



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

Caracterización de los Síndromes Anémicos  
Hereditarios en un Periodo de 19 Años en el  
Área I de la Región de Murcia

**D<sup>a</sup> Mercedes Berenguer Piqueras**

2015





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

**TESIS DOCTORAL**

***CARACTERIZACIÓN DE LOS SÍNDROMES ANÉMICOS  
HEREDITARIOS EN UN PERIODO DE 19 AÑOS EN EL  
ÁREA I DE LA REGIÓN DE MURCIA.***

Doctorando: Mercedes Berenguer Piqueras

Director: Dr. José María Moraleda Jiménez.

Codirectores: Dr. Eduardo Salido Fierrez.

Dra. María Juliana Majado Martínez.



## **AGRADECIMIENTOS:**

Este trabajo no hubiera salido adelante sin cada una de estas personas, a las que quiero agradecer de forma especial el haber contribuido de un modo u otro a que esta tesis vea la luz:

A mis compañeros del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, con los que me he sentido como en casa desde el primer día y en especial a mis compañeros del Laboratorio, por su ayuda en estos últimos meses. A Alfonso Morales, de quien aprendí que la humildad es la base de la grandeza. A la Dra. Martínez, antigua responsable de la sección de eritropatología y que puso en marcha los estudios de anemia en este Hospital. A Julia Albaladejo, quien con tanto cariño ha realizado y custodiado los estudios de anemia durante todos estos años y con la que tengo la suerte de trabajar cada día. Al resto de personal del Laboratorio de Hematimetría y Coagulación, por cuidar de mi y por todo lo que me han enseñado, profesional y personalmente.

A mi amigo y colega Valentín, al que estaré eternamente agradecida por muchos motivos, pero sobre todo por su compañerismo y su fe en mí desde la época de residentes.

A mis directores, por el espíritu docente que tienen y por la inmensa paciencia que han tenido conmigo: el Dr. José María Moraleda, que me animó a empezar, me ha motivado durante todo este tiempo, y siempre ha encontrado un hueco para ayudarme; la Dra. Maruja Majado, que aceptó el difícil reto de dirigirme y me ha sabido marcar el tiempo, porque sin su constancia no lo hubiera conseguido; al Dr. Eduardo Salido, el alma de este trabajo, gran profesional y mejor persona, que me ha enseñado casi todo lo que sé y del que sigo aprendiendo cada día.

En la parte personal también debo agradecer a muchísima gente el que hoy pueda estar aquí, pero sobre todo a mi familia:

A Ginés y Cati, por el apoyo moral y logístico.

A mis padres, quienes han confiado en mí más que yo misma; sin ellos por supuesto no hubiera llegado hasta donde estoy hoy.

A mi marido Nico, la persona más optimista que conozco; porque ha sacrificado tanto o más que yo y me ha apoyado en los peores momentos sin quejarse nunca. Tengo la suerte de tener a mi lado a una persona que hace que todo haya sido más fácil.

Y por supuesto, a mis hijos, Paula y Nico, a los que dedico este trabajo y mi vida.



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.</b>	15
<b>1. BREVES REFERENCIAS HISTÓRICAS.</b>	17
<b>2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS.</b>	19
2.1. Membranopatías. Esferocitosis hereditaria.	20
2.2. Desórdenes de la hemoglobina.	21
2.2.1. Hemoglobinopatías en España	21
2.2.2. $\beta$ -Talasemia en España.	22
2.2.3. $\alpha$ -Talasemia en España.	24
2.2.4. Influencia de los movimientos migratorios.	27
2.2.5. Epidemiología molecular de las talasemias y su importancia.	27
2.2.5.1. Epidemiología molecular de la $\beta$ -talasemia.	27
2.2.5.2. Epidemiología molecular de la $\alpha$ -talasemia.	33
2.2.6. $\delta\beta$ -Talasemia en España.	36
<b>3. ENZIMOPATÍAS HEREDITARIAS.</b>	37
<b>4. ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS. CLASIFICACIÓN</b>	39
4.1. Anemias hereditarias por defectos en la hemoglobina	39
4.1.1. Hemoglobinopatías estructurales	40
4.1.1.1. Hemoglobinopatía S	40
4.1.1.2. Otras hemoglobinopatías con alteración en la carga superficial. Hemoglobinopatía C	42
4.1.1.3. Diagnóstico de las hemoglobinopatías	43
4.1.2. Talasemias	44
4.1.2.1. $\alpha$ -talasemia	45
4.1.2.2. $\beta$ -talasemia	51
4.1.2.3. $\delta\beta$ -talasemia y Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal	55
4.1.2.4. Diagnóstico de las talasemias	56
4.2. Anemias hereditarias por defectos en la membrana del hematíe: membranopatías	56
4.2.1. Esferocitosis hereditaria	57
4.2.2. Eliptocitosis hereditaria	60
4.3. Anemias hereditarias por defectos en las enzimas del metabolismo eritrocitario: eritroenzimopatías.	60
4.3.1. Déficit de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.	60
4.3.2. Déficit de piruvatokinasa.	62
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b>	63
<b>1. Hipótesis de trabajo.</b>	65
<b>2. Objetivos.</b>	65
<b>PACIENTES Y MÉTODOS</b>	67
<b>1. PACIENTES.</b>	69
1.1. Datos clínicos y demográficos	69
1.1.1. Metodología y bases de datos utilizadas para el estudio de los datos clínicos y demográficos	70
1.2. Datos analíticos.	74



1.3. Diagnósticos.	75
<b>2. MÉTODOS DE ESTUDIO/DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.</b>	<b>77</b>
2.1. Indicaciones para el despistaje de anemias hemolíticas hereditarias.	77
2.2. Protocolo de estudio de anemias en el HCUVA.	77
2.3. Descripción de las técnicas de estudio de anemia del laboratorio de Eritropatología del HCUVA.	84
2.3.1. Técnicas para el diagnóstico de membranopatías.	84
2.3.1.1. Lisis en glicerol.	84
2.3.1.2. Fragilidad osmótica o Resistencia globular eritrocitaria.	85
2.3.2. Técnicas para el diagnóstico de eritroenzimopatías.	86
2.3.2.1. Prueba de reducción del azul de metileno.	87
2.3.2.2. Determinación cuantitativa de los niveles de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.	88
2.3.2.3. Determinación cuantitativa de los niveles de la enzima piruvato kinasa.	88
2.3.3. Técnicas para el diagnóstico de talasemias y hemoglobinopatías.	88
2.3.3.1. Electroforesis en acetato de celulosa ph alcalino (ph 8.6).	89
2.3.3.2. Electroforesis en gel a ph ácido (ph 6.0).	89
2.3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	92
2.3.3.4. Electroforesis capilar (EC).	95
2.3.3.5. Estudio molecular de cadenas de globina.	98
<b>3. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.</b>	<b>108</b>
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	<b>109</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>111</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES. DIAGNÓSTICO POR GÉNERO, NACIONALIDAD Y ETNIA.</b>	<b>112</b>
1.1. Número y tipo de anemias hemolíticas hereditarias	112
1.2. Datos demográficos generales.	113
1.3. Motivo de estudio.	115
1.4. Etnia	115
1.5. Procedencia (Área de Salud)	117
<b>2. ERITROENZIMOPATÍAS.</b>	<b>120</b>
2.1. Anemia hemolítica por déficit de piruvatokinasa eritrocitaria.	120
2.1.1. Distribución por año de diagnóstico.	120
2.2. Anemia hemolítica por déficit de G6PDH	121
2.2.1. Distribución por año de diagnóstico.	123
<b>3. MEMBRANOPATÍAS: ESFEROCITOSIS HEREDITARIA.</b>	<b>124</b>
3.1. Distribución por año de diagnóstico.	127
<b>4. TALASEMIAS.</b>	<b>127</b>
4.1. $\alpha$ -Talasemia.	127
4.1.1. Datos analíticos generales.	129
4.1.2. Distribución por año de diagnóstico.	132
4.2. $\beta$ -Talasemia.	133
4.2.1. Datos analíticos generales.	135

4.2.2. Distribución por año de diagnóstico.	137
4.3. $\delta\beta$ -Talasemia.	137
4.3.1. Datos analíticos generales.	139
4.3.2. Distribución por año de diagnóstico.	140
4.4. PHHF.	141
4.4.1. Datos analíticos generales.	142
4.4.2. Por año diagnóstico.	143
4.5. Alteraciones moleculares en las cadenas de globina.	143
4.5.1. Alteraciones moleculares de las cadenas $\alpha$ -globina.	143
4.5.2. Alteraciones moleculares de las cadenas $\beta$ -globina.	146
<b>5. HEMOGLOBINOPATÍAS</b>	<b>147</b>
5.1. Datos demográficos.	147
5.2. Motivos de estudio.	151
5.3. Distribución por año de diagnóstico.	151
5.4. Hemoglobinopatía S.	152
5.5. Hemoglobinopatía C.	155
5.6. Otras hemoglobinopatías menos frecuentes.	156
<b>6. ESTUDIOS DE INCIDENCIA</b>	<b>159</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>165</b>
<b>1. OBJETIVO PRINCIPAL: ANÁLISIS DEL PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ANEMIA HEMOLÍTICA HEREDITARIA EN LA REGIÓN DE MURCIA</b>	<b>167</b>
1.1. Eritroenzimopatías: perfil epidemiológico y biológico.	169
1.1.1. Déficit de Piruvatokinasa eritrocitaria.	169
1.1.2. Déficit de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.	171
1.2. Membranopatías: perfil epidemiológico y biológico.	173
1.2.1. Esferocitosis Hereditaria.	173
1.3. Talasemias: perfil epidemiológico y biológico.	175
1.3.1. $\alpha$ -talasemia	175
1.3.2. $\beta$ -talasemia y $\delta\beta$ -talasemia.	177
1.3.3. Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal.	180
1.4. Hemoglobinopatías estructurales: perfil epidemiológico y biológico.	180
1.4.1. Hemoglobinopatía S y Hemoglobinopatía C.	180
1.4.2. Otras hemoglobinopatías menos frecuentes.	184
<b>2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.</b>	<b>185</b>
2.1. Descripción de las alteraciones moleculares en las talasemias en la Región de Murcia	185
2.1.1. Alteraciones moleculares en las $\alpha$ -talasemias	185
2.1.2. Alteraciones moleculares en las $\beta$ -talasemias.	187
2.2. Establecer la necesidad de un programa de cribado de anemias hemolíticas hereditarias en nuestra Región. Influencia de los movimientos migratorios.	189
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>191</b>





## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

---

ADE: Ancho de distribución eritrocitaria  
AF: Anemia Falciforme  
AHH: Anemia hemolítica hereditaria  
ATP: Adenosín trifosfato  
CAR: Conjunto Articulado de Reglas de decisión  
CT: Transferrina  
DE: Desviación estándar  
EC: Electroforesis capilar  
EC: Eliptocitosis congénita  
EF: Electroforesis  
EH: Esferocitosis Hereditaria  
ESH: Estomatocitosis hereditaria  
Fe: Hierro  
FO: Fragilidad osmótica  
FOE: Fragilidad osmótica eritrocitaria  
FOI: Fragilidad osmótica eritrocitaria incubada  
FON: Fragilidad osmótica normal  
Ftna: Ferritina  
G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa  
GEBTA: Grupo de Estudio de Hemoglobinopatías y Talasemias  
Hb: Hemoglobina  
HbAS: Hemoglobinopatía S heterocigota  
HbSS: Hemoglobinopatía S homocigota  
HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca  
HPLC: High performance Liquid chromatography  
Hto: Hematocrito

IST: Índice de saturación de la transferrina  
mg/dl: Miligramo por decilitro  
ml: Mililitros  
NADPH: Nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido  
ng: Nanogramo  
NHC: número de historia clínica  
nm: Nanometros  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PEP: Fosfoenol piruvato  
PHHF: Persistencia hereditaria de Hemoglobina Fetal  
PK: Piruvato kinasa  
RGO: Resistencia globular eritrocitaria  
SIL: Sistema informatizado de Laboratorio  
SMF: Sistema mononuclear fagocítico  
SSF: Suero salino fisiológico al 0.9%  
TCD: Test de Coombs directo  
VN: Valores normales  
VPP: Vía de las pentosas fosfato





## **INTRODUCCIÓN**



## 1.- BREVES REFERENCIAS HISTÓRICAS.

---

La primera descripción escrita de lo que pudo ser una anemia hemolítica fue realizada por *Claudio Galeno* en el año 150 a.C. quien describió una anemia hemolítica secundaria por mordedura de víbora en un esclavo cazador de serpientes. La comprensión de Galeno de la fisiología era tal que implicó al bazo en el proceso de la decoloración súbita de la piel. Posteriormente los primeros casos de anemia hemolítica descritos fueron los de la hemoglobinuria paroxística al frío, observados por *Johannis Actuarius* en Constantinopla, al final del siglo XIII, quien dio cuenta del paso de orina oscura después de la exposición a clima gélido. A pesar del interés por la sangre, la primera observación de los eritrocitos probablemente no fue hecha hasta 1661 por *Malpighi*, 10 años después de la aparición del microscopio. Pero es *Van Leeuwenhoek* quien una década después realizó una descripción detallada de los glóbulos rojos humanos, estableciendo su tamaño en aproximadamente 1/3.000 de una pulgada mediante la comparación de un eritrocito con un grano de arena de tamaño conocido. *John Huxham*, en 1770, describió cambios morfológicos en eritrocitos degenerados y atribuyó a esas células la aparición de hemoglobina en orina. En 1843, *Andral* describió el estado de anemia sin haber mediado pérdida visible de sangre [1].

