+	SS	SC	SS
Sexo (H/M)	M	M	H	H
Edad	31	20	42	22
Enfermedad concomitante (Sí/No)	No	No	No	No
Crisis Vasooclusivas (CVO)	+ /++++	+++ /++++	No	+++ /++++
Hemoglobina Fetal (%)	15	9,5	0,8	30
Hemoglobina (g/dL)	12,1	7,4	11,6	12,4
Reticulocitos/L	100600 (2,24%)	344300 (15%)	168200 (3,9%)	233500 (7,12%)
Ferritina (ng/ml)	147	328	975	342
IST (%)	30,5 %	23,9 %	21,8 %	37,7 %
LDH (UI/L)	184	440	368	335

D

Características clínicas		Parámetros
Gentipo		<i>SLC25A38</i> : c.(683G>T) en homocigosis
Enfermedades concomitantes		Nefrocalcinosis bilateral grado II
Estado óseo	Metabolismo óseo	Vitamina D 17,6 ug/L, PTH 15,9 pg/ml, calcio 8,54 mg/dL, fósforo 3,6 mg/dL
	Densitometría	Z-score -0,7
Parámetros analíticos		Hb 7-8 g/dL, VCM 84,8 fL, reticulocitos $4,6 \times 10^3/uL$ (0,19%)
EPO		859 U/L
Sobrecarga férrica	Parámetros ferrocinéticos	Hierro 278 ug/dL, ferritina 502 ng/mL, transferrina 172 mg/dL, IST 100%, hierro, LPI 2 U
	Hepcidina	1,10 ng/mL
	Resonancia cardíaca	T2* 14 mseg
	Resonancia hepática	70 micromol/gr
Tratamientos recibidos	Infancia	Piridoxina 150 mg/24h x 6 meses Tiamina 50 mg/24h x 3 meses Glicina x 12 meses
	Actualidad	Transfusiones (73 CH/año)

Tabla 7. A) Correlación genotipo-fenotipo de los pacientes talasémicos. **B-D)** Cuadro resumen de las características clínicas de los pacientes talasémicos, de los pacientes con ECF y del paciente con ACS. IST: índice de saturación de transferrina, RST: receptor soluble de transferrina, LDH: lactato deshidrogenasa, VCM: volumen corpuscular medio, IST: índice de saturación de transferrina, LPI: hierro plasmático libre.

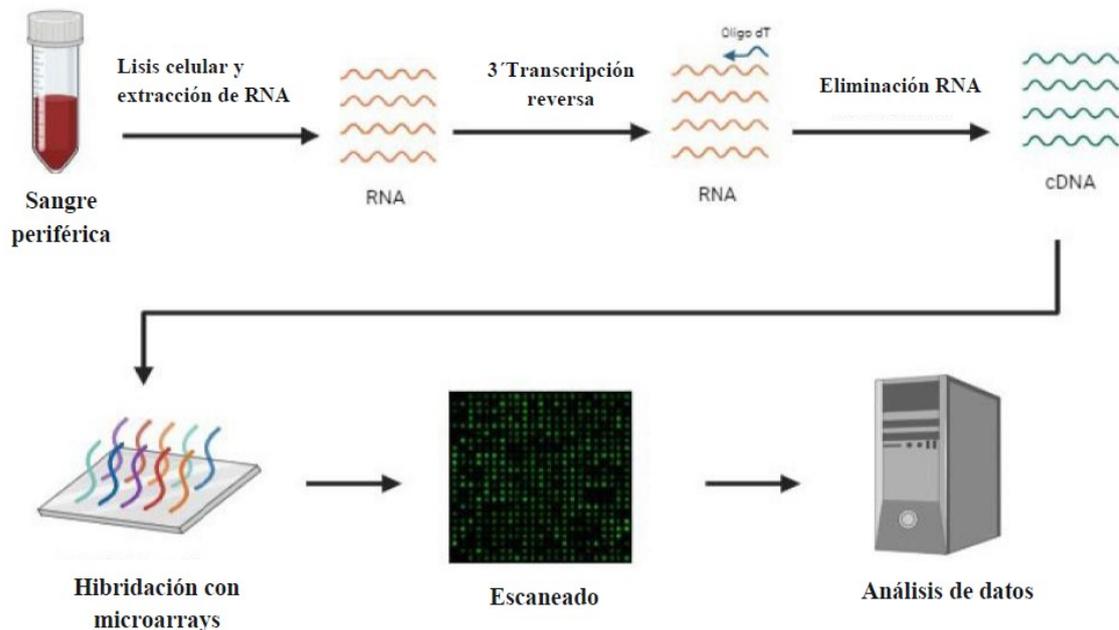
Rangos de normalidad: Bilirrubina 0.05-1.2 mg/dL, LDH 135-214 UI/L, EPO 5-30 mU/ml, hemoglobina 13.5-17.5 g/dL (hombre) 12-16 g/dL (mujer), VCM 80-100fL, reticulocitos 35000-75000/L, hierro 37-145 ug/dL, ferritina 30-400 ng/ml, transferrina 200-360 mg/dL, IST 24-40%, RST 0.8-1.8 mg/L, LPI-negativo:<0.2 U, hepcidina 16.45 ng/mL, Vitamina D 20 ug/L, PTH 10-55 pg/ml, Calcio 8.6-10 mg/dL, fósforo 2.5-4.5 mg/dL

La técnica de secuenciación utilizada en este estudio se denomina QuantSeq, que emplea un protocolo sencillo y rápido para generar bibliotecas NGS de secuencias cercanas al extremo 3' de ARN poliadenilados. La ventaja de esta técnica es que sólo produce un fragmento por transcripción, haciendo que el número de lecturas mapeadas a un gen específico sea proporcional a su expresión (**figura 24A**). Utilizando el software DESeq2, se realizó un análisis de expresión diferencial entre los distintos grupos a estudio y un grupo control formado por 4 individuos sanos (2 varones y 2 mujeres) con una edad media de 40 años (29-53).

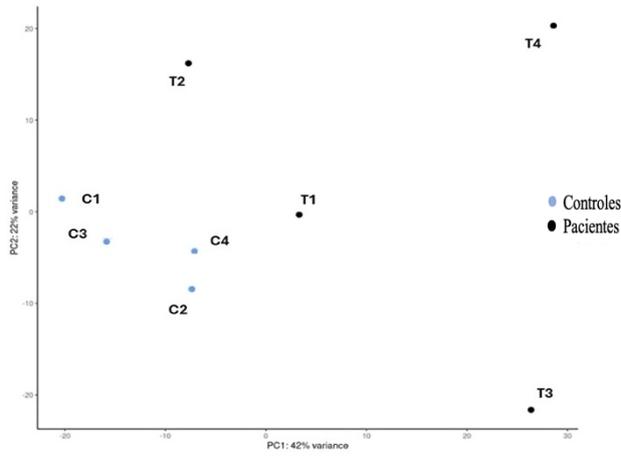
La dispersión de las muestras indica que los individuos control son muy similares entre sí, mientras que las muestras de los pacientes con TDT, NTDT y ECF muestran un mayor grado de dispersión. En el caso de la muestra del paciente con ACS, a pesar de ser sólo uno, su dispersión muestra una diferencia significativa en comparación con los 4 controles sanos (**figura 24B-E**).

El análisis del transcriptoma identificó 49.234 genes y comparó su expresión entre los grupos. En consecuencia, se encontraron 508 genes sobre-expresados y 252 genes infra-expresados en los pacientes con TDT en comparación con los controles (**figura 24F**), 1674 genes sobre-expresados y 361 genes infra-expresados en los pacientes con NTDT respecto al grupo control (**figura 24G**), 779 genes sobre-expresados y 335 genes infra-expresados en los pacientes con ECF en comparación con el grupo control (**figura 24H**), y 954 genes sobre-expresados y 6210 genes infra-expresados en el paciente con ACS respecto a los controles sanos (**figura 24I**). Para estudiar los patrones de expresión en las muestras de pacientes en comparación con los controles sanos, se estableció un umbral restrictivo, considerando únicamente los genes con un valor $p < 0,05$ y $\text{Log}_2\text{FC} < -2$ o > 2 . En consecuencia, puede observarse que los pacientes con TDT, NTDT y ECF presentan un mayor número de genes sobre-expresados en comparación con los controles sanos (**figura 24F-H**), mientras que, en el paciente con ACS, existe infra-expresión de la mayoría de los genes en relación con los controles (**figura 24I**).

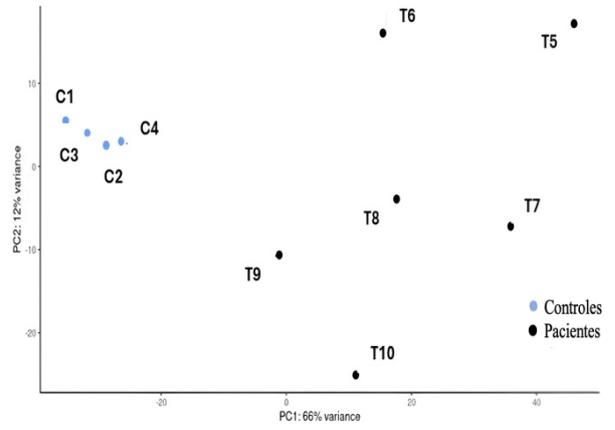
A



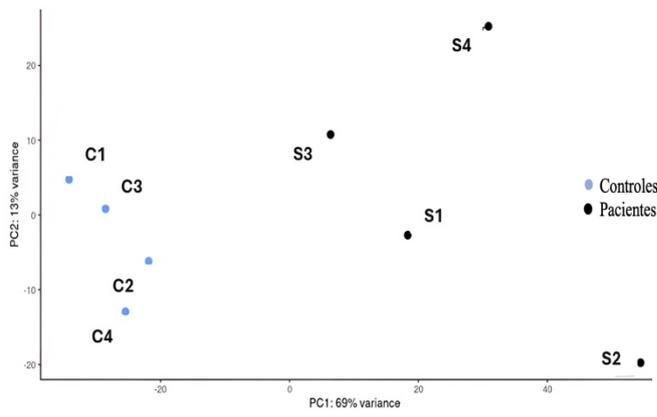
B



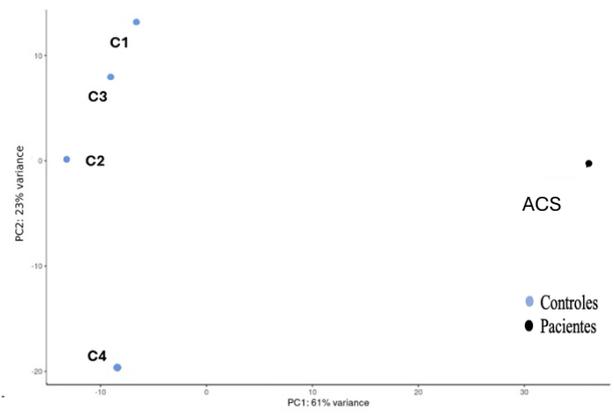
C



D



E



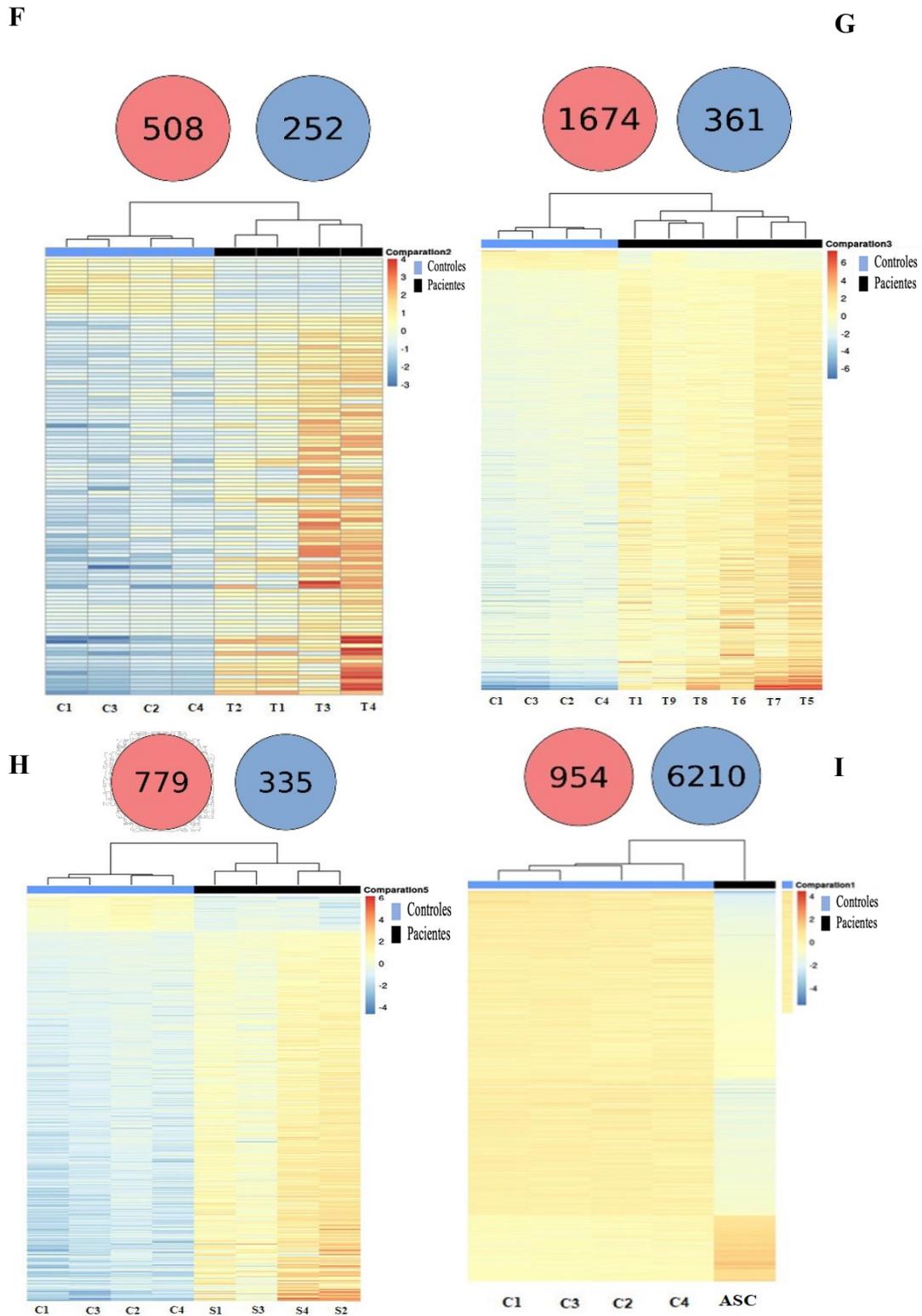
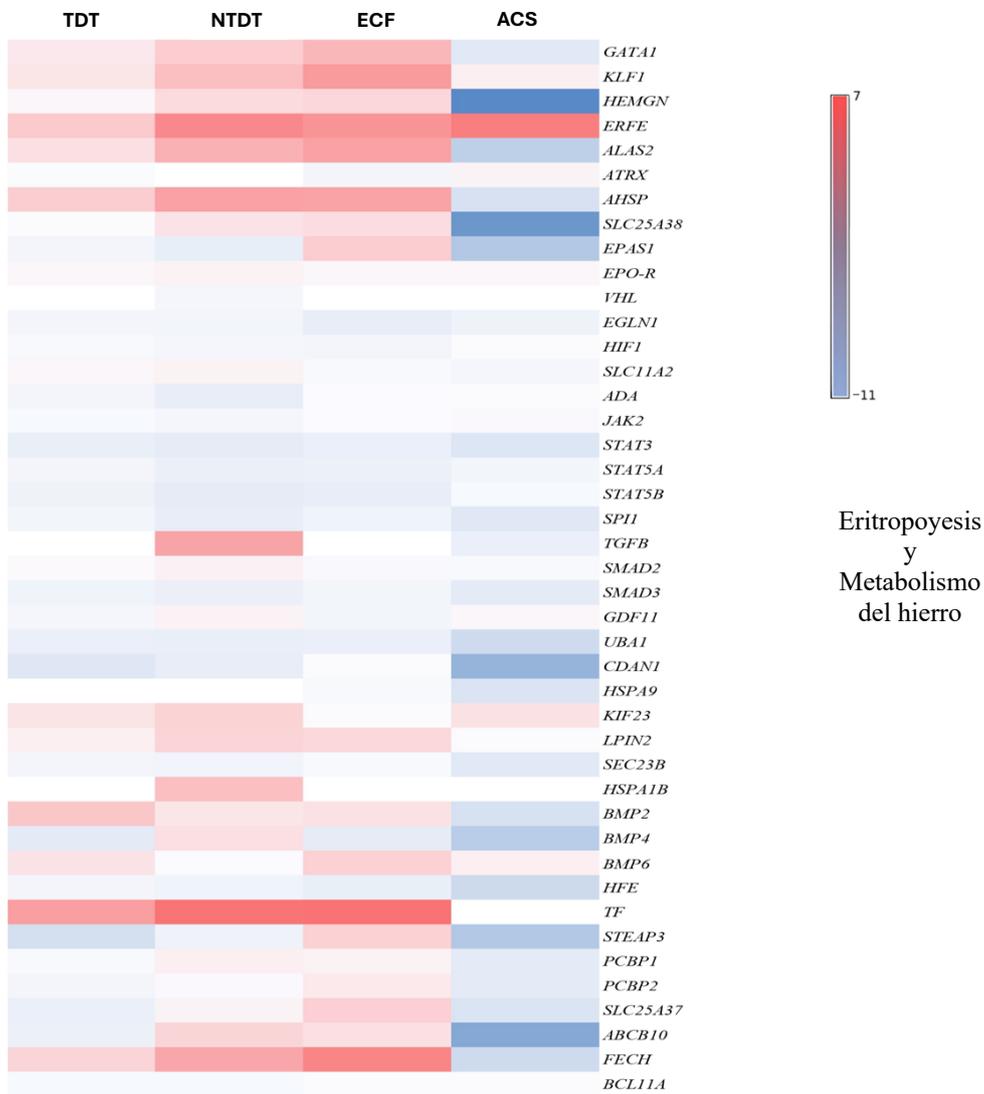


Figura 24. A) Esquema del procedimiento de secuenciación del ARNm 3' de Quant. B-E) PCA que muestran las diferencias entre el grupo control y los pacientes con: B) TDT, C) NTDT, D) ECF y E) ACS. F-I) Mapa de calor y gráfico circular que muestra los genes infra-expresados (azul) y sobre-expresados (rojo) en los controles y en los pacientes con: F) TDT, G) NTDT), H) ECF e I) ACS. El mapa de calor se limita a los datos significativos con $\text{Log}_2\text{FC} < -2$ o > 2 y $p < 0,05$.

2. El paciente con anemia congénita sideroblástica muestra un patrón de expresión distinto en genes relacionados con la eritropoyesis y el metabolismo del hierro

Para comparar los patrones de expresión génica entre los diferentes tipos de anemias congénitas, se realizó un análisis comparativo agrupando los genes en varias rutas metabólicas implicadas en la homeostasis y función eritrocitaria. Los resultados indican que la ACS presenta un patrón de expresión distinto en las vías de la eritropoyesis y el metabolismo del hierro, la glucólisis, el metabolismo oxidativo y proteínas de membrana eritrocitaria, en comparación con las demás anemias congénitas estudiadas (figura 25).



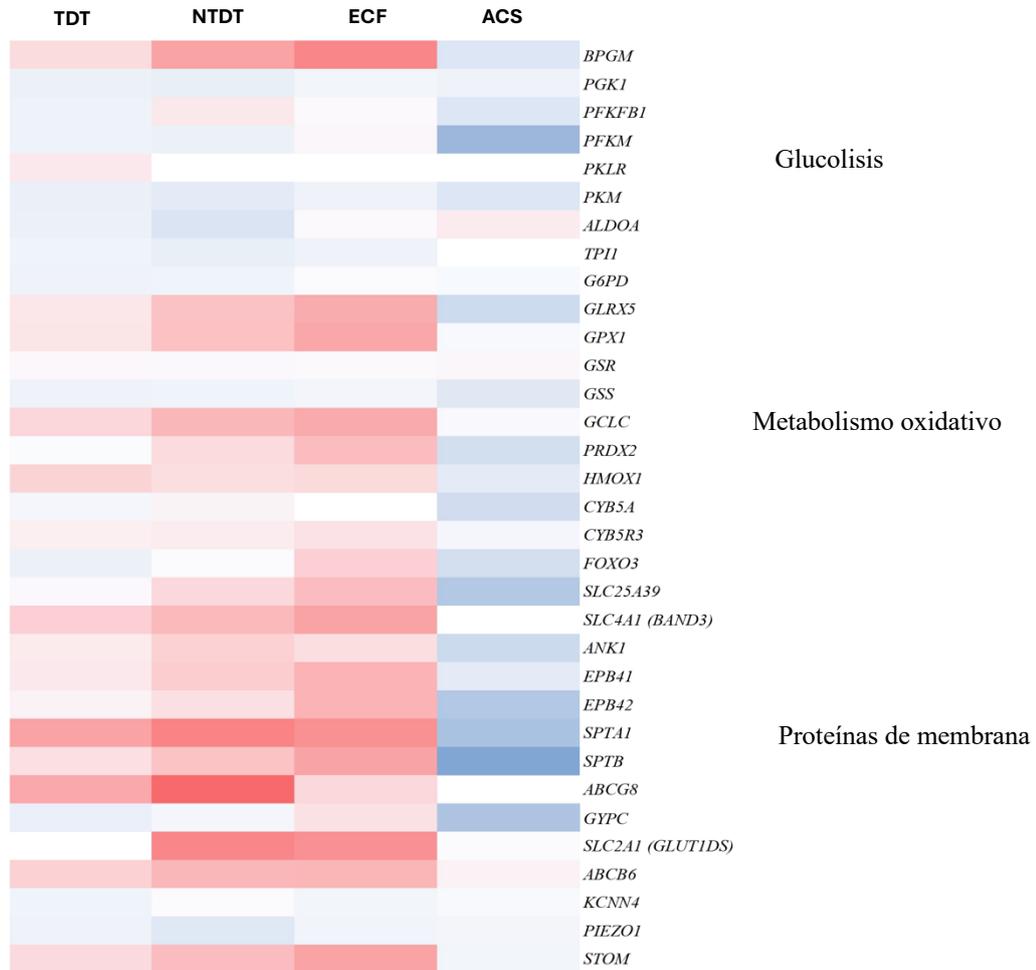


Figura 25. El paciente ACS presenta un patrón de expresión génica diferente al del resto de anemias congénitas. Mapa de calor que muestra los genes que están significativamente infra-expresados (azul) y sobre-expresados (rojo) en los diferentes grupos de pacientes, marcando la intensidad del color el nivel de expresión de cada gen. Los grupos estudiados se correlacionan con los descritos en la figura 24 y las vías se han seleccionado teniendo en cuenta su importancia en el proceso de maduración eritrocitaria, incluyendo así, la eritropoyesis, el metabolismo del hierro, la glucólisis, el metabolismo oxidativo y los genes que codifican proteínas de la membrana eritrocitaria.

En particular, se observaron diferencias en el patrón de expresión en el gen *GATA1*, el principal factor de transcripción eritroide implicado en la diferenciación eritroide temprana a nivel de BFU-E y CFU-E (9). En los pacientes con TDT, NTDT y ECF, los niveles de *GATA1* estaban más elevados que en los controles, mientras que, en el paciente con ACS, la expresión del gen estaba disminuida (**figura 26**). Se observó un

patrón similar para *HEMGN* (Hemogen), un regulador transcripcional implicado en la diferenciación y proliferación eritroide a nivel medular, cuya función está relacionada con la translocación de GATA1 al núcleo (169). En consonancia, el gen *ALAS2*, crucial para la síntesis del grupo hemo y regulado transcripcionalmente por *GATA1* (122), mostró un patrón de expresión similar, estando incrementado en los pacientes con TDT, NTDT y ECF y disminuido en el paciente con ACS (**figura 26**). El gen *SLC25A38*, que codifica para un transportador mitocondrial de glicina en progenitores eritroides, es necesario para la síntesis de grupo hemo como sustrato de la enzima ALAS. Durante la diferenciación eritroide, las células progenitoras necesitan sintetizar una gran cantidad de hemo para la producción de Hb, por lo que la expresión adecuada de *SLC25A38* es fundamental (122). Como era de esperar, este gen estaba infra-expresado sólo en el paciente con ACS debido a que la enfermedad está causada por una mutación hereditaria en este gen (**figura 26**).

Además, el gen *SLC25A37* (mitoferrina-1), esencial en la importación de hierro mitocondrial en precursores eritroides desempeñando un papel crucial en la síntesis del grupo hemo, presentaba también una disminución de la expresión en el paciente con ACS. La mitoferrina-1 forma un complejo en la membrana mitocondrial interna con el transportador mitocondrial ABCB10 y con la enzima FECH, permitiendo la importación e incorporación del hierro al anillo de protoporfirina IX para la síntesis del grupo hemo. Se ha descrito durante la diferenciación eritroide, que la expresión de estas proteínas está altamente inducida por el factor de transcripción GATA1 (122). Una vez más, nuestro estudio demostró una infra-expresión del transportador mitocondrial *ABCB10* y del gen *FECH*, en posible relación con los bajos niveles de *GATA1* mostrados en el paciente con ACS (**figura 26**).

Otro gen analizado fue *ERFE*. En situaciones de eritropoyesis ineficaz, el acumulo a nivel medular de precursores eritroides favorece la producción de ERFE, que actúa suprimiendo la producción de hepcidina y aumentando secundariamente la absorción intestinal de hierro por medio de la ferroportina (83). Como era de esperar, todos los pacientes de nuestro estudio presentaron un aumento significativo de la expresión del gen

ERFE, probablemente en relación con los diferentes grados de eritropoyesis ineficaz implicado en la etiopatogenia de las distintas enfermedades. Consecuencia también de esta eritropoyesis ineficaz, encontramos en todos los pacientes a estudio expresión incrementada del gen *KLF1* (factor de transcripción eritroide Krüppel-like), imprescindible en la diferenciación eritroide por su efecto antagónico sobre la megacariopoyesis (**figura 26**).

En pacientes talasémicos y con ECF se observó un aumento significativo en la expresión de los genes implicados en la diferenciación y proliferación eritroide (*GATA1*, *KLF1* y *HEMGN*) y en la formación del grupo hemo (*ALAS2*, *SLC25A38* y *FECH*). Además, se observó una correlación entre la expresión de *GATA1*, *SLC25A37* y *ABCB10* en el grupo con independencia transfusional (**figura 26**). Estos resultados podrían explicarse por el aumento de la proliferación eritroide en el contexto de la eritropoyesis ineficaz que se produce en estos pacientes. Sin embargo, en el paciente con ACS la expresión vuelve a estar disminuida. Esto podría explicarse porque el paciente presenta una alteración en la síntesis del grupo hemo.

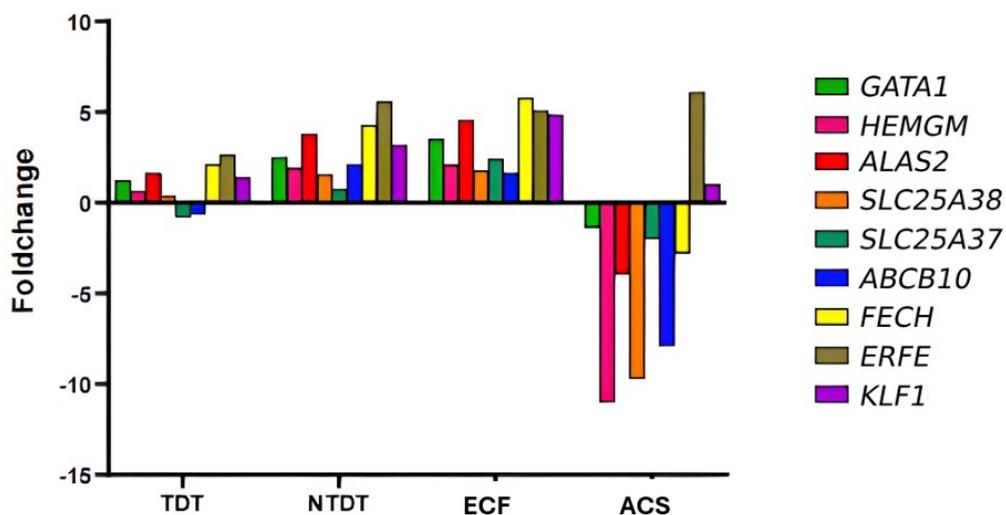


Figura 26. Análisis de expresión diferencial de los genes implicados en la eritropoyesis y metabolismo del hierro. Se observa un incremento de expresión de los genes *GATA1*, *HEMGN*, *ALAS2*, *SLC25A38*, *SLC25A37*, *ABCB10*, y *FECH* en todas las anemias congénitas con respecto a los controles sanos, excepto en el paciente con ACS. El aumento de expresión del gen *ERFE* es constante en todas las anemias congénitas estudiadas.