El concepto de la destrucción prematura de eritrocitos como un proceso patológico fue sugerido por primera vez en 1871 por *Vanlair y Masius*, describiendo una paciente con ictericia y marcada esplenomegalia, sin hepatomegalia, que presentaba ataques recurrentes de dolor agudo en abdomen superior. La madre y la hermana presentaban sintomatología similar. Si bien los autores no mencionaron la anemia ni plantearon el concepto de hemólisis como un proceso patológico, el valor de esta publicación residió en la descripción de la presencia de pequeños glóbulos rojos esféricos que denominaron microcitos. Fue la primera descripción importante de una esferocitosis hereditaria [1].

*Hayem* en 1898 y *Minkowski* en 1900 mostraron por primera vez que la ictericia asociada a la anemia hemolítica era diferente a la secundaria a procesos hepáticos. *Hayem* no la describió como anemia hemolítica sino como “ictericia esplenomegálica infecciosa crónica”. Fue *Minkowski* quien asoció la anemia con la urobilinuria y la esplenomegalia, postulando que la destrucción de los eritrocitos era atribuible a lesiones en el bazo. De esta manera, es a *Minkowski* a quien se le atribuye el haber reconocido la ictericia como un proceso asociado a la

anemia hemolítica. En la primera década del siglo XX, *Chauffard* describió la prueba de fragilidad osmótica que le permitió observar que los eritrocitos de pacientes con ictericia congénita hemolizaban en soluciones salinas hipotónicas mientras que los eritrocitos de individuos normales no lo hacían. Las observaciones de ambos autores llevaron a que posteriormente, y durante muchos años, la Esferocitosis Hereditaria fuera denominada como enfermedad de “Minkowski-Chauffard” [1].

Entre 1908 y 1912, *Widal, Abrami y Brule* introdujeron el término anemia hemolítica adquirida. Estos investigadores describieron la ictericia hemolítica no congénita ni familiar, que podía aparecer gradual o abruptamente durante el curso de varias enfermedades o bien no asociada a ninguna enfermedad subyacente, casos que eran similares a los descritos por Hayem 10 años antes. Los pacientes presentaban reticulocitosis, pero la alteración de la prueba de fragilidad era menos marcada que la obtenida en las formas congénitas. De esta manera quedaron definidas dos tipos de anemias hemolíticas: las congénitas de Minkowski y Chauffard y las adquiridas de Hayem y Widal. La ictericia familiar con anemia moderada con presencia de pequeños esferocitos fue la primera de esta forma reconocida por primera vez a finales del siglo XIX. Dacie [2] revisó en detalle este desorden y su patrón de herencia. En 1925, Cooley y Lee [3] describieron una forma severa de anemia que ocurría en edades tempranas de la vida asociada a esplenomegalia y trastornos óseos. Posteriormente, la descripción de múltiples casos similares permitió conocer el patrón hereditario de esta anemia y su denominación como “talasemia-mediterránea”.

Hasta 1940 el hematíe fue considerado como una célula inerte cuya función era simplemente contener hemoglobina. Sin embargo, posteriores estudios bioquímicos demostraron que el hematíe era una célula dinámica y que requería un metabolismo energético para mantener un equilibrio. En 1956, *Carson et al*, [4] demostraron que los hematíes de ciertos pacientes desarrollaban hemólisis cuando recibían primaquina y que estos hematíes eran deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Este descubrimiento dio lugar a una mejor comprensión de las rutas metabólicas del hematíe y al hallazgo de otras deficiencias enzimáticas.

## 2.- EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS.

---

La epidemiología de la anemia hemolítica congénita es bastante desconocida. El escaso interés que plantea este tipo de anemia desde el punto de vista de salud pública ha hecho que los registros epidemiológicos que existen en nuestro medio sean escasos, y sólo disponemos de datos de publicaciones aisladas en determinadas regiones o en determinadas áreas de salud de una Comunidad Autónoma. En la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia no existen registros epidemiológicos ni actualmente se ha implantado un programa de screening neonatal como en otras comunidades, a pesar de los esfuerzos del Servicio de Hematología y la Unidad de Genética. Dentro del mundo de las anemias hemolíticas hereditarias, la epidemiología mejor conocida es la de las talasemias y hemoglobinopatías, que es la que mayor interés clínico ha suscitado debido a los movimientos migratorios y al desarrollo de los programas de *screening* neonatal dirigidos a la detección precoz de los niños con drepanocitosis.

El portal *ITHANET* (<http://www.ithanet.eu>) alberga una de las bases de datos más grandes con las mutaciones más recientes en talasemias y hemoglobinopatías, ofreciendo información de forma flexible sobre la frecuencia y distribución de las mutaciones descritas por áreas geográficas, sobre la relación genotipo-fenotipo, convirtiéndose así en una referencia imprescindible para los clínicos e investigadores. El portal *Globin Gene Server* (<http://globin.cse.psu.edu>) proporciona información y herramientas para el estudio de la función de secuencias de ADN, con énfasis en las que participan en la producción de hemoglobina. Incluye información sobre mutaciones humanas de hemoglobina y sus efectos, los datos experimentales relacionados con la regulación de la agrupación de genes de globina similares, y herramientas de software para la comparación de secuencias entre sí para descubrir las regiones que pueden jugar un papel, pero no ofrece información desde el punto de vista epidemiológico.

La Red ENERCA (Red Europea de Anemias Raras y congénitas) se inició en el 2002 con el propósito de ofrecer un mejor servicio de salud pública a los médicos profesionales y los pacientes en todos los aspectos de las anemias raras a través de esta plataforma electrónica (<http://www.enerca.org>). En estos momentos uno de los propósitos es llevar a cabo actividades de colaboración para crear un registro europeo único para las anemias raras. La red ENERCA incluye información de talasemias menor (rasgos o portador), talasemias intermedia y mayor,

hemoglobinopatías, anemia falciforme, anemias hereditarias por defectos enzimáticos del hematíe y anemias hereditarias por defectos de membrana del hematíe.

### **2.1.- MEMBRANOPATÍAS. ESFEROCITOSIS HEREDITARIAS. OTRAS MEMBRANOPATÍAS**

La esferocitosis hereditaria (EH) es la anemia hemolítica congénita más frecuente en nuestro medio y en general en el mundo. La herencia es autosómica dominante en el 75% de los casos; en el 25% restante el patrón es recesivo o son casos esporádicos (*de novo*) [5]. Si bien se presenta en todos los grupos étnicos y raciales, es particularmente frecuente en la raza blanca. En la población del norte de Europa se tiene una incidencia reconocida de 1 en 3000 nacimientos [6]. En Estados Unidos se ha descrito que afecta a 1 de cada 2.500 personas [7] y, aunque no hay estimaciones fiables en otras poblaciones, parece que su frecuencia es especialmente baja en africanos y en poblaciones del sudeste asiático [8]. En nuestro país tampoco existen estimaciones de prevalencia, pero constituye la anemia hereditaria más frecuentemente observada en nuestro medio y en el litoral mediterráneo, después de la beta-talasemia heterocigota, con una incidencia de 1 cada 2000 nacimientos [9]. Sin embargo, dada la frecuencia de formas muy leves de enfermedad que sólo se pueden detectar a través de pruebas de laboratorio muy sensibles, se estima que esta prevalencia probablemente sea 4 a 5 veces mayor [10,11].

En cuanto a la incidencia por sexos, no parece haber diferencias aunque en algunas publicaciones y textos clásicos hacen referencia a un ligero aumento de la prevalencia en el sexo masculino [6,12]. En cuanto a la edad del diagnóstico, a pesar de ser una anemia congénita, no siempre es diagnosticada en la infancia ya que depende mucho del grado de severidad de la anemia y del cuadro hemolítico; además, cada vez con más frecuencia el diagnóstico se realiza a través de un estudio familiar. Sin embargo, aunque no es frecuente, no conviene olvidar la EH como causa de ictericia neonatal habiendo incluso descritos algunos cuadros de *kernicterus* [12]. De hecho, como la mayoría de las personas afectas de esferocitosis experimentan ictericia neonatal, el estudio de Saada V et al [13] resulta interesante al detectar, de entre una población de 402 neonatos nacidos con ictericia severa, que el 1% se debía a EH, es decir, con una incidencia de al menos 30 veces la de la población general.

La eliptocitosis hereditaria es otra entidad que engloba diversos trastornos que se caracterizan por la presencia de eliptocitos en la sangre periférica y otras alteraciones. La

incidencia estimada es de 1 de cada 2000 a 1 de cada 4000 individuos y la incidencia en España se desconoce [14].

## 2.2.- DESÓRDENES DE LA HEMOGLOBINA.

Las alteraciones de la hemoglobina son las alteraciones monogénicas mas comunes en los humanos [15]. Este tipo de desordenes incluyen las hemoglobinopatías estructurales (alteraciones cualitativas de la hemoglobina), cuyo máximo exponente es la anemia falciforme (AF), y las talasemias (alteraciones cuantitativas de la hemoglobina). Ambas muestran un patrón de herencia autosómico recesivo y los portadores son asintomáticos salvo situaciones excepcionales.

### 2.2.1.- HEMOGLOBINOPATÍAS EN ESPAÑA.

Existen formas de distinta severidad de AF, la más frecuente es la debida al estado homocigoto SS mientras que el estado heterocigoto es asintomático (portador) salvo situaciones excepcionales. Existen formas intermedias (dobles heterocigotos) con beta talasemia (S $\beta$ -talasemia) u otras hemoglobinopatías (SC, SD, etc.), que muestran un patrón de enfermedad más leve que el estado homocigoto [15,16] .

La frecuencia de AF varía en función de diversos grupos étnicos. El hecho de que los portadores del rasgo falciforme tengan cierta protección frente a la infección por malaria ha hecho que esta hemoglobinopatía se circunscriba a determinados zonas endémicas que incluyen el área mediterránea, norte de África, Oriente Medio, India, sudeste de Asia y sur de China [15] . Sin embargo, debido a los movimientos migratorios, la distribución tanto de las talasemias como de las hemoglobinopatías está cambiando. Un estudio sobre la prevalencia en Europa nos ofrece frecuencias comparables de hemoglobinopatías en toda Europa, con la AF más frecuente en los países del Norte y de Europa occidental [17]. Basándonos en resultados de los programas de *screening* neonatal llevados a cabo en Europa, se ha confirmado que la prevalencia de la AF es alta el regiones septentrionales y occidentales [15,16]. Asimismo, se ha detectado una alta prevalencia en diversos programas de *screening* neonatal realizados en España [18-20]. En los últimos 15 años hemos asistido a un incremento de los flujos migratorios desde África subsahariana y regiones del Magreb hacia Europa. Esto explica los datos obtenidos en los distintos programas de *screening* realizados en Europa (**tabla 1**).

**Tabla 1. Comparativa de los diferentes programas de screening neonatal en Europa**

Pais	N	Periodo	AF ( <sup>0</sup> / <sub>100</sub> )	β-tal. Mayor ( <sup>0</sup> / <sub>100</sub> )	Hb AX ( <sup>0</sup> / <sub>100</sub> )	Referencias
Bélgica (Lieja)	191783	1994-2007	0,64	0,025	17,2	[21]
Reino Unido	195617	2005-2007	0,54	NA	14,5	[22]
Francia	262287	1996-2007	1,48	NA	24,5	[23]
Holanda	180000	2007	0,30	0,044	NA	[17]
España	190238	2003-2005	0,16	NA	5,6	[18-20]

En cuanto a las talasemias, típicamente son endémicas de los países mediterráneos, alcanzando zonas de alta prevalencia como en Chipre donde el 15% de la población es portadora [15,16,24].

### 2.2.2.- β- TALASEMIA EN ESPAÑA.

Las talasemias son desórdenes caracterizados por la disminución de la síntesis de las cadenas globínicas y su clínica está en relación con el grado de disminución de dichas cadenas [15].

Las talasemias se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo. La mayor prevalencia se encuentra en las regiones endémicas para la malaria: área mediterránea, Oriente medio, Norte de África, India, Sudeste asiático y sur de China. Dentro de Europa también se observa una distribución muy heterogénea, variando desde un 0.7% en Francia hasta un 18% en Chipre[16]. En España la frecuencia de β-talasemia, aunque alta (del 0,1 al 2%) es muy inferior a la de otros países mediterráneos [25,26] y tiene una distribución muy heterogénea entre las diferentes regiones, con frecuencias mayores en la comunidad gitana (5,6%) y la isla de Menorca (3,8%) [27]. Así, en un estudio efectuado en 1986 por el Grupo de Estudio de Hemoglobinopatías y Talasemias (GEHBTA) en 25.000 individuos de diferentes regiones de España, se detectó una gran heterogeneidad en la tasa de prevalencia de esta enfermedad, que oscila desde su ausencia en población vasca hasta el 5% detectado en la isla de Menorca [25]. Este estudio pone de manifiesto que la β-talasemia no sólo se restringe al área mediterránea, sino que, como observarán posteriormente Calero et al [28], su incidencia está relacionada con otras regiones con alta frecuencia de malaria, como es el caso de las provincias de Huelva, Cáceres y Badajoz. También está vinculada con movimientos étnicos que explican que se extienda a las zonas de la península que estuvieron ocupadas por los árabes durante la época de dominación musulmana (siglos VIII-XV)[24].



Existen algunos estudios limitados a áreas concretas de la península Ibérica. En el estudio de Malcorra et al [29], llevado a cabo en 250 individuos adultos sanos de las Islas Canarias, se identifica en la población hindú de origen *Shindi* la mayor tasa de prevalencia de  $\beta$ -talasemia con un 10,5%. En el estudio publicado por Oliva et al [27] en 1998, realizado en un periodo de 10 años sobre la población escolar de Menorca, refiere una prevalencia de  $\beta$ -talasemia del 2,67%. Esta es la mayor tasa descrita hasta el momento en la población española, y podría explicarse por la endogamia ocasionada por los escasos movimientos poblacionales en dicha de isla. Otros estudios, como el de Martín Núñez et al [30] sobre una población de 2.818 escolares de la región del norte de Extremadura, observan una prevalencia de  $\beta$ -talasemia del 0,53%; en el de Benito et al [31], realizado en 5.780 mujeres embarazadas de diferentes hospitales de la provincia de Huelva, la prevalencia es del 0,81% (47 casos de  $\beta$ -talasemia). El estudio de *screening* de De las Heras Flores et al [32], realizado durante un año sobre la población de referencia 481.061 en el área Sur de Tenerife, detectó 198 hemoglobinopatías que fueron las siguientes: 71  $\beta$ -talasemias minor, 2  $\beta$ -talasemias intermedias, 70 HbS en estado heterocigoto (HbA/S), 2 HbS en estado homocigoto (HbS/S), 1 doble heterocigoto  $\beta$ -talasemia/HbS, 30 HbD en estado heterocigoto (HbA/D), 18 HbC en estado heterocigoto (HbA/C), 2 HbG en estado heterocigoto (HbA/G), 1 HbE en estado heterocigoto (HbA/E) y 1 HbJ Birmingham en estado heterocigoto (HbA/J). En este estudio se investigó la importancia de la población inmigrante en los resultados: globalmente, 121 pacientes eran nacidos en Canarias (61,1%) y 9 en otras comunidades (4,5%), 7 en el resto de Europa (3,5%), 15 en África (7,5%), 30 en América (15%), 15 en Asia (7,5%) y en 1 caso no se pudo conocer el origen (0,5%). Los países de nacimiento más frecuentes después de España (65,6%) fueron: India (6,6%), Venezuela (5,5%), Colombia (4,5%) y Senegal (3%).

Estos movimientos migratorios pueden explicar las hemoglobinopatías encontradas en población extranjera, sin embargo la mayoría de hemoglobinopatías diagnosticadas en este estudio fueron en pacientes originarios de la comunidad Canaria, lo que difiere de lo publicado en otras áreas de España en lo que a hemoglobinopatías estructurales se refiere, como en la evaluación del cribado neonatal de la Comunidad de Madrid en 2006 [33], como en el estudio en gestantes Lanzarote en 2006 [34] y en el estudio piloto de cribado neonatal de Cataluña de 2005 [35], se ha encontrado que la mayoría de hemoglobinopatías diagnosticadas ha sido en población inmigrante, originaria de países en vías de desarrollo. Por lo tanto, en cuanto a  $\beta$ -talasemias se refiere, aunque tan sólo existe un estudio global que abarque a todo el país [25], existen estudios efectuados en diferentes áreas geográficas que vienen a demostrar una prevalencia promedio del 0,4%, lo cual supone un paciente  $\beta$ -talasémico por cada 250

habitantes. Esta prevalencia es menor a la detectada en otros países de la cuenca mediterránea [24], que presentan prevalencias superiores al 2% y llegan a tener valores máximos en las islas de Cerdeña, Chipre y Grecia, con un 13, un 18 y un 14,3%, respectivamente. Al igual que ocurre con las hemoglobinopatías estructurales, no hemos encontrado estudios de prevalencia de las talasemias en la Región de Murcia.

### 2.2.3.- $\alpha$ -TALASEMIA EN ESPAÑA.

La escasa repercusión clínica y hematológica de ciertos tipos moleculares de  $\alpha$ -talasemia dificulta el conocimiento de la prevalencia real de este tipo de talasemia mediante análisis hematológicos convencionales [36]. La  $\alpha$ -talasemia posee una distribución geográfica característica debido a la protección que ejercen las formas heterocigotas frente al paludismo. Ello hace que tenga una elevada prevalencia en áreas subtropicales de África y Asia y en las regiones mediterráneas. Las variantes comunes de  $\alpha^0$  talasemia, predominantemente la mutación --SEA en el sudeste asiático y la mutación --MED en el Mediterráneo, han llegado a frecuencias de aproximadamente el 5%. Aunque hay por lo menos siete formas de delección de  $\alpha^+$  talasemia, como se muestra en la **Figura 1**, las variantes - $\alpha$ 3.7 son los más comunes. Se han publicado frecuencias del 70% y hasta un 90% han sido reportados en Malasia y en partes de Nepal, respectivamente [36,37].

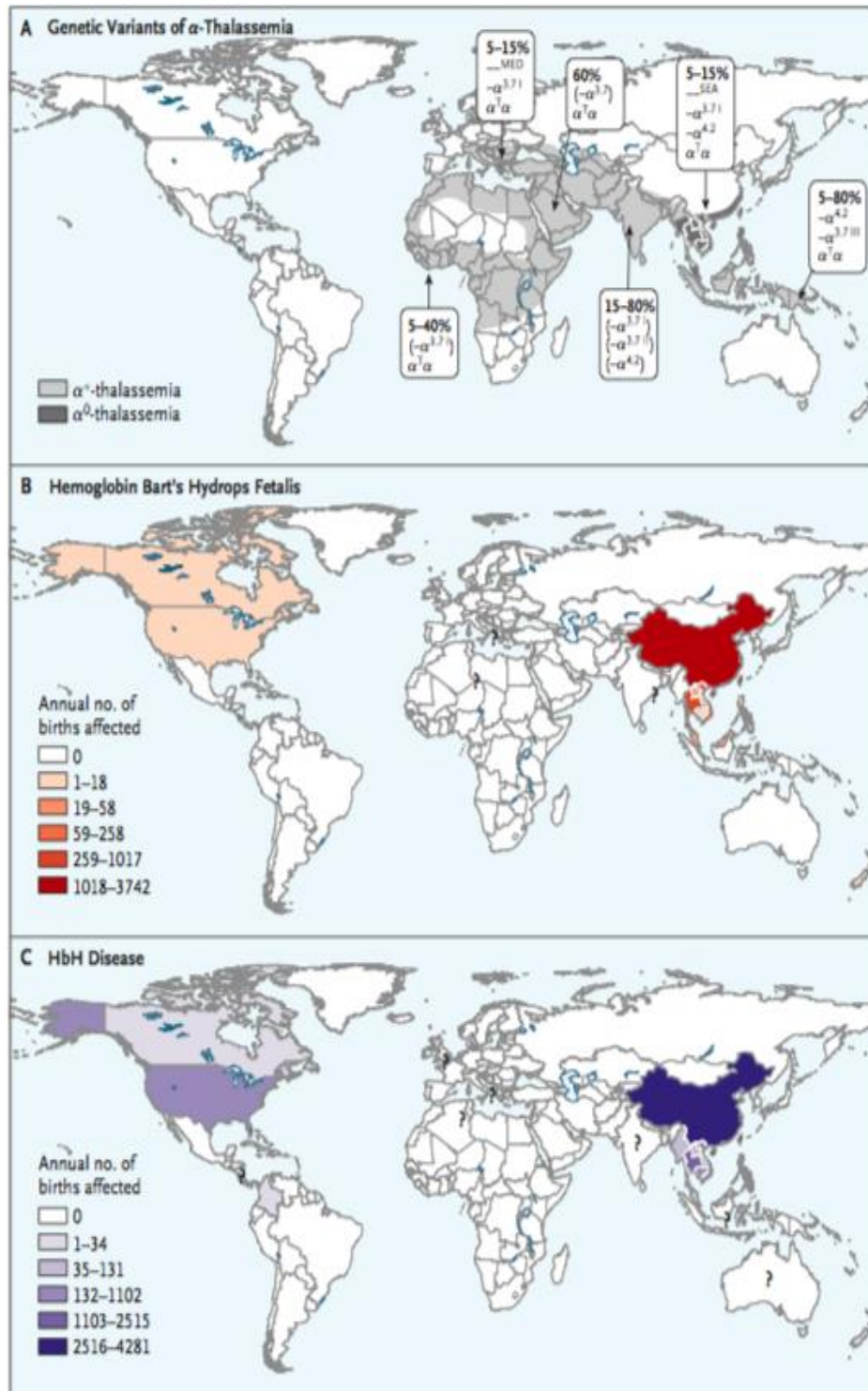


Figura 1. Distribución mundial de  $\alpha$ -talasemia. Adaptado de Piel FB et al [37].

Los estudios realizados en España para detectar la presencia de hemoglobina de Bart en más de 2.000 muestras de sangre de cordón umbilical muestran una prevalencia de  $\alpha$ -talasemia inferior al 0,5% [38]. Sin embargo, cuando se aplican los métodos moleculares en el ADN de sangre de cordón umbilical de recién nacidos, se observa una prevalencia de alelos  $\alpha$ -talasémicos superior a la descrita con métodos hematológicos, que oscila entre el 1,25 y el 2,2% [36, 37]. En el estudio de De las Nieves et al [36] realizado sobre 100 recién nacidos en Granada, detectan 3 alelos  $\alpha$ -talasémicos con la delección  $-\alpha 3.7$ , lo que supone una prevalencia del 1,5%. Villegas et al [37] encuentran 9 alelos con la delección  $-\alpha 3.7$  y un alelo con la delección — MED entre 400 muestras analizadas, lo que arroja una prevalencia de  $\alpha$ -talasemia del 1,25%. En un estudio posterior de esta misma autora [39] realizado en 1995 sobre 760 recién nacidos de la comunidad de Madrid, encontraba 24 alelos con la delección  $-\alpha 3.7$ , dos con la delección  $-\alpha 4.2$  y 2 alelos con el genotipo  $\alpha^0$ , lo que supone una prevalencia de alteraciones moleculares de la  $\alpha$ -talasemia del 1,8%. Finalmente, Fei et al [40], estudiando muestras procedentes de diferentes países, encontraron 7 alelos  $\alpha$  con la delección  $-\alpha 3.7$  en 156 muestras procedentes de España, lo que arroja una prevalencia de alelos  $\alpha$ -talasémicos del 2,2% (**tabla 2**).

El estudio de Aristizabal et al [41], se analiza, en el contexto del programa de screening neonatal del País Vasco, el impacto de la  $\alpha$ -talasemia. Durante dos años, encontraron 107 pacientes con delecciones de genes  $\alpha$ -talasémicos, el 62% de un alelo y el 38% con dos alelos, con escasa o nula repercusión clínica, lo que permitió dar consejo genético, aunque resulta de dudosa rentabilidad un *screening* sólo de la  $\alpha$ -talasemia.

**Tabla 2. Prevalencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -talasemias en diversos países de la cuenca mediterránea**

PAIS	$\beta$ -talasemias (%) pacientes	$\alpha$ -talasemias (%) alelos
Grecia	14,3 [27]	-
Italia	2,4-2,7 [27]	2,5 [39]
Cerdeña	13 [27,28]	18 [40]
Francia	0,7-2,6 [27]	-
Túnez	4,5 [27]	-
Portugal	2,5 [27]	-
Turquía	2,1 [27]	2,2 [40]
Chipre	18 [28]	7 [40]
Sicilia	-	1,2 [40]
España	0,5-5 [23-34]	0,5-2,2 [35-37]

#### 2.2.4.- INFLUENCIA DE LOS MOVIMIENTOS MIGRATORIOS.

Los trastornos hemolíticos hereditarios están asociados con un efecto protector contra la malaria, que se traduce en un aumento de la prevalencia en áreas endémicas de malaria. Los flujos migratorios procedentes de estas zonas se han traducido en un marcado aumento en dichas anomalías en el sur de España en los últimos 15 años. Así, cuando se estudia a la población inmigrante, la tasa de prevalencia talasemias/hemoglobinopatías puede llegar a ser muy alta; en una población de 200 inmigrantes de origen africano estudiados en Canarias, el 13% tenían alguna de hemoglobinopatía estructural, el 7% tenían una  $\alpha$ -talasemia y el 1% tenían una  $\beta$ -talasemia [42]. Igualmente, en el estudio de Molina-Arrebola et al [43] llevado a cabo en el Sur de España entre los años 1997-2010, se detectaron 666 casos positivos en pacientes de origen extranjero y 308 en pacientes españoles nativos. Las talasemias resultaron el trastorno más frecuente entre la población local:  $\beta$ -talasemia menor 57,1%;  $\alpha$ -talasemia menor 18,2% y  $\delta\beta$ -talasemia heterocigota 7,8%. En las minorías étnicas, hay una gran variedad de hemoglobinopatías: heterocigotos Hb S, el 45%; heterocigotos Hb C, 15%;  $\beta$ -talasemia menor, el 13,7%;  $\alpha$ -talasemia el 10,2%; Hb SS en 14 pacientes, y Hb CC en 9 pacientes. De los pacientes nativos, en 14 se encontró que tenían Hb AS y 9 Hb AC. Estos datos nos dan una idea de la influencia de los flujos migratorios modernos, la necesidad de que cada Región conozca su epidemiología, la importancia de un mayor conocimiento de estos trastornos por todo el personal médico y los nuevos enfoques prácticos y análisis costo-eficacia del diagnóstico precoz o de los programas de *screening* locales.