Otro gen analizado por ser esencial en la eritropoyesis fue el *CDANI* (codifica Codanin-1). Su función no es muy conocida, pero se cree que regula la incorporación de histonas al ADN durante la replicación celular (170). Además, mutaciones en este gen causan anemia diseritropoyética congénita tipo I (171). Es curioso que, en nuestro estudio, sólo el paciente con ACS presentó una disminución significativa de la expresión del gen *CDANI* (foldchange -6,6, $p < 0,01$). No encontrándose diferencias significativas en el resto de los grupos de estudio (**figura 27**).

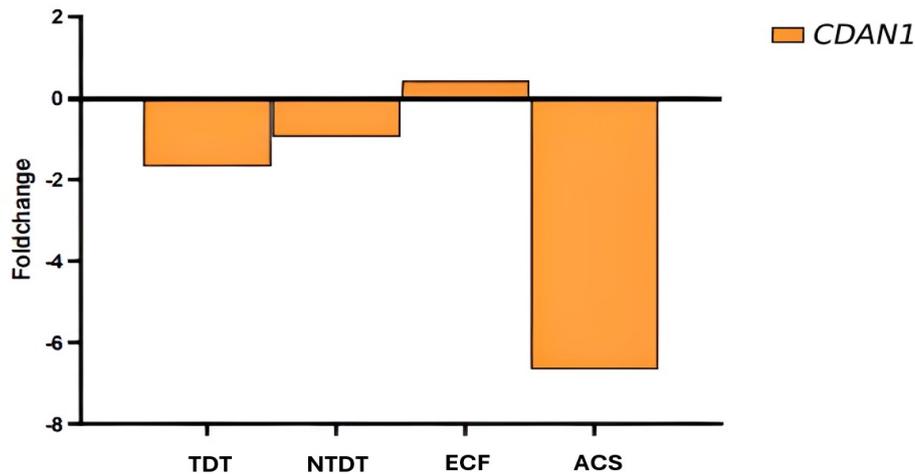


Figura 27. Se describe la expresión del gen *CDANI* en los diferentes grupos de anemias congénitas a estudio, observando una expresión significativamente disminuida de dicho gen en el paciente con ACS con respecto al resto de pacientes estudiados.

3. Patrón de expresión de *BPGM* en los diferentes tipos de anemias congénitas

En el eritrocito la glucosa se metaboliza principalmente por glucólisis anaerobia o por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), y una pequeña proporción por la vía de las pentosas fosfato (PPP), necesaria para la protección celular frente al daño oxidativo mediante la producción de NADPH (172,173).

La vía de la EMP metaboliza alrededor del 90% de la glucosa en condiciones fisiológicas, produciendo piruvato o lactato, ATP, NADH y 2,3-BPG. La glucólisis comienza con la fosforilación de la glucosa por la enzima hexoquinasa, que utiliza ATP para producir glucosa-6-fosfato, y termina con la síntesis de ATP por la enzima piruvato quinasa (PK). Además, el 1,3 bifosfoglicerato (1,3-BPG) producido por la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa se convierte en 3-fosfoglicerato (3-PGA) para producir ATP por

la fosfoglicerato cinasa (PGK) (173,174). Sin embargo, el 3-PGA puede evitar este último paso y desviarse a una vía glicolítica alternativa conocida como la vía Rapoport-Luebering donde es convertido por la bifosfoglicerato mutasa (BPGM) a 2,3-BPG. La BPGM puede actuar de forma reversible hidrolizando el 2,3-BPG a 3-PGA para que vuelva a entrar en la vía glucolítica principal (173,174).

La utilización de la glucosa por las diferentes vías metabólicas depende del estado de oxigenación de los eritrocitos. El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) coordina la adaptación a la hipoxia disminuyendo la actividad oxidativa mitocondrial hacia la producción anaeróbica de ATP (173). HIF-1 activa la transcripción de SLC2A1 y SLC2A3, que codifican los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, respectivamente, así como HK1 y HK2, que codifican la hexoquinasa, la primera enzima de la vía EMP (glucólisis) (175).

Así, en estado desoxigenado, el metabolismo de la glucosa es priorizado por la vía EMP, cuyo metabolito 2,3-BPG facilitará la cesión de oxígeno a los tejidos. Así, la función de transporte de oxígeno está estrechamente relacionada con los niveles de 2,3-BPG (173,174).

En nuestro estudio, observamos un aumento significativo en la expresión de *BPGM* en pacientes talasémicos y con ECF (**figura 28**). Estos resultados sugieren que se trata de un aumento fisiológico de la expresión que intenta compensar una situación de hipoxemia secundaria a un estado hemolítico crónico (176). Sin embargo, en el caso del paciente con ACS, la expresión está significativamente disminuida en comparación con el grupo control y con el resto de los grupos a estudio. No cumpliendo con la premisa anterior (**figura 28**).

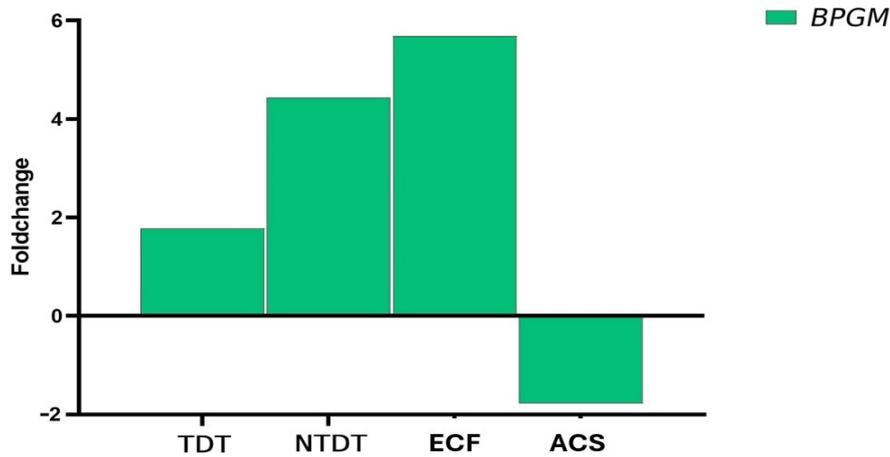


Figura 28. Expresión del gen *BPGM* en los pacientes con TDT, NTDT, ECF y ACS en comparación con los controles sanos. Se observa un incremento significativo de la expresión en todos los grupos a estudio salvo en el paciente con ACS.

Dada la implicación del metabolito 2,3-BPG en la transferencia de oxígeno a los tejidos, y su posible repercusión en la polimerización del hematíe falciforme (174), analizamos dentro del grupo de pacientes con ECF si existían diferencias dependientes del fenotipo clínico en la expresión del gen *BPGM*, encontrando que la expresión más alta se encontraba en los pacientes homocigotos para HbS (pacientes S2 y S4), que presentaban un fenotipo clínico más grave a pesar su menor edad (**figura 29**). Es importante destacar, que, en el momento del análisis, los pacientes S1, S2 y S4 estaban en tratamiento con hidroxiurea, posible factor modulador de los niveles de BPG por su efecto sobre los niveles de HbF.

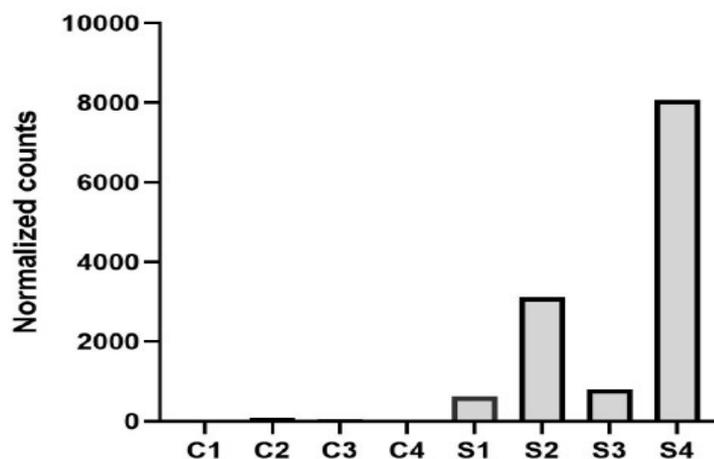


Figura 29. Correlación entre la gravedad fenotípica de los pacientes con ECF y los niveles de expresión del gen *BPGM*, observando mayores niveles de expresión en los pacientes con genotipo SS.

4. Diferencias de expresión en los genes relacionados con el estrés oxidativo entre las diferentes anemias congénitas

La polimerización de la HbS en pacientes con ECF y la acumulación de cadenas de globina no conjugadas en pacientes con talasemia, conducen a cambios fisiopatológicos en el eritrocito y el endotelio asociados a una amplia gama de complicaciones clínicas. Estas alteraciones en el citoesqueleto y estructura de la membrana eritrocitaria inducen un estrés oxidativo severo que conduce a la pérdida de la integridad de la membrana y a la hemólisis del eritrocito (34,79,81).

El estrés oxidativo es consecuencia de varios mecanismos, entre ellos la hemólisis, que conlleva un consumo de NO y la generación de especies oxidativas reactivas a través de la regulación de la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa. El daño oxidativo se manifiesta en las membranas eritrocitarias a través de la disminución de la presencia de grupos sulfhidrilo, el aumento de la peroxidación lipídica y la deformación del citoesqueleto (50). Este aumento de ROS daña la estructura conformacional de la membrana eritrocitaria, provocando la lisis temprana del hematíe.

En nuestro análisis, se observó un aumento global de la expresión de los genes que codificaban para enzimas antioxidantes implicadas en reacciones REDOX en todos los grupos, excepto en el paciente con ACS en el que la expresión estaba disminuida.

Los genes con significación estadística ($p < 0,05$) fueron los implicados en la vía del glutatión (*GLRX5*, *GPX* y *GCLC*) y en la reducción de H_2O_2 (*PRDX2*). Observando un aumento significativo de la expresión en los pacientes talasémicos y con ECF, y una disminución significativa de la expresión nuevamente en el paciente con ACS (**figura 30**).

Los resultados observados en nuestros pacientes talasémicos y con ECF podrían deberse a una respuesta fisiológica compensatoria al aumento del estrés oxidativo.

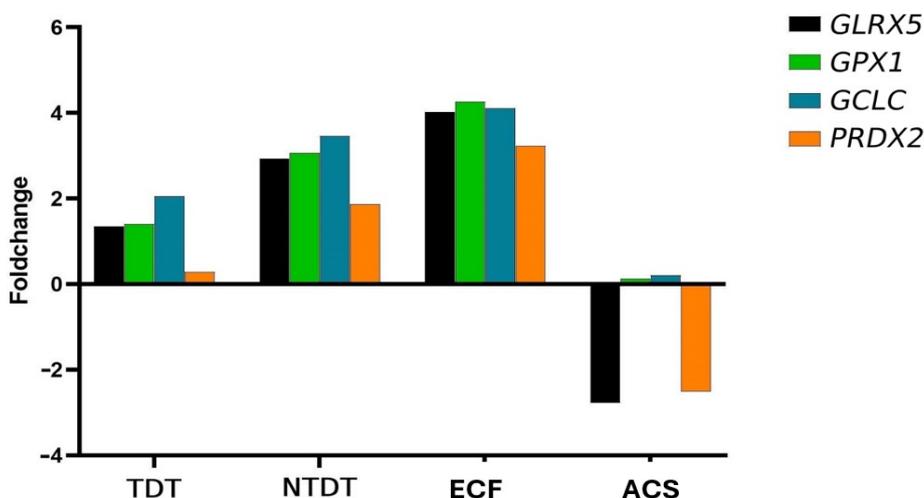


Figura 30. Expresión de los principales genes implicados en el metabolismo oxidativo en los distintos grupos de anemias congénitas con respecto a los controles sanos. Se observa un incremento significativo de expresión de los genes *GLRX5*, *GPX1*, *GCLC* y *PRDX2* en todas las anemias congénitas estudiadas a excepción del paciente con ACS.

El glutatión se produce en el citosol y se transporta principalmente a las mitocondrias a través del transportador *SLC25A39* (177). Dado el papel crucial del glutatión en el metabolismo oxidativo, se examinó la expresión de *SLC25A39* en diferentes grupos de anemias congénitas. Los resultados fueron coherentes con los de los análisis de genes del metabolismo oxidativo, mostrando un aumento de la expresión en los pacientes talasémicos y con ECF, y una disminución de la expresión en el paciente con ACS en comparación con los controles sanos (**figura 31**).

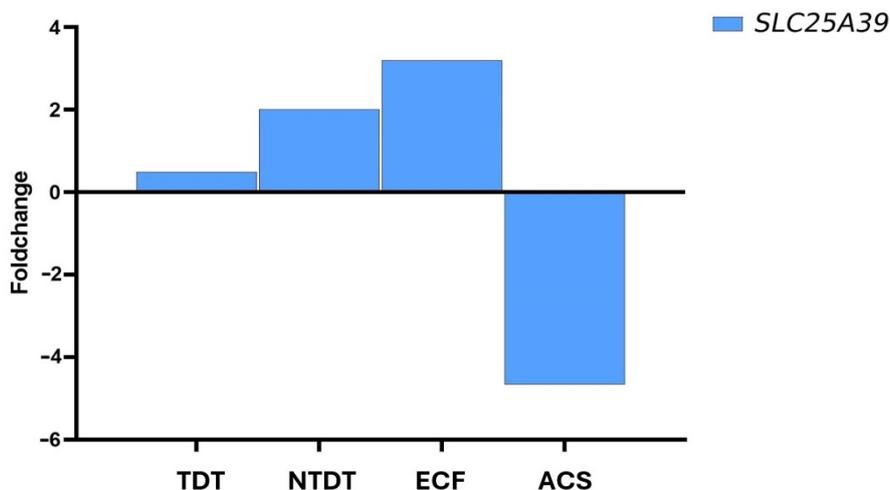


Figura 31. Expresión significativamente disminuida del gen *SLC25A39* en el paciente con ACS.