#### 2.2.5.- EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS TALASEMIAS Y SU IMPORTANCIA.

##### 2.2.5.1. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA BETA-TALASEMIA.

La  $\beta$ -talasemia está ocasionada principalmente por mutaciones puntuales de las que, hasta el momento, se han descrito más de 200 diferentes (ver *Globin Gene Server*: <http://globin.cse.psu.edu>), si bien estudios poblacionales indican que tan sólo 20 de las mismas son las responsables de más del 80% de los alelos  $\beta$ -talasémicos [36,44]. Estas mutaciones presentan una distribución geográfica heterogénea relacionada con los grupos étnicos de sus pobladores, existiendo en cada área unas pocas mutaciones características, junto con un número variable de mutaciones menos frecuentes [45] (**figura 2**). La elevada incidencia de estos grupos de mutaciones en las áreas con una gran prevalencia de  $\beta$ -talasemia se podría explicar por la selección positiva producida por la malaria en dichas áreas. Por contra, en los países en los

que la malaria ha sido menos frecuente, se ha descrito una mayor diversidad de mutaciones debido a que la malaria no ha actuado ejerciendo dicha selección [45].

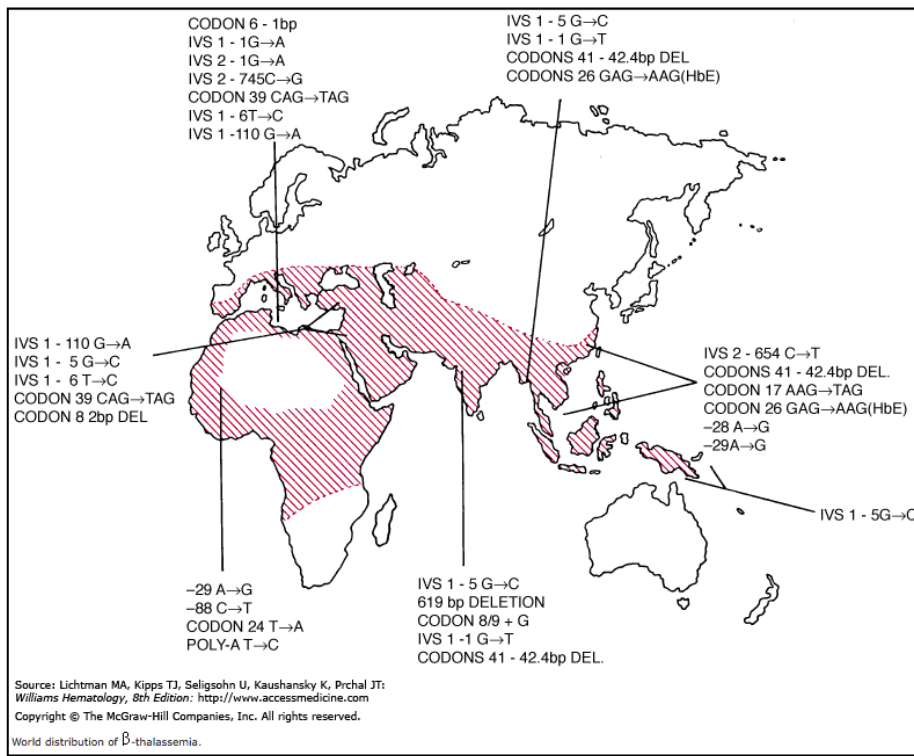


Figura 2. Distribución mundial de las principales alteraciones moleculares en la beta talasemia [36].

De las más de 400 alteraciones moleculares descritas actualmente causantes de  $\beta$ -talasemia, y teniendo en cuenta que no existen estudios epidemiológicos recientes en nuestro medio, son dos las más frecuentes [46]: la mutación IVS-I-110 (G→A), que aparece en el 40-60% de las  $\beta$ -talasemias de los países de la orilla oriental del Mediterráneo, y la mutación CD-39 (C→T), que se presenta en el 40% de las talasemias de los países de la ribera occidental, (tabla 3).

**Tabla 3. Distribución (%) de las principales mutaciones de  $\beta$ -talasemia en la cuenca mediterránea.**

País	Codón 39 (C>T)	IVS-I-1 (G>A)	IVS-I-6 (T>C)	IVS-I-110 (G>A)	IVS-II-1 (G>A)	Otras
España (tabla 3)	20-64	3-60	1,5-19,3	4,4-26,7	0	
Francia [49]	41,9	10,5	8,6	25,7	1	12,3
Italia [47]	40	10,5	9,8	23	-	16,7
Grecia [48]	17	13,2	7,2	42,5	-	20,1
Chipre [49]	1,5	11,7	8,7	69,9	8,5	8,2
Líbano [48]	4	-	-	60	-	32
Argelia [48,53]	25,6	17	16,3	26,7	-	13,5
Túnez [49,53]	19	1,5	10,5	7,5	-	61,5
Sicilia [45]	36	3	29	27	-	5
Turquía [45]	2,1	4,3	23,	42,5	4	19,2
Palestina [50]	9,5	21,2	13,1	34	-	22,2
Albania [51]	16,7	8,3	18,5	43,5	2,08	10,9
Egipto [52]	2,5	27,5	18,75	33,7	-	17,55

En España, los estudios moleculares de mutaciones que afectan al gen  $\beta$ -globina han sido parciales, restringidos a unas pocas áreas geográficas y, la mayoría antiguos, desarrollados en la década de los 90 (tabla 4). Estos estudios moleculares reflejan que las alteraciones más frecuentes son las que afectan al codón 39 (C>T). Esta mutación es la responsable del 20-64% de las  $\beta$ -talasemias según las series, seguida de la mutación del IVS-I-1 (G→A) que en algunas regiones puede representar hasta el 60% de las mismas (tabla 3).

En el primer estudio, realizado en Cataluña en 1988 [47], se encontraron ocho mutaciones que ser responsable de todos los casos  $\beta$ -talasemia: codón 39, IVS-I-110, IVS-I-6, IVS-I-1, IVS -II-745, codón de 6, 8 y codón de IVS-I-5, siendo la más frecuente la que afecta al codón 39 (C>T) con una frecuencia del 64%. En las provincias del este de la península y en las Islas Baleares, la mutación predominante es la del codón 39 (C>T) [48] que se presenta en el 45% de las  $\beta$ -talasemias de la Comunidad Valenciana [48] y de Mallorca [49]. Por el contrario, en las regiones estudiadas del oeste de la Península (Huelva, Extremadura)[31,50,51], la mutación más frecuente es la IVS-I-1, que en el área de la Alta Extremadura [50] llega a alcanzar entre el 40 y el 60%. En el centro de España [51] y en Andalucía Oriental [43,52] las mutaciones IVS-I-1 y CD-39 tienen una incidencia similar que se sitúa en torno al 30%. Otras mutaciones alcanzan una elevada incidencia en determinadas regiones, como la IVS-I-110 en Andalucía Oriental [52] y Mallorca [49], con un 26,7 y un 24,4% respectivamente (tabla 4).

La mutación CD-6 (-A) tiene su máxima incidencia en Mallorca [49] y en la Comunidad Valenciana [48], con un 20 y un 18,6%, respectivamente. En el resto de la Península Ibérica esta mutación se presenta en menos del 1% de las  $\beta$ -talasemias y no ha llegado a detectarse en Extremadura. La mutación CD-37 (G→A), se detectó originalmente en Arabia Saudí, Egipto y en China. Los escasos estudios efectuados en España se han realizado en la zona del delta del Ebro [53], en donde se describe por vez primera, en la Comunidad Valenciana [48] y en la población autóctona de la isla de Mallorca [49]. En estos estudios se han detectado 32 portadores en la zona del delta del Ebro, dos en la Comunidad Valenciana (4,7%) y no se pudo detectar ninguno en la isla de Mallorca. No se conoce la incidencia de esta mutación en el resto de la Península Ibérica por no haberse realizado estudios. Las restantes mutaciones estudiadas, CD-8(-AA), CD-8/9(+G), CD-11(-T), IVS-II-745(C→G) e IVS-I-5(G→A), tienen una incidencia muy baja [47-52,54] (tabla 4) aunque según los datos aportados por el Villegas et al [55] describe que la mutación CD-8/9, originaria de los indios asiáticos, como la tercera mutación más frecuente (un 8,6% de los casos), junto con la IVS-I-6. No se ha encontrado ningún portador para las mutaciones IVS-II-1 (G→A) o CD-15 (G→A) en los estudios en los que éstas han sido incluidas [50-52,54] (**tabla 4**).

No obstante, a pesar del amplio abanico de mutaciones consideradas, quedan pacientes con  $\beta$ -talasemia no tipificados molecularmente, y que en algunos estudios llegan a representar el 11% [54]. Esto sugiere que debería ampliarse el espectro de mutaciones estudiadas o recurrir, en estos casos, a la secuenciación directa del gen.



**Tabla 4. Distribución de las principales alteraciones moleculares de la  $\beta$ -talasemia en diferentes regiones de España en la década de los 90.**

Región	Cataluña [54]	Delta del Ebro [49]	Extremadura, Toledo, Huelva [58]	Andalucía Oriental [60]	Huelva [30]	Centro de España [59]	Alta Extremadura [57]	Mallorca [56]	Com. Valenciana [55]
Mutación/Año	1988	1993	1994	1994	1996	1996	1997	1997	1998
CD-39	64,0	5,9	23,8	31,1	33,3	29,1	20,0	45,9	44,2
IVS-I-1	3,5	0	43,7	22,3	55,6	31,3	60,0	3,06	9,3
IVS-I-110	8,5	0	4,4	26,7	–	9,0	12,3	24,4	4,7
IVS-I-6	15,5	0	19,3	8,9	5,6	9,0	1,5	0	16,3
CD-6	5,0	0	0	–	–	0,7	0	20,4	18,6
CD-8	1,7	–	3	–	–	1,5	3,1	–	–
CD-8/9	–	–	-	–	–	3,7	1,5	–	–
CD-11	–	–	1,4	–	–	–	1,5	0	0
IVS-II-745	1,7	0	-	2,1	–	3,0	0	–	–
IVS-I-5	1,5	–	-	–	–	1,5	–	–	–
IVS-II-1	–	–	0	0	0	0	–	–	–
CD-15	–	–	-	–	–	–	0	–	–
CD-37	–	94,1	-	–	–	–	–	0	4,7
No caracterizada	0	–	4,4	8,9	5,6	11,2	0	6,12	2,30
<b>Total Pacientes</b>	<b>58</b>	<b>34</b>	<b>60</b>	<b>45</b>	<b>18</b>	<b>131</b>	<b>65</b>	<b>98</b>	<b>43</b>

Más tarde, en 2001, Villegas et al. [56] publicaron los resultados de un estudio molecular de  $\beta$ -talasemia en 294 individuos españoles no relacionados y 1264 con  $\alpha$ -talasemia mediante técnicas de biología molecular en un afán de dar una visión general de la genética molecular de la talasemia y su distribución geográfica en nuestra zona. En relación con la  $\beta$ -talasemia, se caracterizaron un total de 15 mutaciones diferentes. Once eran homocigotos (22 alelos), tres heterocigotos compuestos (6 alelos), y los restantes 280 fueron heterocigotos (280 alelos). Un total de 86,6% de los alelos identificados se pueden agrupar en cinco mutaciones diferentes: [IVS-I-1 (G  $\rightarrow$  A), IVS-I-6 (T  $\rightarrow$  C), IVS-I-110 (G  $\rightarrow$  A), codón 39 (C  $\rightarrow$  T), los codones 8/9 (+ G)]. En 14 sujetos (4,5%), todos los heterocigotos, no fue posible identificar la alteración responsable de la  $\beta$ -talasemia. Los autores concluyen que los programas de prevención en la región mediterránea para la talasemia, basadas en la detección de portadores heterocigotos y asesoramiento genético, no son suficientes para reducir la incidencia de recién nacidos con talasemia mayor y que el diagnóstico prenatal de talasemias ha dado una nueva dimensión a la prevención de estos, pero con el fin de implementar esto, es esencial el conocimiento de las mutaciones y la incidencia de estos.

En el 2009, Mañú Pereira et al. [57] caracterizaron 79 individuos nacidos en la cuenca mediterránea a nivel molecular. Se identificaron 6 mutaciones principales en el 79,7% de los casos: codón 39 (27,85%), IVS-I-1 (16,45%), IVS-I-6 (13,92%), IVS-I-110 (11,39%), el codón 6 (5,06%) y el codón 8 (5,06%). Por tanto, el 80% de los individuos de origen mediterráneo quedan caracterizados por estas 6 principales mutaciones más prevalentes. Aunque codon 39 sigue siendo la mutación de mayor prevalencia, ésta ha cambiado notablemente desde 1988 [47], lo que indica que durante los últimos 20 años ha disminuido de 64% a sólo el 27,85%. Por otra parte, se encontraron algunas mutaciones raras en este estudio [57], incluyendo el codón de 5 (C  $\rightarrow$  T), descrita por primera vez en España por Roperó et al. en 1999 [58][64], que fue encontrada en dos miembros de una familia. Además encontraron la presencia de alelos de  $\beta$ -talasemia en los 4 pacientes con anemia falciforme estudiados, 3 de ellos  $\beta^S/\beta^+$  y uno  $\beta^S/\beta^0$ .