5. Diferencias significativas en genes relacionados con la expresión de proteínas estructurales de membrana entre las distintas anemias congénitas

Los pacientes con anemias congénitas suelen presentar un desequilibrio en las proteínas estructurales de la membrana eritrocitaria. Concretamente, en la talasemia, el desequilibrio de las cadenas de globina altera el ensamblaje normal de las proteínas de membrana de los precursores eritroides, contribuyendo a la lisis intramedular (178). En la ECF, la mutación en la cadena β -globina conduce a la deformación de los hematíes falciformes, afectando a la integridad de la membrana eritrocitaria y al citoesqueleto, aumentando la rigidez de los hematíes y favoreciendo su lisis (34).

En nuestro estudio, encontramos sobre-expresión de los genes *SLC4A1*, *ANK1*, *EPB41*, *EPB42*, *SPTA1*, *SPTB* y *STOM*, todos ellos implicados en el mantenimiento de la estructura y función eritrocitaria, en pacientes con talasemia y ECF. Sin embargo, en el caso del paciente con ACS, una vez más, estos genes presentaban una expresión disminuida en comparación con los controles sanos (**figura 32**).

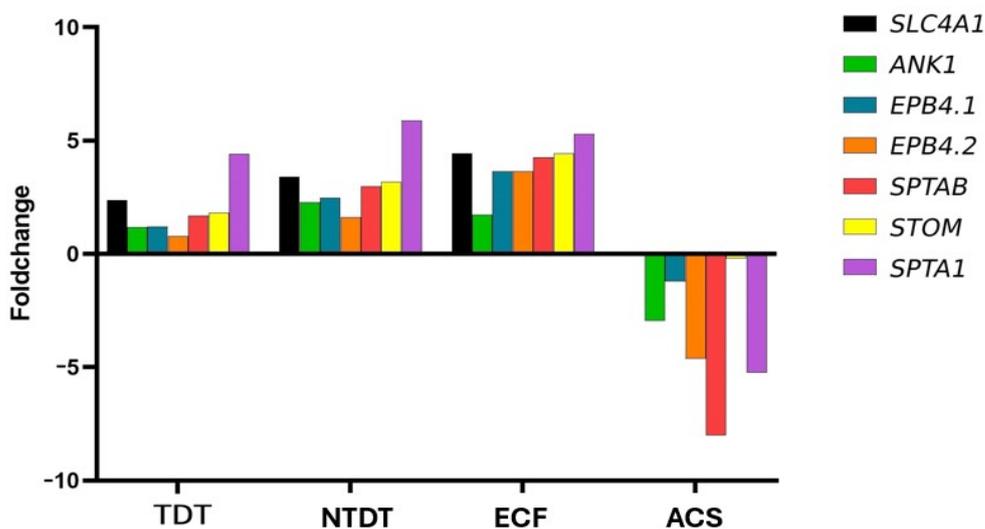
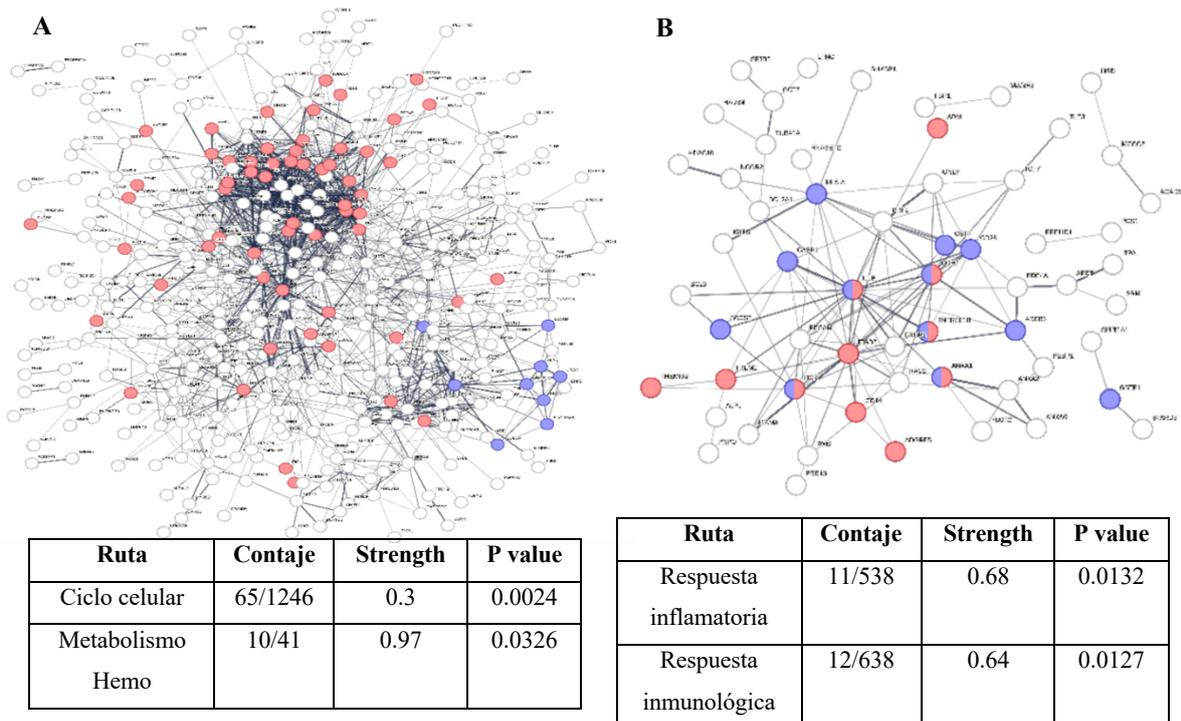


Figura 32. Diferencias de expresión de los principales genes codificantes para proteínas de membrana eritrocitaria. Se observa un incremento global de la expresión de los genes *SCL4A1*, *ANK1*, *EPB4.1*, *EPB4.2*, *SPTA1*, *SPTB* y *STOM* en los pacientes con TDT, NTD, ECF, excepto en el paciente con ACS en el que la expresión está significativamente disminuida.

6. Otras vías alteradas en las anemias congénitas

Además del estudio de las vías canónicas implicadas en la homeostasis eritrocitaria, se realizó un análisis de las vías metabólicas afectadas en cada grupo de pacientes en comparación con los controles sanos utilizando la base de datos STRING. En este análisis se empleó un criterio de selección más estricto, considerando únicamente los genes con un valor $p < 0,05$ y $\text{Log}_2\text{FC} < -2$ o > 2 . Los resultados indicaron que los pacientes con TDT no presentaban ninguna vía metabólica significativamente alterada aparte de las comentadas anteriormente. Por el contrario, los pacientes con NTDT presentaron incremento de expresión en genes asociados con el ciclo celular (**figura 33A**) y genes infra-expresados implicados en la respuesta inflamatoria y en la respuesta inmune (**figura 33B**). Por el contrario, los pacientes con ECF presentaron genes sobre-expresados implicados en la autofagia y en la regulación del catabolismo (**figura 33C**). Curiosamente, los genes infra-expresados en estos pacientes estaban implicados en la respuesta inflamatoria y de citocinas (**figura 33D**), de forma similar a los pacientes con NTDT (**Figura 33B**). Por último, en el paciente con ACS se encontró genes sobre-expresados sin relación significativa con ninguna ruta específica y genes infra-expresados asociados con la síntesis del ribosoma y los procesos metabólicos del ARN (**figura 33E**).



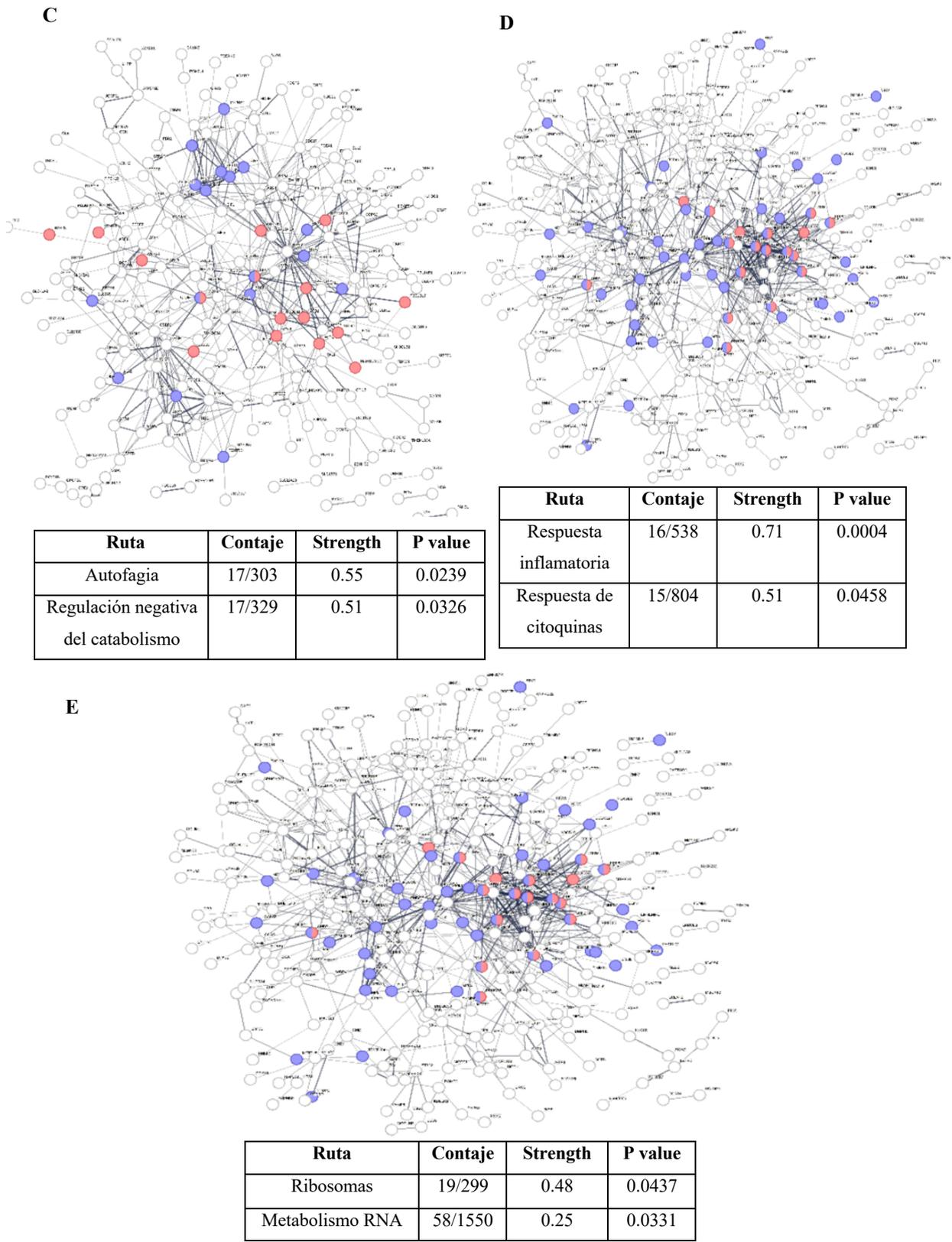


Figura 33. Vías metabólicas alteradas en pacientes con anemias congénitas. STRING (A-E). Análisis de las interacciones entre genes con expresión incrementada en pacientes con NTD (A) y ECF (C), y genes con disminución de la expresión en pacientes con NTD (B), ECF (D) y ACS (E) en comparación con controles sanos.

DISCUSIÓN

La eritropoyesis es un proceso complejo y dinámico en el que intervienen numerosas vías metabólicas. En muchas anemias congénitas, una única mutación es la causante de la enfermedad, sin embargo, esta alteración primaria a menudo conduce a múltiples procesos secundarios que están alterados y desregulados. Nuestro estudio profundiza en los niveles de expresión de ARN de estos procesos para comprender su implicación en diferentes formas de anemias congénitas, observando claros patrones de expresión diferencial entre pacientes con anemia hemolítica congénita (talasemia y ECF) y anemia congénita por insuficiencia medular (ACS con la mutación en el gen *SLC25A38*).

En la eritropoyesis normal, los niveles de GATA1 en el núcleo se regulan mediante el equilibrio entre la escisión por caspasa 3 y la función protectora de la proteína HSP70 (179). En el eritroblasto β -talasémico, la falta de cadenas funcionales de β -globina induce la acumulación de las cadenas sobrantes de α -globina que restringen la distribución de HSP70 al citoplasma. En consecuencia, GATA1 es escindido por caspasa 3 en el núcleo, resultando en una reducción de eritrocitos maduros funcionales (84). Como resultado, se produce una apoptosis masiva en el estadio de eritroblasto policromático, que afecta secundariamente a la fase temprana de diferenciación con la expansión de progenitores eritroides inmaduros (84).

En los eritroblastos falciformes, la cinética de atrapamiento de la HSP70 es más lenta que en talasemia. Mientras que las cadenas de α -globina forman agregados tan pronto como se expresan secuestrando la proteína HSP70 en el citoplasma, la HbS necesita tiempo para formar polímeros, ya que su formación depende de la atmósfera hipóxica del microambiente medular y de la concentración intracelular de HbS. Debido a esto, se produce un aumento de la apoptosis en las etapas de diferenciación de eritroblasto policromático y ortocromático, a diferencia de la talasemia en las que la eritropoyesis ineficaz afecta a las primeras etapas de la diferenciación (6,57).

Debido a esta eritropoyesis ineficaz, los eritrocitos circulantes pueden mostrar deficiencias en sus componentes celulares y sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo energético y oxidativo, contribuyendo a la disminución de la supervivencia del eritrocito. Para disminuir esta eritropoyesis ineficaz, existe en fases terminales de la

diferenciación eritroide un mecanismo antiapoptótico que selecciona positivamente las células con altos niveles de HbF (57,180).

En nuestro estudio, observamos un aumento de la expresión de *GATA1* y de otros genes implicados en la diferenciación eritroide en pacientes con talasemia y ECF. Esto podría deberse a un mecanismo compensatorio por la eritropoyesis ineficaz y la hemólisis crónica, como ya ha sido descrito en pacientes con ECF fuera de la CVO (181).

Sin embargo, en el caso del paciente con ACS, se observa una disminución global de la expresión de genes implicados en la eritropoyesis. Se ha descrito en pacientes con síndrome mielodisplásico, que la baja expresión de *HEMGN* contribuye a la deslocalización intranuclear de *GATA1* y puede contribuir a empeorar la eritropoyesis ineficaz (169). En el caso de nuestro paciente con ACS, observamos una disminución significativa de este gen, lo que nos hace pensar que el mecanismo por el que se produce la diseritropoyesis en pacientes con anemias por insuficiencia medular es diferente del observado en otras anemias hemolíticas congénitas.