Este estudio demuestra claramente que la heterogeneidad de las mutaciones de  $\beta$ -talasemia en España ha aumentado notablemente en comparación con 20 años atrás como consecuencia del aumento de la inmigración desde las zonas geográficas no mediterráneas, principalmente de África. Este aumento de la heterogeneidad molecular de los alelos de  $\beta$ -talasemia y también del alelo  $\beta^S$  procedente de África, ha llevado a una mayor variabilidad de las

manifestaciones clínicas de estos trastornos y, a su vez, a más dificultades en su caracterización genética precisa.

### 2.2.5.1. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ALFA-TALASEMIA.

A diferencia de lo que sucede con la  $\beta$ -talasemia, en la  $\alpha$ -talasemia las principales alteraciones están producidas por deleciones que, según su extensión darán un cuadro más o menos grave, en función del número de genes  $\alpha$  afectados [36]. Algunas de estas presentan también una distribución geográfica heterogénea. Así, las deleciones causantes del haplotipo  $\alpha^0$  ( $--/\alpha$ ) son distintas en el Mediterráneo y el Sudeste Asiático. Se ha observado, así mismo, que el haplotipo  $\alpha^+$  ( $-\alpha/-\alpha$ ) es mucho más frecuente en las regiones ribereñas del Mediterráneo, mientras que el  $\alpha^0$  es más común en el Sudeste Asiático, Oriente Medio e Indonesia. Esto justifica que los casos de HbH ( $-\alpha/--$ ) y, más aún, los de hydrops fetalis que se observan en Asia y Oriente, sean raros en el área mediterránea [24].

#### **-Deleciones de un solo gen $\alpha$ : $\alpha^+$ o $\alpha^2$ -talasemia**

La deleción  $\alpha$ -3,7 es la alteración molecular más frecuente en las  $\alpha$ -talasemias. Esta alteración supone más del 85% de los casos de  $\alpha$ -talasemia [59-61] y en algunos estudios representa la única alteración molecular encontrada [60,62] (**tabla 5**).

**Tabla 5. Alteraciones moleculares en las  $\alpha$ -talasemias**

Alteración molecular	Pérez et al [60]	Remacha et al [62]	Villegas et al [63]
Deleción $\alpha$ -3,7	19	28	910
Deleción $\alpha$ -4,2	0	-	16
Deleciones amplias	-	-	113
$\alpha^{\text{Hph}}$ $\alpha$	0	-	5
$\alpha^{\text{Nco}}$ $\alpha^{\text{Nco}}$	0	-	13
No identificada	11	4	-
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>1057</b>

La deleción  $\alpha$  -4,2, tiene mucha menor frecuencia, ya que es típica de los países del Sudeste Asiático; en España su detección es anecdótica.

#### **-Mutaciones no delecionales que afectan a un solo gen $\alpha$ .**

Se han descrito mutaciones que causan  $\alpha$ -talasemia en las que no se identifican deleciones amplias que causan la desaparición de alguno de los genes  $\alpha$ , sino que se trata de mutaciones puntuales o deleciones que afectan a muy pocos nucleótidos y causan la inactivación del gen  $\alpha$  afecto. Estas son conocidas como  $\alpha$  talasemias no delecionales. En los

estudios realizados en España estas mutaciones se presentan tan sólo en el 1,5-2% de las  $\alpha$ -talasemias [64] (ver tabla 5).

Las mutaciones de este tipo más frecuentemente halladas son la mutación en el codón de inicio de los genes  $\alpha 1$  o  $\alpha 2$  y la delección de los cinco primeros nucleótidos del intrón I del gen  $\alpha 2$ , denominadas  $\alpha Nco$  o  $\alpha Nco\alpha$  y  $\alpha Hph\alpha$  respectivamente. Este nombre hace referencia a las enzimas de restricción Nco y HphI empleadas para la detección de dichas mutaciones. Las formas no delecionales y las delecciones de un solo gen  $\alpha$ , en la forma heterocigota, no tienen repercusión clínica, ya que se produce la inactivación de un solo gen  $\alpha$ , por lo que se las denomina *talasemias silentes*. No obstante, tienen interés en cuanto al consejo genético, ya que si se combinan con mutaciones que causan  $\alpha^0$ -talasemia pueden resultar en un cuadro clínico más grave, provocando la enfermedad de la hemoglobina H.

### **-Delecciones amplias de los dos genes $\alpha$ : $\alpha^0$ o $\alpha 1$ -talasemia**

Existen escasos estudios realizados en muestras poblacionales en España, lo que hace difícil conocer la prevalencia real de las  $\alpha 0$ -talasemias a mayoría de los casos descritos son estudios familiares recogidos en las series de Sánchez et al [61] y Villegas et al [63]. En el estudio de Villegas et al [63] se estudiaron 1057  $\alpha$ -talasemias en España y se identificaron 113 individuos con  $\alpha 0$  talasemia ( $--/\alpha\alpha$  o  $--/-\alpha$ ) lo que supone un 10% de las  $\alpha$ -talasemias (**tabla 5**).

En España se han descrito algunas mutaciones causantes de  $\alpha 0$ -talasemia propias de la población autóctona, como las delecciones  $—^{SPAN}$  (de 11 kb),  $—^{MA}$  (de 22 kb),  $—^{CI}$  (de 27 kb),  $—^{CANT}$  (de 14 kb) y  $—^{BR}$  (que elimina prácticamente todo el *cluster* de genes  $\alpha$ ) [63]. Asimismo, se han descrito alteraciones moleculares comunes la cuenca del mediterráneo, como las delecciones  $—^{MED}$  (de 17,4 kb), la delección  $—^{CAL}$  (de 32 kb) o la delección  $—^{SEA}$  (de 20 kb) descrita en poblaciones asiáticas. Además, en algunas familias aisladas se han descrito truncamientos que afectan al telómero del cromosoma 16 y alteraciones que producen el síndrome del ATRA-16 [63]. La frecuencia de las mutaciones delecionales amplias es discutido: en algunos estudios [39,63,65] la delección más común encontrada es la  $—^{MED}$ , mientras que en otros[61] es la  $—^{BR}$ , que afecta a un fragmento de más de 100 kb incluyendo a los dos genes  $\alpha$  y a los genes  $\zeta$ . Una vez más nos encontramos con que la escasez de estudios realizados en muestras poblacionales hace difícil conocer la prevalencia real de las  $\alpha^0$  talasemias en España, puesto que la mayoría de casos son estudios familiares recogidos en las publicaciones de Sánchez et al [61] y Villegas et al[63].

De forma puntual se han descrito alteraciones moleculares en algunas familias como las hemoglobina Plasencia, que es una hemoglobina talasémica causada por una mutación que

produce una sustitución de una leucina por arginina en el residuo 125 de la cadena  $\alpha 2$ -globina. Esta variante se ha descrito asociada con un fenotipo- $\alpha$  talasémico muy leve en tres miembros de una familia española de Plasencia y en varias familias portuguesas. Una revisión de la caracterización molecular de 308 individuos portugueses con sospecha de  $\alpha$ -talasemia se encontró que la Hb Plasencia fue la segunda mutación más frecuente después de la eliminación  $-\alpha 3.7$  [66]. También se han descrito formas no delecionales como la denominada Hb Lleida, que consiste en la deleción de 12 pares de bases en el exón 3 del gen  $\alpha 2$ , o la deleción de 13 pares de bases en el segundo exón del gen  $\alpha 1$  [67].

En Madrid, el Hospital Clínico de San Carlos (centro de referencia de estudios moleculares de Talasemias en Madrid) realizó un estudio para averiguar la incidencia de la  $\alpha$ -talasemia no deleción en los pacientes con  $\alpha$ -talasemia con técnicas de biología molecular: a lo largo de 3 años se estudiaron 517 sujetos que presentaban microcitosis e hipocromía no ferropénica, con valores de Hb  $A_2$ , Hb F y electroforesis de hemoglobinas normales. Se estudiaron los 2 tipos de  $\alpha$ -talasemia no deleción más frecuentes en el Mediterráneo: la  $\alpha^{\text{Hph}}$  y la  $\alpha^{\text{Nco}}$ . De los 517 sujetos, en 40 se identificó una  $\alpha$  talasemia no deleción (7,7%). La distribución de las mutaciones fue la siguiente (tabla 6):

**Tabla 6. Distribución de frecuencia de los genotipos estudiados en pacientes con patología en el cluster  $\alpha$  en Madrid (2001-2003). Cortesía de Briceño Polacre et al [68].**

Genotipos	Frecuencia (Nº)	Porcentaje (%)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	335	64,8
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	5	1,0
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	105	20,3
$\alpha^{\text{Nco}}\alpha/\alpha\alpha$	10	1,9
$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$	24	4,6
$\alpha^{\text{Nco}}\alpha/\alpha^{\text{Nco}}\alpha$	1	0,2
$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha^{\text{Hph}}\alpha$	1	0,2
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1	0,2
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{\text{Hph}}\alpha$	3	0,6
$-\alpha\alpha$	28	5,4
$-\alpha^{4.2}/\alpha^{\text{Nco}}\alpha$	1	0,2
$-\alpha^{\text{Hph}}\alpha$	3	0,6
<b>Total</b>	<b>517</b>	<b>100,00</b>

28 fueron positivos para  $\alpha$ Hph del gen  $\alpha_2$  (24 en estado heterocigoto, 1 homocigoto y 3 dobles heterocigotos asociados con la delección 3,7 kb); y 12 fueron positivos para la  $\alpha^{Nco}$  del gen  $\alpha_2$  (10 heterocigotos, 1 homocigoto y 1 doble heterocigoto asociado con la delección 4,2 kb). Se concluía por tanto que la talasemia no delección supone menos del 8% de los casos de  $\alpha$ -talasemia en nuestro medio; que la  $\alpha^{Hph}$  es el tipo de  $\alpha$ -talasemia no delección más frecuente y por último que presenta anormalidades hematológicas más notables que las  $\alpha^{Nco}$  [68].

Por último destacar el estudio de Aristizabal et al en el País vasco [41] en el que se revisaron 107 pacientes con estudio genético positivo para  $\alpha$ -talasemia durante 2 años (2012-2013). De ellos, 61 presentaron alguna mutación. El 62% tenía un alelo mutado y el 38%, 2 alelos. La edad media al diagnóstico fue de 31 años, con un 28% menores de 18 años. La mayoría eran de procedencia europea con un porcentaje importante de pacientes de origen africano (26%) y árabes (13%). Todos los pacientes estaban asintomáticos con anemia leve en el 28%. Dos pacientes fueron diagnosticados por *screening* neonatal y la mayoría de pacientes no requirió tratamiento o precisó feroterapia. Estos resultados no apoyan el *screening* neonatal de  $\alpha$ -talasemia debido a que sólo se detectó la presencia de 1 o 2 mutaciones en los genes  $\alpha$ , las cuales carecen de repercusión clínica y el único interés de su estudio fue el consejo genético [41].

### 2.2.6.- DELTA-BETA TALASEMIA EN ESPAÑA.

La  $\delta\beta$ -talasemia y la Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF) son raras alteraciones que se presentan con una distribución más o menos mundial universal [16]. Aunque se han estudiado ampliamente desde el punto de vista molecular por ser un modelo de estudio del sistema de regulación de genes en el individuo adulto (en estas alteraciones se mantiene la síntesis de cadenas de  $\gamma$ -globina que participan en la HbF y que en el individuo normal deja de producirse en el momento del nacimiento), no se conocen estudios de la prevalencia en la población general, al contrario que en el resto de las talasemias.

De los diferentes tipos descritos, la  $(\delta\beta)^0$ -talasemia es más frecuente en el área mediterránea y en España [16,69], aunque no existan estudios poblacionales. En el estudio del GEHBTA de 1986 [25] se describe que la  $\delta\beta$ -talasemia en España presenta incidencias variables de una región a otra, con las cifras más elevadas detectadas en la zona de Levante, en la que se conoce la existencia de numerosos casos de  $\delta\beta$ -talasemia referidos por diferentes grupos [25,28]. Según datos obtenidos en un estudio poblacional de talasemias en la Comunidad

Valenciana (datos no publicados) mediante el estudio de hemograma y dosificaciones de HbA2 y F en donantes de sangre sanos de dicha comunidad, se encontró una prevalencia de  $\delta\beta$ -talasemia del 0,09% [24]. Dentro del programa de detección de talasemias y hemoglobinopatías en la Bahía de Cádiz, Fernández Valle et al en el año 1991 [70] diagnosticaron 363 familias de talasemia de las cuales 21 (5,78%) correspondieron a  $\delta\beta$ -talasemia (54 pacientes) detectando un “acúmulo” de  $\delta\beta$ -talasemia en la zona de Rota que se podrían explicar por fenómenos de endogamia y escaso movimiento poblacional.

### 3.- ENZIMOPATÍAS HEREDITARIAS.

---

Las enzimopatías hereditarias se dividen en dos grandes grupos: aquellas que resultan de una alteración en la vía de las pentosas-fosfato (VPP) o del metabolismo del glutatión, y aquellas que se asocian a defectos de la ruta de Embden-Meyerhof [1]. Se conocen al menos 40 defectos enzimáticos. Los dos defectos enzimáticos más representativos por su frecuencia son el déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), perteneciente a la VPP y el déficit de piruvato kinasa, en la parte final de la ruta de Embden-Meyerhof. La deficiencia de G6PDH es la deficiencia enzimática más común en el mundo y el déficit hereditario enzimático de eritrocitos más frecuente. Es probable que más de 420 millones de personas en el mundo están afectadas por deficiencia de esta enzima, lo que supone el 0,5-26% de la población mundial .

Las regiones más afectadas son la mediterránea, la del África subsahariana, la americana (población africana e hispana) y la región del sudeste asiático (**figura 3**). En los Estados Unidos, la deficiencia de G6PDH es más común entre la población de raza negra (población afroamericana) que en las personas de raza blanca y los hombres tienen mayor probabilidad de padecerla que las mujeres. También es más frecuente entre la población del Medio Oriente, particularmente los descendientes de los judíos sefardíes o kurdos y en personas blancas de origen mediterráneo [71].

La deficiencia de G6PDH eritrocitaria es un desorden hereditario ligado al cromosoma X, en el cual la disminución de la actividad de la enzima da por resultado una anemia hemolítica. La enfermedad es el resultado de mutaciones en el gen G6PD (Xq28). Los hombres hemicigotos y las mujeres homocigotas expresan el déficit completamente, mientras que las mujeres

heterocigotas muestran una expresión variable, frecuentemente ausente o moderada. La gravedad de las manifestaciones está relacionada con la gravedad del déficit. Existen muchas variantes del déficit G6PDH (alrededor de 150); las más frecuentes son las formas mediterránea y cantonesa (graves), y las formas africana y mahidol (más moderadas) [71].



**Figura 3. Distribución de la deficiencia de G6PDH en el mundo [71].**

En España son escasos los registros epidemiológicos existentes. Destacamos el estudio de Mañú Pereira et al en el 2007, en el contexto del programa de screening de hemoglobinopatías en Cataluña, en el cual se estudiaron 4020 muestras de neonatos en los que se detectó deficiencia enzimática de G6PDH en 1/43 en la población inmigrante y en 1/527 recién nacidos autóctonos, los que nos da una idea de la alta prevalencia en nuestro medio y una frecuente asociación con la hemoglobina S (7% de las muestras estudiadas). En definitiva se detectó, en términos globales, 1 caso por cada 400 recién nacidos en Cataluña, lo que significa que es 1 de cada 400 individuos presente una crisis hemolítica aguda en algún momento de su vida si entra en contacto con algún agente oxidante (medicamentos o habas) [35].

En cuanto a la deficiencia de piruvato kinasa (PK) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen PKLR (1q22), que en la actualidad se conoce que es un desorden con un gran polimorfismo genético. Aunque probablemente afecta a todas las razas, es más común en poblaciones del Norte de Europa y entre la raza caucásica con una prevalencia estimada en 1/20.000 (51 casos por millón homocigotos) en dicha población blanca.



En la raza negra el déficit de PK es menos frecuente pero su prevalencia no se conoce [72]. Se considera que la deficiencia en PK se encuentra muy extendida a lo largo de nuestro planeta, habiendo países y regiones en que ha sido bien investigada. Sin embargo, en nuestro país, en el que se ha considerado que aparece con una frecuencia del 0,24%, se han realizado muy pocos estudios y es muy difícil establecer la frecuencia de este desorden debido a la gran heterogeneidad genética que presenta [72].

## 4.- ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS. CLASIFICACIÓN

---

El concepto de anemia hemolítica hereditaria (AHH) o congénita se utiliza para todos aquellos trastornos producidos por defectos en los genes que codifican la síntesis de alguna de las proteínas imprescindibles para la vida del hematíe que pueden ser de:

- la hemoglobina (*hemoglobinopatías*),
- las proteínas de la membrana (*membranopatías*),
- las enzimas del metabolismo eritrocitario (*eritroenzimopatías*).

### 4.1.- ANEMIAS HEREDITARIAS POR DEFECTOS EN LA HEMOGLOBINA.

Las anemias por defectos en la hemoglobina (Hb) son las alteraciones monogénicas más frecuentes [1,73] y pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- *Hemoglobinopatías estructurales*, en las que se produce la síntesis de una cadena de globina anómala (alteración cualitativa).
- *Talasemias*, en las que existe un defecto de síntesis en una o varias cadenas de globina (alteración cuantitativa de las cadenas de globina).
- En el caso de que coexistan ambas alteraciones, hablamos de *hemoglobinopatías talasémicas*.

Aunque por definición todas son hemoglobinopatías, este término se utiliza para referirse exclusivamente a las hemoglobinopatías estructurales.

### 4.1.1.- HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

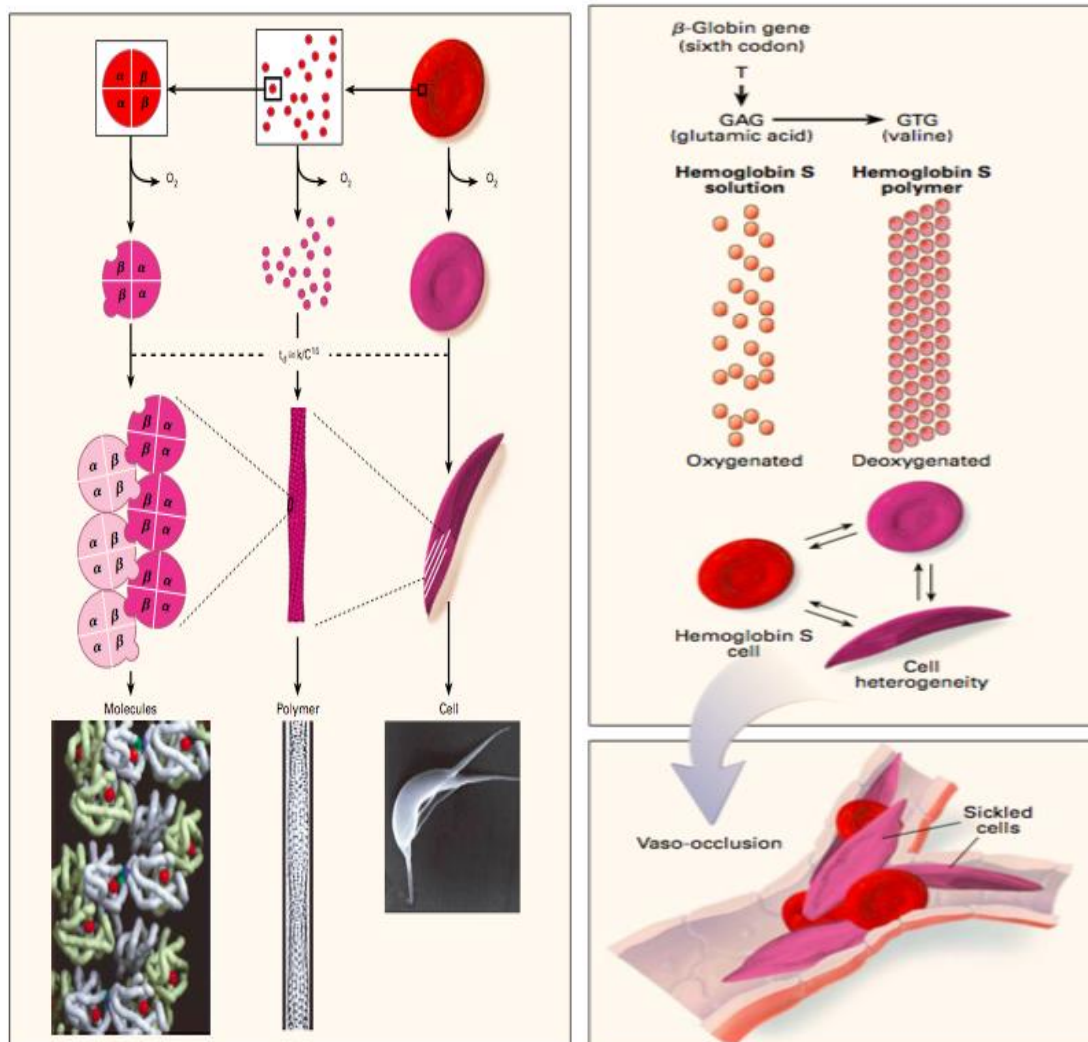
Son causadas por alteraciones en la síntesis de alguno de los aminoácidos que forman los genes de la globina. Como consecuencia, se produce una alteración en la cadena de globina que puede conllevar cambios en la solubilidad, estabilidad o función de la molécula de la hemoglobina y las manifestaciones clínicas derivadas de dichos cambios. Existen más de 800 variantes estructurales de la hemoglobina, muchas de ellas cursan de forma asintomática. Las alteraciones más frecuentes son las que afectan a la cadena beta, y dentro de éstas, las más relevantes por prevalencia son la HbS, HbC, HbE y HbD. La variante estructural más relevante por su gravedad es la forma homocigota de HbS [16,73-75].

#### 4.1.1.1. HEMOGLOBINOPATÍA S.

La hemoglobinopatía S es una variante estructural de herencia autosómica codominante; en su forma homocigota (HbSS) es causante de la anemia de células falciformes, anemia falciforme (AF) o drepanocitosis, que es la hemoglobinopatía más frecuente y de mayor impacto sanitario junto con la HbC. Es muy frecuente en sujetos de África ecuatorial, así como en poblaciones del área mediterránea, Oriente Medio, India y en afroamericanos [73-75]. La hemoglobina S se produce por sustitución del ácido glutámico por valina en el sexto aminoácido de la cadena beta de globina ( $\beta^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$ ). Esta alteración determina una modificación en la carga superficial de la molécula de hemoglobina que altera su solubilidad y permite que sea detectada electroforéticamente al correr a menor velocidad que la HbA en la electroforesis convencional [16,73-75].

Fisiopatológicamente, cuando se desoxigena, la Hb mutada sufre una polimerización, formándose un gel paracrystalino llamado cuerpo tactoide. Esta estructura es insoluble y rígida, y produce un cambio conformacional en el hematíe, que adopta forma de hoz (sickle cell o célula falciforme). El fenómeno de falciformación es reversible, pero existe un porcentaje variable (5-50%) de hematíes que no pueden recuperar su forma al oxigenarse, y son eliminados por el sistema mononuclear fagocítico (SMF). Estos hematíes presentan alteraciones en los fosfolípidos de membrana que condicionan una alteración de la permeabilidad iónica, así como un aumento de la adhesión al endotelio vascular y un aumento de la sensibilidad frente al SMF. Todo ello

condiciona las crisis vasooclusivas típicas de la enfermedad y un síndrome hemolítico con un componente de hemólisis intravascular y extravascular. La hemólisis intravascular se produce por el aumento de la sensibilidad de los hematíes falciformes al sistema del complemento y por una mayor fragilidad debido a la disminución de la deformabilidad (**figura 4**). La hemólisis extravascular se produce por la mayor sensibilidad de los hematíes falciformes al efecto macrofágico del SMF [16,73-75].



**Figura 4. Polimerización de la HbS y fenómeno vasooclusivo [76,77].**

Las manifestaciones clínicas de la hemoglobinopatía S presentan una gran heterogeneidad. La forma más frecuente es el “rasgo falciforme” (HbSA), o portadores, que en general cursa de forma asintomática aunque, de forma excepcional, en situaciones de disminución importante de disminución de oxígeno o tras ejercicio físico intenso, pueden producirse fenómenos vasooclusivos en estos pacientes [16,73-75].

El concepto de “enfermedad de células falciformes” engloba todas aquellas patologías ocasionadas por la HbS con un porcentaje por encima del 50%, que pueden ser causadas por:

- Hemoglobinopatía por HbS homocigota (HbSS).
- Hemoglobinopatía talasémica: coexistencia de la Hb S con una  $\beta$ -talasemia: HbS- $\beta^+$  talasemia ó HbS- $\beta^0$  talasemia.
- Combinación de dos variantes de Hb, como la HbSC, HbSD o HbSG.