También llama la atención la baja expresión del gen *CDANI*, implicado en la anemia diseritropoyética congénita tipo I (ADC-I) (170). En nuestro estudio, sólo el paciente con ACS presentó una expresión significativamente disminuida de este gen. Así, la baja expresión encontrada del gen *CDANI* podría estar relacionada con la afectación de la maduración eritroide en otros tipos de anemia congénita por insuficiencia medular.

Se ha descrito un aumento de las enzimas glucolíticas en pacientes con ECF atribuido a una mayor demanda en la síntesis de ATP. Los datos proteómicos publicados sugieren un aumento de los niveles de la enzima 2,3-BPG quinasa, lo que apoya la teoría de la estimulación de las vías glucolíticas en la ECF (182). Nuestros datos corroboran que los genes implicados en el metabolismo anaerobio eritrocitario muestran una mayor expresión en los pacientes con ECF, aunque no de forma significativa. De nuevo, resulta sorprendente la diferencia de expresión en el paciente con ACS, en el que la expresión de estos genes de la vía glucolítica está globalmente disminuida.

En este contexto, se han descrito concentraciones significativamente elevadas de 2,3-BPG en los eritrocitos falciformes como una respuesta adaptativa secundaria a la hemólisis crónica. Sin embargo, esta respuesta es contraproducente porque el aumento de

desoxi-Hb promueve la polimerización del eritrocito falciforme (174). Así, los datos publicados sugieren que los niveles de 2,3-BPG están directamente implicados en la estabilización de los polímeros de HbS (183). Se ha demostrado que su disminución en células falciformes reduce la polimerización de la HbS. En nuestro estudio, los datos obtenidos en pacientes con ECF apoyan los publicados en la literatura. Hemos encontrado también un aumento significativo en pacientes con talasemia, mostrando de nuevo similitudes en cuanto a la expresión génica. Sin embargo, en el caso del paciente con ACS, la expresión está significativamente disminuida con respecto al grupo control y al resto de grupos en estudio.

Se ha descrito que en los pacientes talasémicos y en los pacientes con ECF existe un aumento del estrés oxidativo secundario a la Hb y al hierro libres, al desequilibrio de cadenas en el caso de los pacientes talasémicos y a las CVO de repetición en los pacientes con ECF (31,34). El aumento de la expresión de genes con actividad antioxidante parece ser común en la mayoría de los estudios realizados en pacientes con ECF, especialmente el aumento de catalasa y peroxiredoxinas, en el contexto de un aumento compensatorio de los mecanismos antioxidantes ante un incremento del estrés oxidativo (50).

Nuestros resultados mostraron que las vías implicadas en la respuesta al estrés oxidativo (*GLRX5*, *GPX*, *GCLC* y *PRDX2*) estaban más activadas en los pacientes talasémicos y con ECF en comparación con los individuos sanos, corroborando los resultados publicados en la literatura. Sin embargo, el comportamiento en el paciente con ACS es inverso, mostrando niveles de expresión significativamente disminuidos con respecto a los controles y al resto de anemias congénitas estudiadas.

Además, el glutatión mitocondrial es necesario para la actividad y estabilidad de proteínas que contienen grupos hierro y azufre, así como para la eritropoyesis y el metabolismo oxidativo (177). En nuestro estudio, observamos en el paciente con ACS una disminución significativa de la expresión del gen *SLC25A39* que codifica para el transportador mitocondrial de glutatión, que era no se observó en el resto de los grupos a estudio. Así, pensamos que el transportador *SLC25A39* podría desempeñar un papel desconocido en la fisiopatología de la ACS.

En relación con las proteínas estructurales de membrana, se ha informado mediante estudios proteómicos que los eritrocitos falciformes muestran defectos en el

citoesqueleto. Muchos de estos hallazgos son coherentes con la fisiopatología de la ECF, incluida la elevada carga oxidativa, que provoca daños en las proteínas del citoesqueleto y rigidez eritrocitaria (182). Además, la glucólisis anaeróbica depende de la expresión de ciertas proteínas de membrana (174), que encontramos sobre-expresadas en la talasemia y en la ECF. En nuestro análisis, observamos un aumento global en la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales de membrana en los grupos con anemia hemolítica congénita (ECF y talasemia), mientras que esta premisa no se cumplió en el paciente con anemia por insuficiencia medular.

Por último, otras vías importantes como el ciclo celular, la respuesta inflamatoria e inmune, o la autofagia parecen estar moduladas de forma diferente en las anemias estudiadas. Por lo tanto, este estudio abre nuevas vías para profundizar en estas enfermedades raras.

En definitiva, nuestro estudio proporciona un nuevo mapa de perfiles de expresión génica que incluye diferentes tipos de anemias congénitas que podrían utilizarse como nuevos biomarcadores en la clínica.

CONCLUSIONES

1. La incidencia de los síndromes drepanocíticos en la Región de Murcia, obtenida a través de los datos del cribado neonatal, es de 1/10.000 recién nacidos, similar al resto de CCAA en las que se ha estudiado, e inferior al de CCAA con mayor flujo migratorio (Cataluña, Islas Baleares y Madrid).
2. La implantación del cribado de la ECF en nuestra Región ha permitido detectar 10 casos de enfermedad falciforme a los que se ha podido instaurar de forma precoz medidas que han demostrado disminuir la morbimortalidad infantil, además de ofrecer asesoramiento genético a los padres en todos los casos.
3. Describimos por primera vez la implicación del inflammasoma NLRP1 en la eritropoyesis de un paciente con ACS homocigoto para la mutación en *SCL25A38*. Además, el paciente presenta una nueva variante de NLRP1, más activa que la variante silvestre y con un procesamiento proteico mayor. Esto puede indicar que distintas variantes de NLRP1 pueden influir en el fenotipo clínico de la enfermedad.
4. La inhibición farmacológica de CASP1 aumenta la formación de eritrocitos *ex vivo* en el paciente con ACS, lo que indica que es un mecanismo que puede contribuir a restaurar la eritropoyesis en estos pacientes.
5. La ferroptosis favorece el procesamiento proteico de NLRP1 y su inhibición produce un aumento de colonias eritroides. Esto indica que la ferroptosis es un mecanismo que puede contribuir a empeorar el fenotipo de la ACS y su inhibición puede ser una vía de investigación futura para desarrollar nuevas terapias.
6. La inhibición de CASP1 junto con la inhibición de la ferroptosis contribuyen de forma sinérgica a la formación de colonias eritroides en un paciente con ACS.

7. Hemos encontrado un patrón de expresión génica diferencial entre los distintos tipos de anemias congénitas: las anemias con predominio del componente diseritropoyético/hemolítico vs las anemias por fallo medular. Así, en las primeras, objetivamos un incremento global en la expresión de los genes implicados en la eritropoyesis, metabolismo redox, síntesis de proteínas de membrana y glucolisis, probablemente como mecanismo compensatorio a la hipoxemia, hemólisis y eritropoyesis ineficaz. Destaca el incremento significativo de la expresión del gen de la *BPGM* por su posible implicación en el agravamiento fenotípico de los pacientes con ECF. En los pacientes con fallo medular, el patrón de expresión parece ser completamente el inverso.

CONCLUSIONS

1. The incidence of sickle cell syndromes in the Region of Murcia, obtained through neonatal screening data, is 1/10,000 newborns, similar to the rest of the Autonomous Communities in which it has been studied, and lower than in the Autonomous Communities with a greater migratory flow (Catalonia, Balearic Islands and Madrid).
2. In our Region, the implementation of neonatal screening for SCD has made it possible to detect 10 cases of SCD for which it has been possible to implement early measures that have been shown to reduce infant morbidity and mortality, in addition to offering genetic counseling to parents in all cases.
3. We describe for the first time the involvement of the NLRP1 inflammasome in erythropoiesis in a patient with CSA with homozygous mutation in the *SLC25A38* gene. In addition, the patient presents a new NLRP1 variant, more active than the wild-type variant, whose protein processing is higher than that of the wild-type. This may indicate that different NLRP1 variants may influence the clinical phenotype of the disease.
4. Pharmacological inhibition of CASP1 increases *ex vivo* erythrocyte formation in CSA patient, indicating that this is a mechanism that could contribute to restore erythropoiesis in these patients.
5. Ferroptosis favors NLRP1 protein processing, and its inhibition results in increased erythroid colonies. This indicates that ferroptosis is a mechanism that may contribute to worsening the CSA phenotype, and its inhibition may be an avenue for future research to develop new therapies.
6. Inhibition of CASP1 and ferroptosis show a synergic effect in erythrocyte production in a CSA patient.
7. We have found a differential gene expression pattern between the different types of congenital anemias: anemias with a predominance of the dyserythropoietic/hemolytic component vs anemias due to marrow failure. Thus, in the former, we observed a global increase in the expression of genes involved

in erythropoiesis, redox metabolism, membrane protein synthesis and glycolysis, probably as a compensatory mechanism for hypoxemia, hemolysis, and ineffective erythropoiesis. The significant increase in the expression of the *BPGM* gene stands out for its possible implication in the phenotypic worsening of patients with SCD. In patients with bone marrow failure, the expression pattern appears to be completely the reverse.

BIBLIOGRAFÍA

1. Caulier A, Sankaran VG. Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis. *Blood*. (2022) 140:1451–1451. doi: 10.1182/Blood.2022017227.
2. Florensa L, Arenillas L, Calvo X, Pérez-Vila E, Montesdeoca S, Ferrer A, Woessner S. The importance of adequate recognition of normal and dysplastic myelopoiesis for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Histol Histopathol*. (2019) 34:857–873. doi: 10.14670/HH-18-093.
3. Hu J, Liu J, Xue F, Halverson G, Reid M, Guo A, Chen L, Raza A, Galili N, Jaffray J, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. (2013) 121(16):3246-53. doi: 10.1182/blood-2013-01.
4. Yan H, Ali A, Blanc L, Narla A, Lane JM, Gao E, Papoin J, Hale J, Hillyer CD, Taylor N, et al. Comprehensive phenotyping of erythropoiesis in human bone marrow: Evaluation of normal and ineffective erythropoiesis. *Am J Hematol*. (2021) 96:1064–1076. doi: 10.1002/ajh.26247.
5. Tang P, Wang H. Regulation of erythropoiesis: emerging concepts and therapeutic implications. *Hematology*. (2023) 28:2250645. doi: 10.1080/16078454.2023.2250645.
6. Sanchez-Villalobos M, Blanquer M, Moraleda JM, Salido EJ, Perez-Oliva AB. New Insights Into Pathophysiology of β -Thalassemia. *Front Med (Lausanne)*. (2022) 9. doi: 10.3389/FMED.2022.880752.
7. Elliott S, Sinclair A, Collins H, Rice L, Jelkmann W. Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example. *Ann Hematol*. (2014) 93:181–192. doi: 10.1007/s00277-013-1947-2.
8. Martínez PA, Li R, Ramanathan HN, Bhasin M, Pearsall RS, Kumar R, Suragani RNVS. Smad2/3-pathway ligand trap luspatercept enhances erythroid differentiation in murine β -thalassaemia by increasing GATA-1 availability. *J Cell Mol Med*. (2020) 24:6162–6177. doi: 10.1111/JCMM.15243.
9. Gutiérrez L, Caballero N, Fernández-Calleja L, Karkoulia E, Strouboulis J. Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis. *IUBMB Life*. (2020) 72:89–105. doi: 10.1002/iub.2192.
10. Tyrkalska SD, Pérez-Oliva AB, Rodríguez-Ruiz L, Martínez-Morcillo FJ, Alcaraz-Pérez F, Martínez-Navarro FJ, Lachaud C, Ahmed N, Schroeder T, Pardo-Sánchez

- I, et al. Inflammasome Regulates Hematopoiesis through Cleavage of the Master Erythroid Transcription Factor GATA1. *Immunity*. (2019) 51:50-63.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.005.
11. Rodríguez-Ruiz L, Lozano-Gil JM, Naranjo-Sánchez E, Martínez-Balsalobre E, Martínez-López A, Lachaud C, Blanquer M, Phung TK, García-Moreno D, Cayuela ML, et al. ZAK α /P38 kinase signaling pathway regulates hematopoiesis by activating the NLRP1 inflammasome. *EMBO Mol Med*. (2023) 15: e18142. doi: 10.15252/emmm.202318142.
 12. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. (2010) 140:821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
 13. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavel RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. (2014) 6:a016287. doi: 10.1101/cshperspect.a016287.
 14. Coll RC, Schroder K, Pelegrín P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci*. (2022) 43:653–668. doi: 10.1016/j.tips.2022.04.003.
 15. Kuriakose T, Kanneganti TD. Pyroptosis in Antiviral Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. (2023) 442:65-83. doi: 10.1007/82_2019_189.
 16. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:407–20. doi: 10.1038/nri.2016.58.
 17. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. (2015) 21:677–687. doi: 10.1038/nm.3893.
 18. Takeichi T, Akiyama M. Current understanding of the phenotypic spectrum of patients with *NLRP1* variants. *Br J Dermatol*. (2023) 188:160–167. doi: 10.1093/bjd/ljac036.
 19. Chavakis T, Mitroulis I, Hajishengallis G. Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation. *Nat Immunol* (2019). 20:802–811. doi: 10.1038/s41590-019-0402-5.
 20. Bauernfried S, Hornung V. Human NLRP1: From the shadows to center stage. *J Exp Med*. (2022) 219: e20211405. doi: 10.1084/jem.20211405.
 21. Barry K, Murphy C, Mansell A. NLRP1- A CINDERELLA STORY: a perspective of recent advances in NLRP1 and the questions they raise. *Commun Biol*. (2023) 6:1274. doi: 10.1038/s42003-023-05684-3.
 22. Hong F, Chen Y, Gao H, Shi J, Lu W, Ju W, Fu C, Qiao J, Xu K, Zeng L. NLRP1 in Bone Marrow Microenvironment Controls Hematopoietic Reconstitution After

- Transplantation. *Transplant Cell Ther.* (2021) 27:908.e1-908.e11. doi: 10.1016/j.jtct.2021.07.016.
23. Finger JN, Lich JD, Dare LC, Cook MN, Brown KK, Duraiswami C, Bertin JJ, Gough PJ. Autolytic Proteolysis within the Function to Find Domain (FIIND) Is Required for NLRP1 Inflammasome Activity. *J Biol Chem.* (2012) 287:25030–25037. doi: 10.1074/jbc.M112.378323.
 24. Hollingsworth LR, Sharif H, Griswold AR, Fontana P, Mintseris J, Dagbay KB, Paulo JA, Gygi SP, Bachovchin DA, Wu H. DPP9 sequesters the C terminus of NLRP1 to repress inflammasome activation. *Nature.* (2021) 592:778–783. doi: 10.1038/s41586-021-03350-4.
 25. Taabazuing CY, Griswold AR, Bachovchin DA. The NLRP1 and CARD8 inflammasomes. *Immunol Rev.* (2020) 297:13–25. doi: 10.1111/imr.12884.
 26. Rodríguez-Ruiz L, Lozano-Gil JM, Lachaud C, Mesa-del-Castillo P, Cayuela ML, García-Moreno D, Pérez-Oliva AB, Mulero V. Zebrafish Models to Study Inflammasome-Mediated Regulation of Hematopoiesis. *Trends Immunol.* (2020) 41:1116–1127. doi: 10.1016/j.it.2020.10.006.
 27. Adamiak M, Abdel-Latif A, Bujko K, Thapa A, Anusz K, Tracz M, Brzeźniakiewicz-Janus K, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. Nlrp3 Inflammasome Signaling Regulates the Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem Cells (HSPCs) by Enhancing Incorporation of CXCR4 Receptor into Membrane Lipid Rafts. *Stem Cell Rev Rep.* (2020) 16:954–967. doi: 10.1007/s12015-020-10005-w.
 28. Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, Preston S, Pellegrini M, O’Donnell JA, McArthur K, Baldwin TM, Chevrier S, Nowell CJ, et al. NLRP1 Inflammasome Activation Induces Pyroptosis of Hematopoietic Progenitor Cells. *Immunity.* (2012) 37:1009–1023. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.027.
 29. Manley PW, Drueckes P, Fendrich G, Furet P, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Mestan J, Trappe J, Wartmann M, Fabbro D. Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib. *Biochim Biophys Acta.* (2010) 1804:445–453. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.008.
 30. Erythropathology Group of the Spanish Society of Haematology and Haemotherapy. *Guide to Sickle Cell Disease*; Medea, Medical Education Agency S.L.: Madrid, Spain, 2021.

31. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. (2010) 376:2018–2031. doi: 10.1016/S0140.
32. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. (2018) 19:113-147. doi: 10.1146/annurev.
33. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. (2017) 376:1561–1573. doi: 10.1056/NEJMra1510865.
34. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. (2018) 4: 18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.
35. Sobota A, Sabharwal V, Fonebi G, Steinberg M. How we prevent and manage infection in sickle cell disease. *Br J Haematol*. (2015) 170:757–767. doi: 10.1111/bjh.13526.
36. Brown BJ, Madu A, Sangeda RZ, Nkya S, Peprah E, Paintsil V, Mmbando BP, Gyamfi J, Okocha CE, Asala SA, et al. Utilization of Pneumococcal Vaccine and Penicillin Prophylaxis in Sickle Cell Disease in Three African Countries: Assessment among Healthcare Providers in Sickle In Africa. *Hemoglobin*. (2021) 45:163–170. doi: 10.1080/03630269.2021.1954943.
37. Thuret I, Sarles J, Merono F, Suzineau E, Collomb J, Lena-Russo D, Levy N, Bardakdjian J, Badens C. Neonatal screening for sickle cell disease in France: Evaluation of the selective process. *J Clin Pathol*. (2010) 63:548–551. doi: 10.1136/jcp.2009.068874.
38. Streetly A, Latinovic R, Henthorn J. Positive screening and carrier results for the England-wide universal newborn sickle cell screening programme by ethnicity and area for 2005-07. *J Clin Pathol*. (2010) 63:626–629. doi: 10.1136/jcp.2010.077560.
39. Bardón Cancho EJ, García-Morín M, Beléndez C, Velasco P, Benítez D, Ruiz-Llobet A, Berrueco R, Argilés B, Cervera Á, Salinas JA, et al. Update of the Spanish registry of haemoglobinopathies in children and adults. *Med Clin (Barc)*. (2020) 155:95–103. doi: 10.1016/j.medcli.2019.10.011.
40. Sánchez-Villalobos M, Campos Baños E, Juan Fita MJ, Egea Mellado JM, Gonzalez Gallego I, Beltrán Videla A, Berenguer Piqueras M, Bermúdez Cortés M, Moraleda Jiménez JM, Guillen Navarro E, et al. A Newborn Screening Program for Sickle Cell Disease in Murcia (Spain). *Int J Neonatal Screen*. (2023) 9: 55. doi: 10.3390/ijns9040055.

41. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem.* (2020). 94:345-382. doi: 10.1007/978-3-030-41769-7_14.
42. Brandow AM, Liem RI. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *J Hematol Oncol.* (2022) 15: 20. doi: 10.1186/s13045-022-01237-z.
43. Rees DC, Brousse VAM, Brewin JN. Determinants of severity in sickle cell disease. *Blood Rev.* (2022) 56: 100983. doi: 10.1016/j.blre.2022.100983.
44. D'Alessandro A, Xia Y. Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia. *Curr Opin Hematol.* (2020) 27:155–162. doi: 10.1097/MOH.0000000000000574.
45. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol.* (2002). 9:101-6. doi: 10.1097/00062752-200203000-00003.
46. Setty BNY, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood.* (1996) 88:2311-20.
47. Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med.* (2004) 144:260–267. doi: 10.1016/j.lab.2004.08.004.
48. Dominical VM, Samse L, Nichols JS, Costa FF, McCoy JP, Conran N, Kato GJ. Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. *Haematologica.* (2014) 99:e214–e217. doi: 10.3324/haematol.2014.108555.
49. Repka T, Hebbel RP. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood.* (1991) 78(10):2753-8.
50. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* (2002) 8:1383–1389. doi: 10.1038/nm799.
51. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* (1988) 333:664-6. doi: 10.1038/333664a0.
52. De Caterina R, Libby P, Peng H-B, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion

- molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* (1995) 96(1):60-8. doi: 10.1172/JCI118074.
53. Gladwin MT. Deconstructing endothelial dysfunction: Soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest.* (2006) 116:2330–2332. doi: 10.1172/JCI29807.
 54. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sanchdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* (2005) 294(1):81-90. doi: 10.1001/jama.294.1.81.
 55. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise L V., Orringer EP. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica.* (2008) 93:20–26. doi: 10.3324/haematol.11763.
 56. Westerman M, Pizzey A, Hirschman J, Cerino M, Weil-Weiner Y, Ramotar P, Eze A, Lawrie A, Purdy G, Mackie I, et al. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *Br J Haematol.* (2008) 142:126–135. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07155.x.
 57. El Nemer W, Godard A, El Hoss S. Ineffective erythropoiesis in sickle cell disease: new insights and future implications. *Curr Opin Hematol.* (2021) 28:171–176. doi: 10.1097/MOH.0000000000000642.
 58. Brousseau DC, Owens PL, Mosso AL, Panepinto JA, Steiner CA. Acute care utilization and rehospitalizations for sickle cell disease. *JAMA.* (2010) 303(13):1288-94. doi: 10.1001/jama.2010.378.
 59. Novelli EM, Gladwin MT. Crises in sickle cell disease. *Chest.* (2016) 149:1082–1093. doi: 10.1016/j.chest.2015.12.016.
 60. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med.* (2000). 342:1855-65. doi: 10.1056/NEJM200006223422502.
 61. Obaro SK, Tam PYI. Preventing Infections in Sickle Cell Disease: The Unfinished Business. *Pediatr Blood Cancer.* (2016) 63:781–785. doi: 10.1002/pbc.25911.
 62. Yee ME, Lai KW, Bakshi N, Grossman JK, Jaggi P, Mallis A, Wang YF, Jerris RC, Lane PA, Yildirim I. Bloodstream Infections in Children with Sickle Cell Disease:

- 2010–2019. *Pediatrics*. (2022) 149: e2021051892. doi: 10.1542/peds.2021-051892.
63. Berry PA, Cross TJS, Thein SL, Portmann BC, Wendon JA, Karani JB, Heneghan MA, Bomford A. Hepatic dysfunction in sickle cell disease: a new system of classification based on global assessment. *Clin Gastroenterol Hepatol*. (2007) 5:1469–1476. doi: 10.1016/j.cgh.2007.08.009.
 64. Kinger NP, Moreno CC, Miller FH, Mittal PK. Abdominal Manifestations of Sickle Cell Disease. *Curr Probl Diagn Radiol*. (2021) 50:241–251. doi: 10.1067/j.cpradiol.2020.05.012.
 65. Majumdar S, Bean CJ, De Staercke C, Bost J, Nickel R, Coates T, Campbell A, Thompson A. Parvovirus B19 infection in sickle cell disease: An analysis from the Centers for Disease Control haemoglobinopathy blood surveillance project. *Transfus Med*. (2020) 30:226–230. doi: 10.1111/tme.12671.
 66. Balbuena-Merle R, Hendrickson JE. Red blood cell alloimmunization and delayed hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Transfus Clin Biol*. (2019) 26:112–115. doi: 10.1016/j.tracli.2019.02.003.
 67. Deane CR, Goss D, Bartram J, Pohl KRE, Height SE, Sibtain N, Jarosz J, Thein SL, Rees DC. Extracranial internal carotid arterial disease in children with sickle cell anemia. *Haematologica*. (2010) 95:1287–1292. doi: 10.3324/haematol.2010.022624.
 68. Idris IM, Burnett AL, Debaun MR. Epidemiology and treatment of priapism in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. (2022) 2022:450–458. doi: 10.1182/hematology.2022000380.
 69. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, Coïc L, Leveillé E, Lemarchand E, Lesprit E, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. (2011) 117:1130–1140. doi: 10.1182/blood-2010-06-293514.
 70. Mushemi-Blake S, Melikian N, Drasar E, Bhan A, Lunt A, Desai SR, Greenough A, Monaghan MJ, Thein SL, Shah AM. Pulmonary haemodynamics in sickle cell disease are driven predominantly by a high-output state rather than elevated pulmonary vascular resistance: A prospective 3-dimensional echocardiography/Doppler study. *PLoS One*. (2015) 10:0135472. doi: 10.1371/journal.pone.0135472.

71. Day TG, Drasar ER, Fulford T, Sharpe CC, Thein SL. Association between hemolysis and albuminuria in adults with sickle cell anemia. *Haematologica*. (2012) 97:201–205. doi: 10.3324/haematol.2011.050336.
72. Sharma D, Brandow AM. Neuropathic pain in individuals with sickle cell disease. *Neurosci Lett*. (2020) 714: 34445. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134445.
73. Sil S, Cohen LL, Dampier C. Psychosocial and functional outcomes in youth with chronic sickle cell pain. *Clin J Pain*. (2016) 32:527–533. doi: 10.1097/AJP.0000000000000289.
74. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf*. (2015) 14: 1749–1758. doi: 10.1517/14740338.2015.1088827.
75. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. (1995) 332(20):1317–22. doi: 10.1056/NEJM199505183322001.
76. Eckman JR. Techniques for blood administration in sickle cell patients. *Semin Hematol*. (2001). 38: 23–9. doi: 10.1016/s0037-1963(01)90057-5.
77. Anurogo D, Budi NYP, Ngo MHT, Huang YH, Pawitan JA. Cell and gene therapy for anemia: Hematopoietic stem cells and gene editing. *Int J Mol Sci*. (2021) 22: 6275. doi: 10.3390/ijms22126275.
78. Origa R. β -Thalassemia. *Genet Med*. (2017) 19:609–619. doi: 10.1038/gim.2016.173.
79. Asadov C, Alimirzoeva Z, Mammadova T, Aliyeva G, Gafarova S, Mammadov J. β -Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. *Int J Hematol*. (2018) 108:5–21. doi: 10.1007/s12185-018-2411-9.
80. Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. (2018) 32:193–211. doi: 10.1016/j.hoc.2017.11.006.
81. Farmakis D, Porter J, Taher A, Cappellini MD, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Alassaf A, Angastiniotis M, Angelucci E, Aydinok Y, et al. 2021 Thalassaemia International Federation Guidelines for the Management of Transfusion-dependent Thalassemia. *Hemasphere*. (2022) 6:e732. doi: 10.1097/HS9.0000000000000732.
82. Musallam KM, Lombard L, Kistler KD, Arregui M, Gilroy KS, Chamberlain C, Zagadailov E, Ruiz K, Taher AT. Epidemiology of clinically significant forms of

- alpha- and beta-thalassemia: A global map of evidence and gaps. *Am J Hematol.* (2023) 98:1436–1451. doi: 10.1002/ajh.27006.
83. Kautz L, Jung G, Valore E V, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* (2014) 46: 678–684. doi: 10.1038/ng.2996.
 84. Camaschella C, Nai A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. *Br J Haematol.* (2016) 172:512–523. doi: 10.1111/bjh.13820.
 85. Tanno T, Bhanu N V., Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NLC, Wang RH, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* (2007) 13:1096–1101. doi: 10.1038/nm1629.
 86. Musallam KM, Cappellini MD, Wood JC, Motta I, Graziadei G, Tamim H, Taher AT. Elevated liver iron concentration is a marker of increased morbidity in patients with β thalassemia intermedia. *Haematologica.* (2011) 96:1605–1612. doi: 10.3324/haematol.2011.047852.
 87. Ziyadeh FN, Musallam KM, Mallat NS, Mallat S, Jaber F, Mohamed AA, Koussa S, Taher AT. Glomerular hyperfiltration and proteinuria in transfusion-independent patients with β -thalassemia intermedia. *Nephron Clin Pract.* (2013) 121:c136-43. doi: 10.1159/000339787.
 88. Schwartz RS, Tanaka Y, Fidler IJ, Chiu DT-Y, Lubin B, Schroit AJ, Lyon B. Increased adherence of sickled and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to cultured human peripheral blood monocytes. *J Clin Invest.* (1985) 75:1965-72. doi: 10.1172/JCI111913.
 89. Musallam KM, Cappellini MD, Taher AT. Evaluation of the 5mg/g liver iron concentration threshold and its association with morbidity in patients with β -thalassemia intermedia. *Blood Cells Mol Dis.* (2013) 51: 35–38. doi: 10.1016/j.bcmd.2013.01.015.
 90. Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, Rachmilewitz EA. Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica* (2013) 98:833–844. doi: 10.3324/haematol.2012.066845.
 91. Taher AT, Musallam KM, Karimi M, El-Beshlawy A, Belhoul K, Daar S, Saned M-S, El-Chafic A-H, Fasulo MR, Cappellini MD. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across