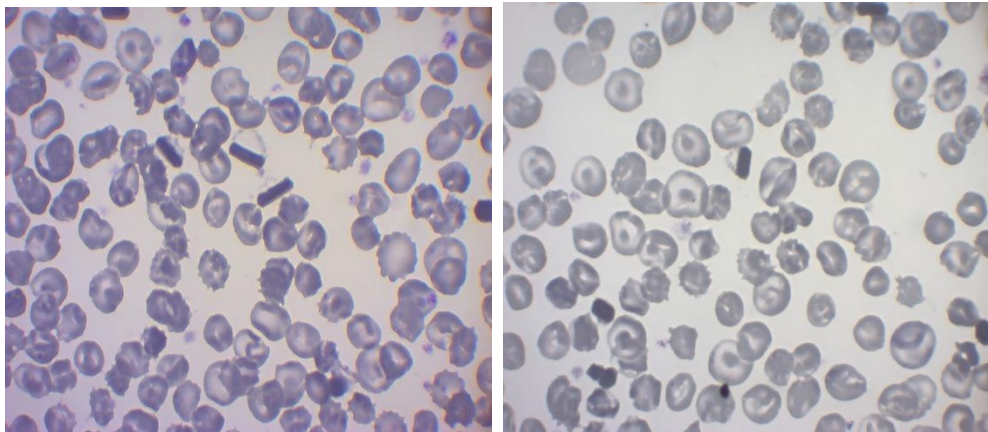
Las manifestaciones clínicas comienzan a partir de los 4-6 meses de vida, ya que en el periodo neonatal la presencia de HbF ejerce un efecto protector. Las manifestaciones son derivadas de la anemia hemolítica crónica (palidez, ictericia, retraso del crecimiento) así como de los fenómenos vasooclusivos: se producen crisis dolorosas y pasajeras de duración variable, que pueden ser desencadenadas por infecciones, deshidratación, hipoxia, etc. o presentarse sin factor desencadenante aparente. Afectan a diversos territorios (huesos, mesenterio, sistema vascular pulmonar, vasos cerebrales) y la intensidad y gravedad es variable entre individuos. Además de las crisis oclusivas, estos pacientes presentan crisis aplásicas, crisis de secuestro esplénico e infecciones con elevada mortalidad. A largo plazo, estos pacientes presentan alteraciones en el crecimiento y en diferentes órganos y sistemas: sistema nervioso central (retraso psicomotor), cardiovascular (cardiomegalia, insuficiencia ventricular izquierda), pulmonar (fibrosis pulmonar), hepatobiliar (hepatomegalia y litiasis biliar). Otros trastornos frecuentes son las úlceras maleolares de evolución tórpida y las alteraciones oculares que producen una retinopatía proliferativa [76-78]. El inicio precoz de las complicaciones en los niños refuerza la necesidad de implantar programas de cribado neonatal de hemoglobinopatías en áreas de alta prevalencia para detectar los casos de forma precoz y evitar el desarrollo de complicaciones mediante un manejo adecuado de estos pacientes (profilaxis antibiótica, programa de inmunizaciones , etc).

### 4.1.1.2. OTRAS HEMOGLOBINOPATÍAS CON ALTERACIÓN EN LA CARGA SUPERFICIAL. HEMOGLOBINOPATÍA C.

La hemoglobinopatía C es la segunda hemoglobinopatía más frecuente, después de la HbS. Se produce por una mutación (G→A) en el codón 6 del gen  $\beta$ -globina, que determina una sustitución del ácido glutámico por lisina ( $\beta^{6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}}$ ). Esto produce una alteración en la carga superficial del hematíe y una disminución en la solubilidad, por lo que la hemoglobina tiende a cristalizarse. Se trata de una hemoglobinopatía casi exclusiva de la raza negra, con alta

frecuencia en la zona centro-occidental de África y en el norte de Ghana, donde alcanza unas tasas del 20-28% de la población. En el sur de Ghana y en la zona occidental de Nigeria tiene una frecuencia del 4%. En España se halla en áreas de Andalucía y Extremadura [73,79].

Los sujetos heterocigotos (HbAC) son asintomáticos, con parámetros hematimétricos normales mientras los homocigotos (HbCC) presentan una anemia moderada, con discreta reticulocitosis, y el dato característico es el aumento de la CHCM. En ocasiones presentan esplenomegalia y también pueden suceder crisis de dolor abdominal aunque no son frecuentes. En la morfología de sangre periférica es característica la presencia de hematíes en forma de bastón o barra producida por la cristalización de los mismos (**figura 5**). La doble hemoglobinopatía S y C (HbSC) presenta un curso más benigno que la drepanocitosis, aunque también presenta hemólisis con anemia moderada y más frecuencia de lesiones óseas y patología ocular [73,80].



**Figura 5. Hemoglobinopatía C homocigota: se observan hematíes en forma de bastón junto con dianocitos y equinocitos.**

#### **4.1.1.3. DIAGNÓSTICO DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS.**

Las mutaciones con disminución de la solubilidad se sitúan en zonas cercanas a la superficie de la molécula por lo que se acompañan de un cambio en la carga eléctrica y una alteración en la movilidad electroforética. Por tanto, se pueden detectar mediante electroforesis de hemoglobina a pH alcalino, así como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las hemoglobinopatías causadas por mutaciones en el interior de la molécula (hemoglobinopatías inestables, hemoglobinopatías con alteración de la afinidad por el oxígeno y

metahemoglobinas) a veces no se acompañan de alteración en la movilidad electroforética, por lo que para realizar el diagnóstico se precisan técnicas adicionales: demostración de la formación de cuerpos de Heinz con una tinción vital como el azul de cresilo, pruebas de termoestabilidad, la prueba de estabilidad química, electroforesis a diferentes pH, estudio de la afinidad de la Hb por el oxígeno o técnicas de biología molecular para la localización de la mutación causante [9,73,79-82].

### 4.1.2.- TALASEMIAS.

Las talasemias son un grupo heterogéneo de anemias hereditarias producidas por un defecto en la síntesis de las cadenas de globina. La cadena o cadenas afectas se sintetizan de manera normal, pero en cantidad inferior a lo habitual (alteración cuantitativa). La patología viene determinada por la disminución de la cantidad de Hb en los hematíes, que condiciona la microcitosis y la hipocromía, y por el exceso de cadena que se sintetiza en cantidad normal, que queda no apareada y daña al hematíe, provocando su muerte precoz (hemólisis y eritropoyesis ineficaz).

Este defecto de síntesis puede involucrar a cualquier cadena de globina, si bien dado el predominio de Hb A en la vida postnatal los principales tipos de talasemia se producen por defecto de síntesis de cadena alfa ( $\alpha$  talasemia) y beta ( $\beta$  talasemia) [80]. La herencia es codominante y se ha observado en todos los grupos étnicos, si bien existe mayor incidencia en determinadas áreas geográficas que guardan relación con las zonas endémicas de paludismo [83-85].

En general se pueden clasificar de acuerdo a las manifestaciones clínicas derivadas de la enfermedad o al defecto genético de cada una. La Hb del adulto o HbA1 es una hemoproteína tetramétrica ( $\alpha_2\beta_2$ ). El gen estructural de la  $\alpha$ -globina está duplicado ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) y se encuentra en el cromosoma 16, por lo que cada célula diploide contiene 4 copias. Sin embargo existe un solo gen funcional de la  $\beta$ -globina en el cromosoma 11, por lo que la célula diploide tiene dos genes  $\beta$  (**Figura 6**).

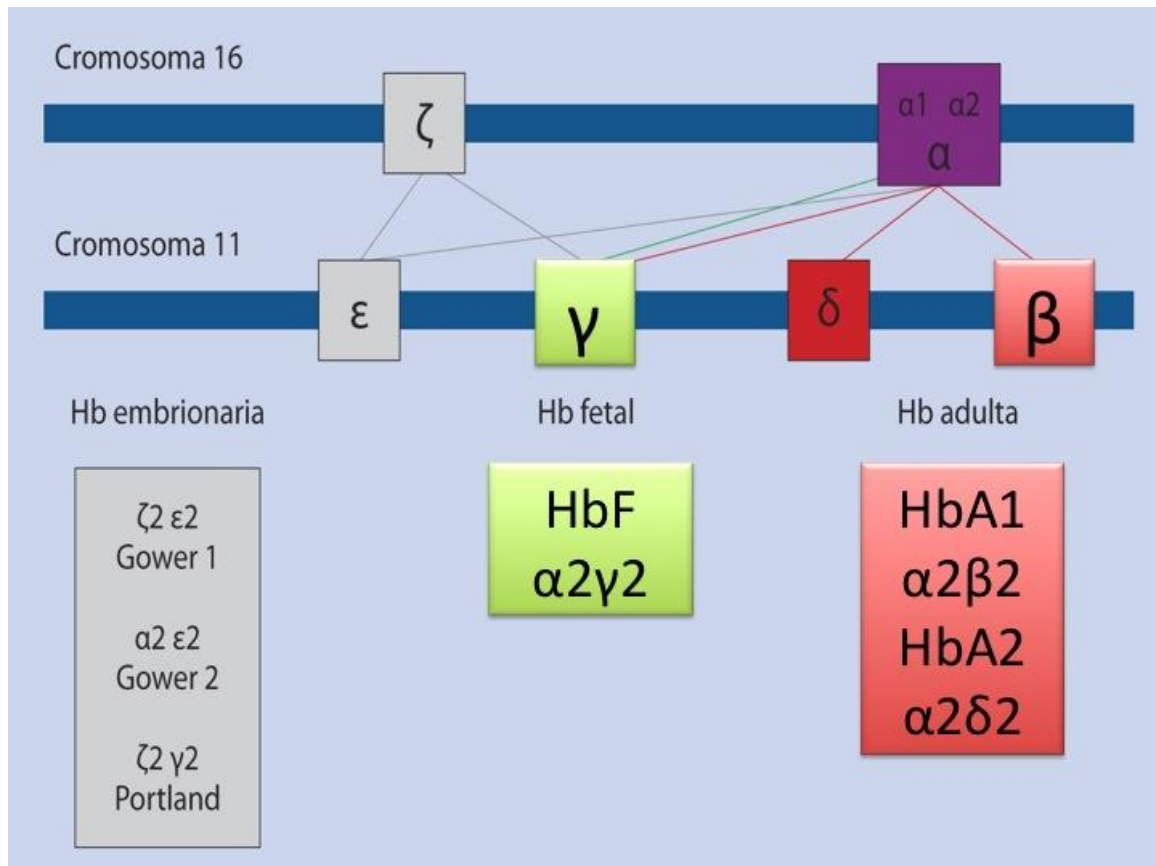


Figura 6. Origen genético de las hemoglobinas humanas. En cada estadio del desarrollo se activan y suprimen diferentes genes.

#### 4.1.2.1. ALFA-TALASEMIA.

Se produce por la disminución o ausencia de cadenas  $\alpha$  de globina. En la mayoría de casos se produce por deleciones que eliminan uno o los 2 genes  $\alpha$  de los 4 presentes (cromosoma 16). Los principales factores que modulan la severidad del fenotipo son el número de genes afectados y el grado en que la mutación disminuye la síntesis de cadenas de globina. Se pueden clasificar según las manifestaciones clínicas o según el defecto genético que las produce [80].

- a) **Clasificación clínica:** se dividen en 4 grandes grupos:
1. Portador silente o rasgo silente: sujetos con mutación en las cadenas de globina pero sin alteraciones de los parámetros hematológicos o alteraciones en el límite de la normalidad. No tiene repercusión clínica.
  2. Rasgo talasémico  $\alpha$  o  $\alpha$ -talasemia menor: anemia microcítica hipocroma no transfusión dependiente.

3. Enfermedad de la Hb H: sujetos con mayor grado de anemia pero que no necesitan transfusiones o sólo de manera esporádica.
4. Hidropesía fetal por Hb Bart: debido a mutaciones homocigotas, que producen anemia severa dependiente de transfusión y tienen gran repercusión socio-sanitaria.
- b) **Clasificación genética.** La familia de las  $\alpha$ -globinas se encuentra en el cromosoma 16 y forma un cluster que está compuesto por dos copias de la  $\alpha$ -globina, dos pseudogenes y a continuación la globina  $\zeta$  (figura 7).

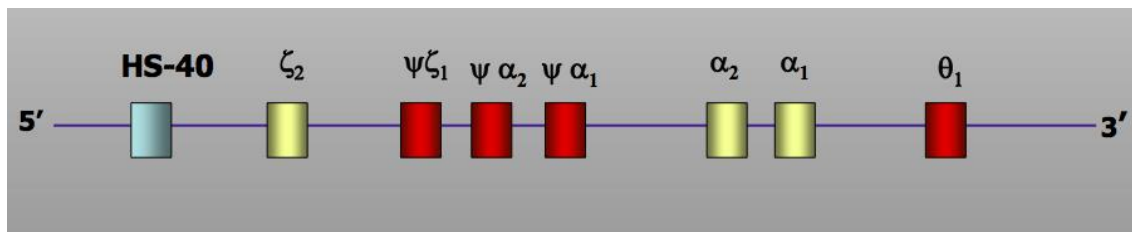


Figura 7. Cluster  $\alpha$ -globina en el cromosoma 16.

La cadena deficitaria es la que da el nombre al tipo de talasemia; además, se subdividen en función de que la síntesis esté disminuida o ausente en  $\alpha^+$  o  $\alpha^0$ . A su vez, las mutaciones pueden estar en estado homocigoto o heterocigoto. De esta forma, se clasifican en 5 grupos:

1.  $\alpha^+$  talasemia heterocigota ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )
2.  $\alpha^+$  talasemia homocigota ( $-\alpha/-\alpha$ )
3.  $\alpha^0$  talasemia heterocigota ( $--/\alpha\alpha$ )
4.  $\alpha^+/\alpha^0$  heterocigota ( $--/-\alpha$ ) se produce por la pérdida de 3 genes y se corresponde con la hemoglobinopatía H, producida por la formación de tetrámeros de cadenas beta (beta4) que
5.  $\alpha^0$  homocigota ( $--/--$ ) se produce por la pérdida de 4 genes  $\alpha$ , y se corresponde fenotípicamente con la hidropesía fetal por Hb Bart. Es un cuadro incompatible con la vida, en el que existe ausencia total de cadenas  $\alpha$ , por lo que no se puede sintetizar Hb A ni HbF. Los sujetos afectados mueren durante la gestación o en las primeras horas de vida.