- a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood*. (2010) 115:1886–1892. doi: 10.1182/blood.
92. Taher AT, Musallam KM, El-Beshlawy A, Karimi M, Daar S, Belhoul K, Saned MS, Graziadei G, Cappellini MD. Age-related complications in treatment-naïve patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. (2010) 150: 486–489. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08220.x.
 93. Gaudio A, Xourafa A, Rapisarda R, Zanoli L, Signorelli SS, Castellino P. Hematological diseases and osteoporosis. *Int J Mol Sci*. (2020) 21:3538. doi: 10.3390/ijms21103538.
 94. Castro-Mollo M, Gera S, Ruiz-Martinez M, Feola M, Gumerova A, Planoutene M, Clementelli C, Sangkhae V, Casu C, Kim SM, et al. The hepcidin regulator erythroferrone is a new member of the erythropoiesis-iron-bone circuitry. *Elife*. (2021) 10: e68217. doi: 10.7554/eLife.68217.
 95. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. (2016) 12: 203–221. doi: 10.1038/nrendo.2016.12.
 96. Musallam KM, Sheth S, Cappellini MD, Kattamis A, Kuo KHM, Taher AT. Luspatercept for transfusion-dependent β -thalassemia: time to get real. *Ther Adv Hematol*. (2023) 14:20406207231195594. doi: 10.1177/20406207231195594.
 97. Cappellini MD, Viprakasit V, Taher AT, Georgiev P, Kuo KHM, Coates T, Voskaridou E, Liew H-K, Pazgal-Kobrowski I, Forni GL, et al. A Phase 3 Trial of Luspatercept in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med*. (2020) 382: 1219–1231. doi: 10.1056/nejmoa1910182.
 98. Musallam KM, Taher AT, Kattamis A, Kuo KHM, Sheth S, Cappellini MD. Profile of Luspatercept in the Treatment of Anemia in Adults with Non-Transfusion-Dependent β -Thalassemia (NTDT): Design, Development and Potential Place in Therapy. *Drug Des Devel Ther*. (2023) 17:1583–1591. doi: 10.2147/DDDT.S368584.
 99. Khandros E, Kwiatkowski JL. Beta Thalassemia: Monitoring and New Treatment Approaches. *Hematol Oncol Clin North Am*. (2019) 33:339–353. doi: 10.1016/j.hoc.2019.01.003.
 100. Pilo F, Angelucci E. Mitapivat for sickle cell disease and thalassemia. *Drugs Today (Barc)*. (2023) 59:125–134. doi: 10.1358/dot.2023.59.3.3521880.

101. Christakopoulos GE, Telange R, Yen J, Weiss MJ. Gene Therapy and Gene Editing for β -Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* (2023) 37:433–447. doi: 10.1016/j.hoc.2022.12.012.
102. Long Z, Li H, Du Y, Han B. Congenital sideroblastic anemia: Advances in gene mutations and pathophysiology. *Gene.* (2018) 668:182–189. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.074.
103. Cox TC, Bottomley SS, Wiley JS, Bawden J, Matthews CS, May BK. X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a thr388-to-ser substitution in erythroid 5-aminolevulinic synthase. *N Engl J Med.* (1994). 330 :675-9. doi: 10.1056/NEJM199403103301004.
104. Fujiwara T, Harigae H. Molecular pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia. *Free Radic Biol Med.* (2019) 133:179–185. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.008.
105. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* (2005) 37 :1264-9. doi: 10.1038/ng1658.
106. Long Z, Li H, Du Y, Han B. Congenital sideroblastic anemia: Advances in gene mutations and pathophysiology. *Gene.* (2018) 668:182–189. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.074.
107. Fujiwara T, Harigae H. Pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia. *Pediatr Int.* (2013) 55: 675–679. doi: 10.1111/ped.12217.
108. Fleming MD. Congenital Sideroblastic Anemias: Iron and Heme Lost in Mitochondrial Translation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (2011) 2011:525-31. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.525.
109. Liu G, Guo S, Kang H, Zhang F, Hu Y, Wang L, Li M, Ru Y, Camaschella C, Han B, et al. Mutation spectrum in Chinese patients affected by congenital sideroblastic anemia and a search for a genotype-phenotype relationship. *Haematologica.* (2013) 98: e158-60. doi: 10.3324/haematol.2013.095513.
110. Cazzola M, Malcovati L. Diagnosis and treatment of sideroblastic anemias: from defective heme synthesis to abnormal RNA splicing. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (2015) 2015:19-25. doi: 10.1182/asheducation-2015.1.19.
111. Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, et al. Clinical and genetic characteristics of congenital

- sideroblastic anemia: Comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* (2013) 92:1–9. doi: 10.1007/s00277-012-1564-5.
112. Bottomley SS, Fleming MD. Sideroblastic anemia diagnosis and management. *Hematol Oncol Clin North Am.* (2014) 28: 653–670. doi: 10.1016/j.hoc.2014.04.008.
 113. Kannengiesser C, Sanchez M, Sweeney M, Hetet G, Kerr B, Moran E, Soler JLF, Maloum K, Matthes T, Oudot C, et al. Missense SLC25A38 variations play an important role in autosomal recessive inherited sideroblastic anemia. *Haematologica.* (2011) 96:808–813. doi: 10.3324/haematol.2010.039164.
 114. Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, Evans SC, Ferguson M, Kellogg MD, Lachance M, Matsuoka M, Nightingale M, Rideout A, et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet.* (2009) 41: 651–653. doi: 10.1038/ng.359.
 115. Leblanc MA, Bettle A, Berman JN, Price VE, Pambrun C, Yu Z, Tiller M, McMaster CR, Fernandez C V. Study of Glycine and Folic Acid Supplementation to Ameliorate Transfusion Dependence in Congenital SLC25A38 Mutated Sideroblastic Anemia. *Pediatr Blood Cancer.* (2016) 63: 1307–1309. doi: 10.1002/pbc.25981.
 116. Donker AE, Raymakers RAP, Vlasveld LT, Van Barneveld T, Terink R, Dors N, Brons PPT, Knoers NVAM, Swinkels DW. Practice guidelines for the diagnosis and management of microcytic anemias due to genetic disorders of iron metabolism or heme synthesis. *Blood.* (2014) 123:3873-86. doi: 10.1182/blood-2014-01.
 117. Grandchamp B, Hetet G, Kannengiesser C, Oudin C, Beaumont C, Rodrigues-Ferreira S, Amson R, Telerman A, Nielsen P, Kohne E, et al. A novel type of congenital hypochromic anemia associated with a nonsense mutation in the STEAP3/TSAP6 gene. *Blood.* (2011) 118:6660-6. doi: 10.1182/blood-2011-01.
 118. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. *Front Pharmacol.* (2014) 5:176. doi: 10.3389/fphar.2014.00176.
 119. Rouault TA, Maio N. Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J Biol Chem.* (2017) 292:12744–12753. doi: 10.1074/jbc.R117.789537.

120. Camaschella C. Hereditary Sideroblastic Anemias: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Semin Hematol.* (2009) 46:371–377. doi: 10.1053/j.seminhematol.2009.07.001.
121. Liu G, Guo S, Anderson GJ, Camaschella C, Han B, Nie G. Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient. *Blood.* (2014) 124:2750-1. doi: 10.1182/blood-2014-08-598508.
122. Furuyama K, Kaneko K. Iron metabolism in erythroid cells and patients with congenital sideroblastic anemia. *Int J Hematol.* (2018) 107:44–54. doi: 10.1007/s12185-017-2368-0.
123. Crooks DR, Ghosh MC, Haller RG, Tong W-H, Rouault TA. Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. *Blood.* (2010) 115:860-9. doi: 10.1182/blood-2009-09-243105.
124. Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM. Mutation of a Putative Mitochondrial Iron Transporter Gene (ABC7) in X-Linked Sideroblastic Anemia and Ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet.* (1999) 8:743–749. doi: 10.1093/HMG/8.5.743.
125. Bekri S, Kispal G, Lange H, Fitzsimons E, Tolmie J, Lill R, Bishop DF. Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood.* (2000) 96:3256–3264.
126. Pondarre C, Campagna DR, Antiochos B, Sikorski L, Mulhern H, Fleming MD. Abcb7, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis. *Blood.* (2007) 109:3567-9. doi: 10.1182/blood-2006-04-015768.
127. Shan Y, Cortopassi G. Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly. *Mitochondrion.* (2016) 26:94–103. doi: 10.1016/J.MITO.2015.12.005
128. Schmitz-Abe K, Ciesielski SJ, Schmidt PJ, Campagna DR, Rahimov F, Schilke BA, Cuijpers M, Rieneck K, Lausen B, Linenberger ML, et al. Congenital sideroblastic anemia due to mutations in the mitochondrial HSP70 homologue HSPA9. *Blood.* (2015) 126:2734-8. doi: 10.1182/blood-2015-09-659854.
129. Patton JR, Bykhovskaya Y, Mengesha E, Bertolotto C, Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA): Missense mutation

- in the pseudouridine synthase 1 (PUS1) gene is associated with the loss of tRNA pseudouridylation. *J Biol Chem.* (2005) 280:19823–19828. doi: 10.1074/jbc.M500216200.
130. Bykhovskaya Y, Casas K, Mengesha E, Inbal A, Fischel-Ghodsian N. Missense Mutation in Pseudouridine Synthase 1 (PUS1) Causes Mitochondrial Myopathy and Sideroblastic Anemia (MLASA). *Am J Hum Genet.* (2004) 74:1303-8. doi: 10.1086/421530.
 131. Riley LG, Menezes MJ, Rudinger-Thirion J, Duff R, De Lonlay P, Rotig A, Tchan MC, Davis M, Cooper ST, Christodoulou J. Phenotypic variability and identification of novel YARS2 mutations in YARS2 mitochondrial myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anaemia. *Orphanet J Rare Dis.* (2013) 8:193. doi: 10.1186/1750-1172-8-193.
 132. Riley LG, Rudinger-Thirion J, Schmitz-Abe K, Thorburn DR, Davis RL, Teo J, Arbuckle S, Cooper ST, Campagna DR, Frugier M, et al. LARS2 Variants Associated with Hydrops, Lactic Acidosis, Sideroblastic Anemia, and Multisystem Failure. *JIMD Rep.* (2016) 28:49-57. doi: 10.1007/8904_2015_515.
 133. Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, Walsh T, Lee MK, Malach D, Klevit RE, King MC, Levy-Lahad E. Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am J Hum Genet.* (2013) 92:614–620. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.03.007.
 134. Sasarman F, Thiffault I, Weraarpachai W, Salomon S, Maftai C, Gauthier J, Ellazam B, Webb N, Antonicka H, Janer A, et al. The 3' addition of CCA to mitochondrial tRNA^{Ser}(AGY) is specifically impaired in patients with mutations in the tRNA nucleotidyl transferase TRNT1. *Hum Mol Genet.* (2015) 24:2841–2847. doi: 10.1093/hmg/ddv044.
 135. Chakraborty PK, Schmitz-Abe K, Kennedy EK, Mamady H, Naas T, Durie D, Campagna DR, Lau A, Sendamarai AK, Wiseman DH, et al. Mutations in TRNT1 cause congenital sideroblastic anemia with immunodeficiency, fevers, and developmental delay (SIFD). *Blood.* (2014) 124:2867–2871. doi: 10.1182/BLOOD-2014-08-591370.
 136. DeLuca AP, Whitmore SS, Barnes J, Sharma TP, Westfall TA, Anthony Scott C, Weed MC, Wiley JS, Wiley LA, Johnston RM, et al. Hypomorphic mutations in

- TRNT1 cause retinitis pigmentosa with erythrocytic microcytosis. *Hum Mol Genet.* (2016) 25:44–56. doi: 10.1093/hmg/ddv446.
137. Barton C, Kausar S, Kerr D, Bitetti S, Wynn R. SIFD as a novel cause of severe fetal hydrops and neonatal anaemia with iron loading and marked extramedullary haemopoiesis. *J Clin Pathol.* (2018) 71:275–278. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204698.
138. Wedatilake Y, Niazi R, Fassone E, Powell CA, Pearce S, Plagnol V, Saldanha JW, Kleta R, Chong WK, Footitt E, et al. TRNT1 deficiency: Clinical, biochemical and molecular genetic features. *Orphanet J Rare Dis.* (2016) 11:90. doi: 10.1186/s13023-016-0477-0.
139. Wiseman DH, May A, Jolles S, Connor P, Powell C, Heeney MM, Giardina PJ, Klaassen RJ, Chakraborty P, Geraghty MT, et al. A novel syndrome of congenital sideroblastic anemia, B-cell immunodeficiency, periodic fevers, and developmental delay (SIFD). *Blood.* (2013) 122:112–123. doi: 10.1182/blood-2012-08-439083.
140. Torraco A, Bianchi M, Verrigni D, Gelmetti V, Riley L, Niceta M, Martinelli D, Montanari A, Guo Y, Rizza T, et al. A novel mutation in NDUFB11 unveils a new clinical phenotype associated with lactic acidosis and sideroblastic anemia. *Clin Genet.* (2017) 91:441–447. doi: 10.1111/cge.12790.
141. Reinson K, Kovacs-Nagy R, Öiglane-Shlik E, Pajusalu S, Nõukas M, Wintjes LT, van den Brandt FCA, Brink M, Acker T, Ahting U, et al. Diverse phenotype in patients with complex I deficiency due to mutations in NDUFB11. *Eur J Med Genet.* (2019) 62:103572. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.11.006.
142. Wood MC, Tsiouris JA, Velinov M. Recurrent psychiatric manifestations in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome due to a novel mutation c.63-71 delACCGCTC in the gene SLC19A2. *Psychiatry Clin Neurosci.* (2014) 68:487. doi: 10.1111/pcn.12143.
143. Bergmann AK, Sahai I, Falcone JF, Fleming J, Bagg A, Borgna-Pignati C, Casey R, Fabris L, Hexner E, Mathews L, et al. Thiamine-responsive megaloblastic anemia: Identification of novel compound heterozygotes and mutation update. *J Pediatr.* (2009) 155: 888-892.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.06.017
144. Farruggia P, Di Marco F, Dufour C. Pearson syndrome. *Expert Rev Hematol.* (2018) 11:239–246. doi: 10.1080/17474086.2018.1426454.

145. Yoshimi A, Ishikawa K, Niemeyer C, Grünert SC. Pearson syndrome: a multisystem mitochondrial disease with bone marrow failure. *Orphanet J Rare Dis.* (2022) 17: 379. doi: 10.1186/s13023-022-02538-9.
146. Smith RD, Malley JD, Schechter AN. Quantitative analysis of globin gene induction in single human erythroleukemic cells. *Nucleic Acids Res.* (2000). 28:4998-5004. doi: 10.1093/nar/28.24.4998.
147. Sester DP, Thygesen SJ, Sagulenko V, Vajjhala PR, Cridland JA, Vitak N, Chen KW, Osborne GW, Schroder K, Stacey KJ. A novel flow cytometric method to assess inflammasome formation. *J Immunol.* (2015) 194:455-62. doi: 10.4049/jimmunol.1401110.
148. Hurtado-Navarro L, Baroja-Mazo A, Martínez-Banaclocha H, Pelegrín P. Assessment of ASC Oligomerization by Flow Cytometry. *Methods Mol Biol.* (2022) 2459:1–9. doi: 10.1007/978-1-0716-2144-8_1.
149. Núñez-Jurado D, Payán-Pernía S, Álvarez-Ríos AI, Jiménez-Jambrina M, Concepcion Pérez-De-Soto I, José Palma-Vallellano A, Zapata-Bautista R, Carlos Hernández-Castellet J, Paz Garrastazul-Sánchez M, Arqueros-Martínez V, et al. Neonatal Screening for Sickle Cell Disease in Western Andalusia: Results and Lessons Learnt after 3 Years of Implementation. *Am J Perinatol.* (2024) 41:e893–e900. doi: 10.1055/s-0042-1759646.
150. Culliton BJ. Genetic Screening: NAS Recommends Proceeding with Caution. *Science.* (1975) 189:119–120. doi: 10.1126/science.11643273.
151. Wethers D, Pearson H, Gaston M. Newborn Screening for Sickle Cell Disease and Other Hemoglobinopathies. *Pediatrics.* (1989) 83:813–814. doi: 10.1542/peds.83.5.813.
152. Bardón Cancho EJ, García-Morín M, Beléndez C, Velasco P, Benítez D, Ruiz-Llobet A, Berrueco R, Argilés B, Cervera Á, Salinas JA, et al. Update of the Spanish registry of haemoglobinopathies in children and adults. *Med Clin (Barc).* (2020) 155:95–103. doi: 10.1016/j.medcli.2019.10.011.
153. Shafer FE, Lorey F, Cunningham GC, Klumpp C, Vichinsky E, Lubin B. Newborn Screening for Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* (1996) 18:36–41. doi: 10.1097/00043426-199602000-00007.
154. Panepinto JA, Magid D, Rewers MJ, Lane PA. Universal versus targeted screening of infants for sickle cell disease: A cost-effectiveness analysis. *J Pediatr.* (2000) 136:201–208. doi: 10.1016/S0022-3476(00)70102-8.

155. Robinson KS, Toh GA, Rozario P, Chua R, Bauernfried S, Sun Z, Firdaus MJ, Bayat S, Nadkarni R, Poh ZS, et al. ZAK α -driven ribotoxic stress response activates the human NLRP1 inflammasome. *Science*. (2022) 377:328–335. doi: 10.1126/science.abl6324.
156. Zhou JY, Sarkar MK, Okamura K, Harris JE, Gudjonsson JE, Fitzgerald KA. Activation of the NLRP1 inflammasome in human keratinocytes by the dsDNA mimetic poly(dA:dT). *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2023) 120:e2213777120. doi: 10.1073/pnas.2213777120.
157. Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*. (2015) 21:248–255. doi: 10.1038/nm.3806.
158. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Cruz Moura I, Zeuner A, Kirkegaard-Sørensen T, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. (2007) 445:102–105. doi: 10.1038/nature05378.
159. Moecking J, Laohamonthonkul P, Meşe K, Hagelueken G, Steiner A, Harapas CR, Sandow JJ, Graves JD, Masters SL, Geyer M. Inflammasome sensor NLRP1 disease variant M1184V promotes autoproteolysis and DPP9 complex formation by stabilizing the FIIND domain. *J Biol Chem*. (2022) 298:102645. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102645.
160. Moecking J, Laohamonthonkul P, Chalker K, White MJ, Harapas CR, Yu C-H, Davidson S, Hrovat-Schaale K, Hu D, Eng C, et al. NLRP1 variant M1184V decreases inflammasome activation in the context of DPP9 inhibition and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*. (2021) 147:2134–2145.e20. doi: 10.1016/j.jaci.2020.12.636.
161. Calabrese L, Fiocco Z, Mellett M, Aoki R, Rubegni P, French LE, Satoh TK. Role of the NLRP1 inflammasome in skin cancer and inflammatory skin diseases. *Br J Dermatol*. (2024) 190:305–315. doi: 10.1093/bjd/ljad421.
162. Abu-Zeinah G, DeSancho MT. Understanding Sideroblastic Anemia: An Overview of Genetics, Epidemiology, Pathophysiology and Current Therapeutic Options. *J Blood Med*. (2020) Volume 11:305–318. doi: 10.2147/JBM.S232644.
163. Da Costa L, O'Donohue M-F, van Dooijeweert B, Albrecht K, Unal S, Ramenghi U, Leblanc T, Dianzani I, Tamary H, Bartels M, et al. Molecular approaches to

- diagnose Diamond-Blackfan anemia: The EuroDBA experience. *Eur J Med Genet.* (2018) 61:664–673. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.10.017.
164. Pu F, Chen F, Zhang Z, Shi D, Zhong B, Lv X, Tucker AB, Fan J, Li AJ, Qin K, et al. Ferroptosis as a novel form of regulated cell death: Implications in the pathogenesis, oncometabolism and treatment of human cancer. *Genes Dis.* (2022) 9:347–357. doi: 10.1016/j.gendis.2020.11.019.
165. Park E, Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death Dis.* (2019) 10:822. doi: 10.1038/s41419-019-2064-5.
166. Li J, Cao F, Yin H, Huang Z, Lin Z, Mao N, Sun B, Wang G. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* (2020) 11:88. doi: 10.1038/s41419-020-2298-2.
167. Ramos S, Hartenian E, Santos JC, Walch P, Broz P. NINJ1 induces plasma membrane rupture and release of damage-associated molecular pattern molecules during ferroptosis. *EMBO J.* (2024) 43:1164–1186. doi: 10.1038/s44318-024-00055-y.
168. Zhong FL, Mamaï O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, Szeverényi I, Takeichi T, Balaji R, Lau A, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell.* (2016) 167:187-202.e17. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.001.
169. Dong XM, Zhao K, Zheng WW, Xu CW, Zhang MJ, Yin RH, Gao R, Tang L jun, Liu JF, Chen H, et al. EDAG mediates Hsp70 nuclear localization in erythroblasts and rescues dyserythropoiesis in myelodysplastic syndrome. *FASEB J.* (2020) 34:8416–8427. doi: 10.1096/fj.201902946R.
170. Noy-Lotan S, Dgany O, Marcoux N, Atkins A, Kupfer GM, Bosques L, Gottschalk C, Steinberg-Shemer O, Motro B, Tamary H. Cdan1 Is Essential for Primitive Erythropoiesis. *Front Physiol.* (2021) 12:685242. doi: 10.3389/fphys.2021.685242.
171. Dgany O, Avidan N, Delaunay J, Krasnov T, Shalmon L, Shalev H, Eidelitz-Markus T, Kapelushnik J, Cattani D, Pariente A, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type I is caused by mutations in codanin-1. *Am J Hum Genet.* (2002) 71:1467–74. doi: 10.1086/344781.
172. Grace RF, Glader B. Red Blood Cell Enzyme Disorders. *Pediatr Clin North Am.* (2018) 65:579–595. doi: 10.1016/j.pcl.2018.02.005.

173. Van Wijk R, Van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: Erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*. (2005) 106:4034–4042. doi: 10.1182/blood-2005-04-1622.
174. Alramadhani D, Aljahdali AS, Abdulmalik O, Pierce BD, Safo MK. Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Diseases: Pathophysiology and Drug Discovery Opportunities. *Int J Mol Sci*. (2022) 23: doi: 10.3390/ijms23137448.
175. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. (2010) 20:51–56. doi: 10.1016/j.gde.2009.10.009.
176. Yuditskaya S, Suffredini AF, Kato GJ. The proteome of sickle cell disease: Insights from exploratory proteomic profiling. *Expert Rev Proteomics*. (2010) 7:833–848. doi: 10.1586/epr.10.88.
177. Wang Y, Yen FS, Zhu XG, Timson RC, Weber R, Xing C, Liu Y, Allwein B, Luo H, Yeh HW, et al. SLC25A39 is necessary for mitochondrial glutathione import in mammalian cells. *Nature*. (2021) 599:136–140. doi: 10.1038/s41586-021-04025-w.
178. Aljurf M, Ma L, Angelucci E, Lucarelli G, Snyder LM, Kiefer CR, Yuan J, Schrier SL. Abnormal assembly of membrane proteins in erythroid progenitors of patients with beta-thalassemia major. *Blood*. (1996) 87:2049-56.
179. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. (1999) 401:489–93. doi: 10.1038/46809.
180. El Hoss S, Cochet S, Godard A, Yan H, Dussiot M, Frati G, Boutonnat-Faucher B, Laurance S, Renaud O, Joseph L, et al. Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease. *Haematologica*. (2021) 106:2707–2719. doi: 10.3324/haematol.2020.265462.
181. Zanette DL, Santiago RP, Leite IPR, Santana SS, da Guarda C, Maffili V V., Ferreira JRD, Adanho CSA, Yahouedehou SCMA, Menezes IL, et al. Differential gene expression analysis of sickle cell anemia in steady and crisis state. *Ann Hum Genet*. (2019) 83:310–317. doi: 10.1111/ahg.12290.
182. Cyrklaff M, Srismith S, Nyboer B, Burda K, Hoffmann A, Lasitschka F, Adjalley S, Bisseye C, Simpore J, Mueller AK, et al. Oxidative insult can induce malaria-protective trait of sickle and fetal erythrocytes. *Nat Commun*. (2016) 7: 13401. doi: 10.1038/ncomms13401.

183. Eaton WA, Bunn HF. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. *Blood*. (2017) 129:2719–2726. doi: 10.1182/blood-2017-02-765891.

SUMMARY

Congenital anemias are classified into two main groups: hemolytic anemias due to intrinsic alterations of the red blood cell and anemias due to bone marrow failure. The first group includes: membranopathies, enzymopathies and hemoglobinopathies, including sickle cell disease (SCD) and thalassemia syndromes; the second group includes congenital sideroblastic anemias (CSA) and congenital dyserythropoietic anemia.

These are diseases with multisystemic involvement and great phenotypic variety, in which patients with the same mutation can present from mild-moderate anemia to severe anemia with transfusion dependence from infancy. Despite a good knowledge of their etiology, there are many unknown factors associated with this clinical heterogeneity, and it is necessary to study these possible modulators of the disease further to better understand the gene signature of these patients. These are rare diseases, frequently underdiagnosed, which makes it difficult to study the true population incidence of these diseases.

In this work, we will attempt to further study SCD, ACS and thalassemia, trying to clarify some of the issues raised.

As mentioned, SCD is an autosomal recessive hemoglobinopathy, characterized by a chronic inflammatory state and repeated vaso-occlusive crises, presenting multiorgan damage and high infant mortality. Due to the need to establish early treatment and due to the increase of the endemic population in our country, newborn screening was established in 2016 in the Region of Murcia. In this study, we have tried to determine the incidence of SCD and to evaluate its benefit in the neonatal population of the Region of Murcia. In our region, the prevalence of SCD was similar to other regions of Spain except Madrid and Catalonia, with a greater migratory flow. All newborns with SCD early therapeutic care and all carrier couples received genetic counseling.

Within the group of bone marrow failure anemias, we find CSA as described. CSA encompasses a heterogeneous group of rare, hereditary hematopoietic disorders characterized by an accumulation of mitochondrial iron in erythroid precursors, leading to iron overload and ineffective erythropoiesis characteristic of this disease. Recently, it has been described in animal models that NLRP1 inhibition can have a significant impact on erythropoiesis. Thus, in this study, we have tried to characterize the possible involvement of the inflammasome in the pathophysiology of a patient with CSA due to mutation in the mitochondrial transporter SLC25A38. With this study, we have demonstrated, on the one hand, that inhibition of the inflammasome increases erythrocyte

formation in a patient with CSA due to mutation in the *SLC25A38* gene; and on the other hand, we have identified in this patient by NGS a variant of *NLRP1* that in combination with other factors such as ferroptosis could aggravate his clinical phenotype, thus providing significant data on the possible involvement of the inflammasome in CSA.

Despite their different etiologies, hemoglobinopathies (SCD and thalassemia syndromes) and CSA have a common pathophysiological origin in congenital alteration in erythropoiesis. To study them in depth, we have analyzed the transcriptome of ten patients with thalassemia syndromes, four patients with SCD, and one patient with CSA using the Quant 3' mRNA-Sequencing technique. Our results have shown a clearly differentiated expression between patients and healthy controls, revealing an increased expression in genes related to glycolytic and oxidative metabolism, membrane genes, and erythropoiesis in all the patients studied except the patient with CSA, who shows a unique gene expression pattern compared to the rest of the congenital anemias studied.

ANEXO I

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Sanchez-Villalobos M, Blanquer M, Moraleda JM, Salido EJ, Perez-Oliva AB. New Insights Into Pathophysiology of β -Thalassemia. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Apr 12;9:880752. doi: 10.3389/fmed.2022.880752.

Sánchez-Villalobos M, Campos Baños E, Juan Fita MJ, Egea Mellado JM, Gonzalez Gallego I, Beltrán Videla A, Berenguer Piqueras M, Bermúdez Cortés M, Moraleda Jiménez JM, Guillen Navarro E, Salido Fierrez E, Pérez-Oliva AB. A Newborn Screening Program for Sickle Cell Disease in Murcia (Spain). *Int J Neonatal Screen*. 2023 Oct 10;9(4):55. doi: 10.3390/ijns9040055.

Sanchez-Villalobos M, Campos Baños E, Martínez-Balsalobre E, Navarro-Ramirez V, Videla MAB, Pinilla M, Guillén-Navarro E, Salido-Fierrez E, Pérez-Oliva AB. Whole Blood Transcriptome Analysis in Congenital Anemia Patients. *Int J Mol Sci*. 2024 Oct 31;25(21):11706. doi: 10.3390/ijms252111706.

ANEXO II:
ESTANCIAS EN OTROS CENTROS DE INVESTIGACIÓN
DURANTE EL DOCTORADO

Centro: Complejo Hospitalario Universitario de Coímbra (CHUC). Laboratorio de ErItropatología

Ciudad: Coímbra, Portugal.

Persona responsable de la estancia: Celeste Bento

Duración de la estancia: del 15 de septiembre de 2024 al 15 de diciembre de 2024.