En las Figuras 8 y 9 podemos comprobar la relación entre genotipo/fenotipo en la  $\alpha$ -talasemia. El alelo ( $-\alpha$ ) también denominado  $\alpha^+$ -talasemia (o  $\alpha_2$ -talasemia) es el defecto más leve y no produce un fenotipo grave en el estado homocigoto o heterocigoto compuesto ( $-\alpha/-\alpha$ ). En cambio, el alelo ( $--$ ),  $\alpha^0$ -talasemia (o  $\alpha_1$ -talasemia) sí lo presenta. Si no se expresan 3 de los 4



genes  $\alpha$  ( $--/\alpha$ ), el paciente puede padecer una anemia hemolítica moderada o grave (enfermedad de HbH).

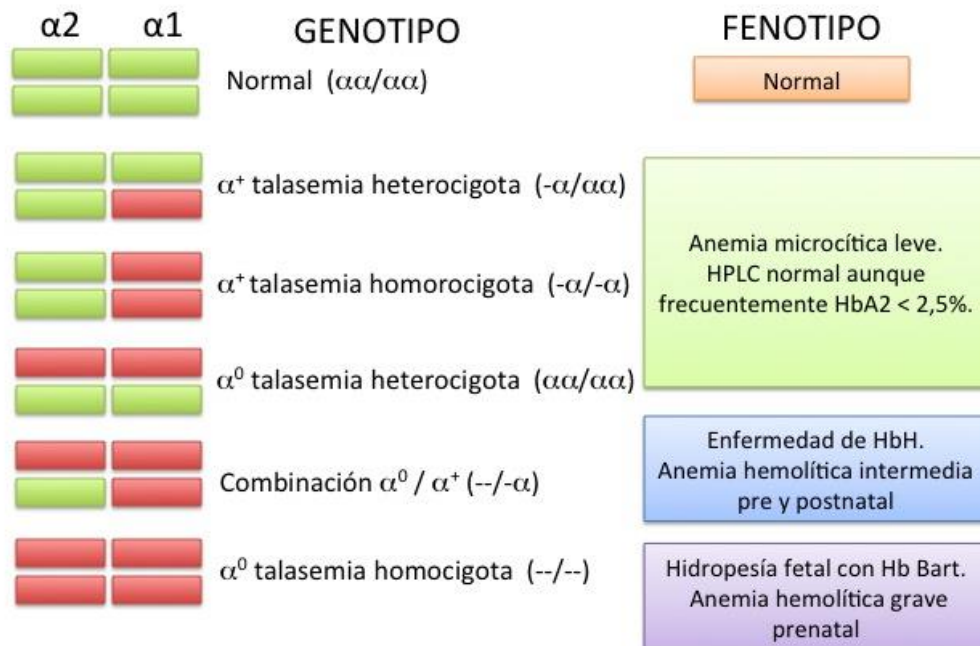


Figura 8. Relación genotipo-fenotipo en la  $\alpha$ -talasemia.

Mediante las electroforesis convencionales por HPLC o capilar, la enfermedad de HbH es detectable sólo en la vida post-natal cuando se encuentra presente una cantidad suficiente del homotetrámero  $\beta 4$  (muy inestable). La forma más grave de  $\alpha$ -talasemia está causada por la ausencia total de expresión del gen  $\alpha$  ( $--/--$ ) y origina la muerte perinatal (hidropesía fetal o hemoglobina Bart formada por tetrámeros de  $\gamma 4$ ). En casos raros, la hemoglobina H (HbH) enfermedad o la hidropesía fetal (hemoglobina Bart) pueden ser debidos a una homocigosis de formas no delecionales. Aunque la HbH suele ser sintomática, alguna formas con variantes delecionales son asintomáticas. Además, la delección de tres genes  $\alpha$ -globina que implica una mutación severa no delecional (por ejemplo, la hemoglobina Constant Spring) también pueden causar un hidrops fetalis [37].

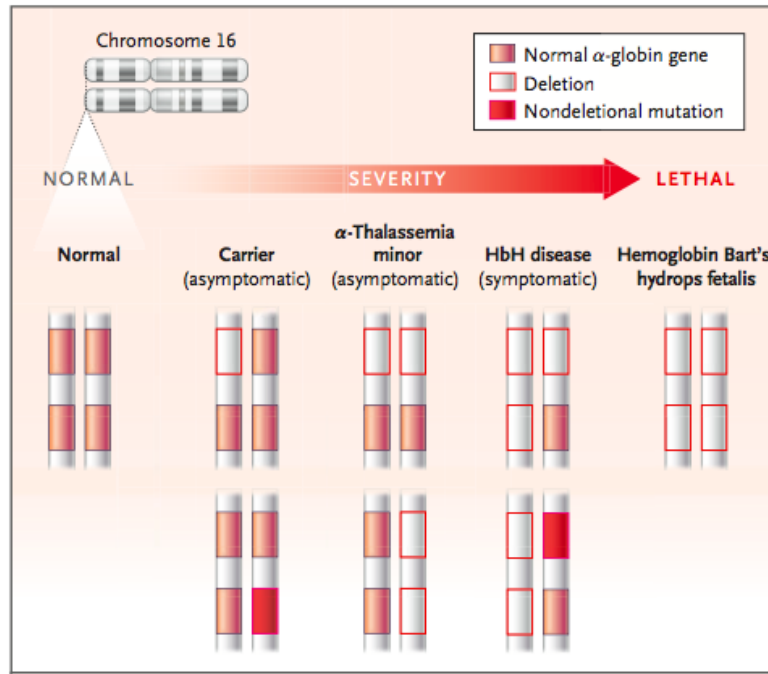
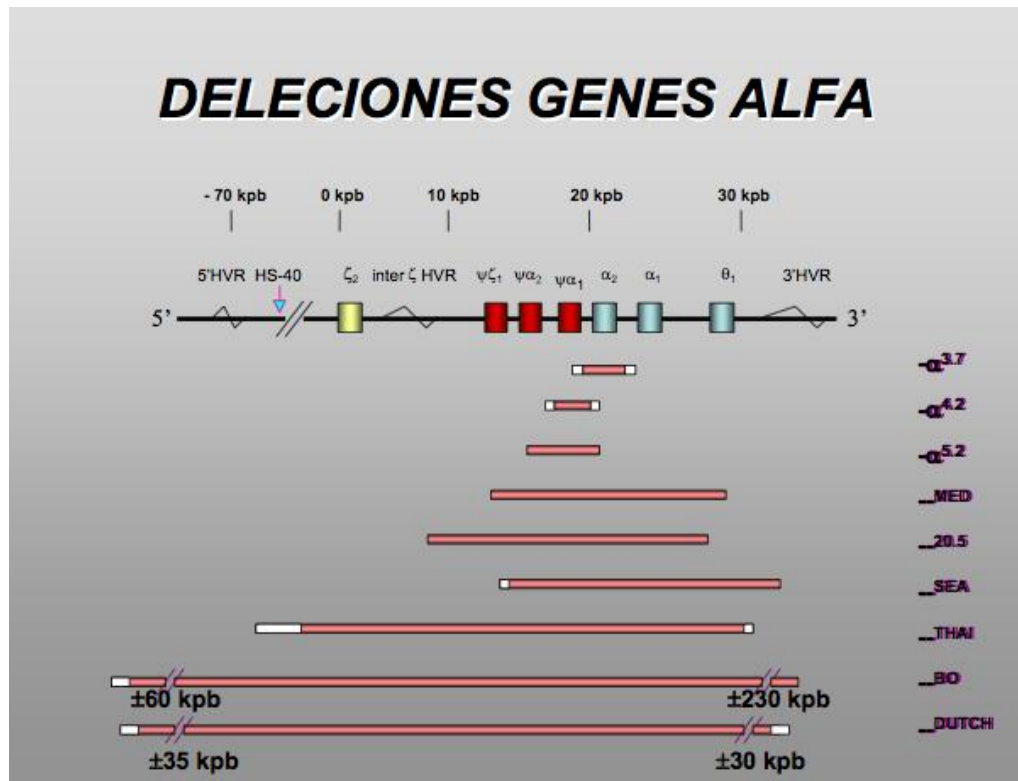


Figura 9. α-talasemia. Relación genotipo-fenotipo, adaptado de Piel FB et al. [37].

En el caso de las α-talasemias, la mayoría de alteraciones que se producen son delecciones de diferentes longitudes que afectan a 1 o a los 2 genes α del cromosoma (figura 10). Las más frecuentes son la delección de un gen α con pérdida de 3'7 kb de ADN (delección *rightward*) que se origina por la desalineación y recombinación recíproca de homólogos entre los cromosomas, lo cual afecta ambos genes a en cis y se forma un gen híbrido ( $\alpha 2 \alpha 1$ ), dejando un solo gen a funcional en un cromosoma ( $-\alpha 3.7 / \alpha \alpha$ ). La otra forma más frecuente de delección es la que afecta al segmento de 4'2 kb de ADN (delección *leftward*). La 3'7 es típica de las áreas árabe, africana y mediterránea mientras que la 4'2 es más típica de la zona oriental [46]. Las α<sup>0</sup>-talasemia presentan pérdida de 2 genes α en el mismo cromosoma: se trata de mutaciones más amplias, que afectan a más pares de bases, lo cual provoca un fenotipo más grave. También causan genotipo α<sup>0</sup> talasemia algunas delecciones que no afectan directamente a los genes α y sin embargo provocan fenotipos de α-talasemia, debido a que se pierde una secuencia reguladora de ADN que controla la actividad ADNasa que regulan la síntesis de cadenas proteicas. Estas se conocen como α-talasemia por delección del elemento regulador HS-40.



**Figura 10. Formas delecionesales en las  $\alpha$ -talasemias**

Mucho menos frecuentes son las  $\alpha$ -talasemias no delecionesales. Representan un 5% de las  $\alpha$ -talasemias y se producen por mutaciones puntuales o pequeñas deleciones que afectan a la transcripción, procesamiento y traducción del ARNm (**figura 11**) [36,86,87]. Estas formas de  $\alpha$ -talasemia suelen ir acompañadas de disminución en la síntesis de cadenas  $\alpha$ -globina más intensas que las observadas en las formas delecionesales. En general obedecen a mutaciones puntuales o deleciones muy cortas y/o inserciones, que implican regiones codificadoras o secuencias reguladoras de la expresión génica. La gran mayoría afectan al gen  $\alpha$ 2-globina y parece que no están asociadas a cambios en la expresión del gen  $\alpha$ 1-globina, al contrario que en la mayoría de las formas delecionesales [37,46,87]. Las mutaciones puntuales pueden alterar diferentes etapas en la expresión de los genes  $\alpha$ -globina pudiendo afectar a la maduración (transcripción, procesamiento-splicing) o traducción del RNAm:

1. Defectos de maduración. Se han descrito 5 mutaciones de este tipo, una de las cuales (deleción de 5 pb en el intron 1 del gen  $\alpha$ 2) se ha descrito en el área mediterránea y es la forma más descrita en éste área. Esta mutación elimina una diana de restricción para la enzima Hph I en el gen  $\alpha$ 2, de ahí su denominación  $\alpha^{\text{Hph}}$ . Se caracteriza por ser una deleción que comprende cinco pares de bases de nucleótidos (TGAGG) situados en el

extremo 5' de la secuencia interpuesta o "*intervening sequence 1*" (IVS-1) e interfiere en el procesamiento normal RNAm del gen  $\alpha 2$  afectando al mecanismo normal de "*splicing*". Otras mutaciones afectan a la señal del poli-A del gen  $\alpha 2$  y modifican el procesamiento del extremo 3' del RNAm. Se ha observado que este tipo de mutaciones van acompañadas también de una incorrecta terminación de la transcripción, lo que interfiere en la expresión del gen  $\alpha 1$ -globina. [37]

2. Defectos de traducción. Se han descrito varias mutaciones que alteran la traducción del RNAm, tres de ellas puntuales que anulan el codón de iniciación (ATG) y otra (deleción de 2 pb) que modifica la secuencia de consenso adyacente a la señal de iniciación y reduce la traducción en el 30-50%. De ellas, la más frecuente en el área mediterránea (y la segunda talasemia no deleción en frecuencia) es la denominada mutación  $\alpha^{\text{Neo}}\alpha$  o  $\alpha\alpha^{\text{Neo}}$ , causada por sustituciones de una base en el codón de iniciación ATG en el gen  $\alpha 2$  (ATG  $\rightarrow$  ACG) y en el gen  $\alpha 1$  (ATG  $\rightarrow$  GTG) respectivamente, lo cual elimina completamente la expresión del gen involucrado. La que implica al gen  $\alpha 2$  es más severa que la del gen  $\alpha 1$  y se evidencia al abolir el sitio de corte de la enzima NcoI:  $\alpha^{\text{Nco}}\alpha$ . Otras mutaciones que producen el cese prematuro de la traducción son las mutaciones sin sentido (*non sense mutations*) con ausencia de la síntesis de globina (GAG  $\rightarrow$  UAG) y las mutaciones con desviación del patrón de lectura (*frameshift mutation*) con aparición de moléculas de globina inutilizables para la síntesis de hemoglobina. Finalmente existe un grupo de mutaciones situadas en el codón de terminación (TAA) que anulan la señal de cese de la traducción del RNAm, con lo que éste no se produce hasta que aparece otra señal en la región 3' dando lugar a un alargamiento de la cadena de  $\alpha$ -globina. Ejemplos de estas mutaciones son las Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Koya Dora y Hb Seal Rock entre otras. Este tipo de hemoglobinas se caracterizan por una disminución en la estabilidad del RNAm, por lo que en los reticulocitos de estos pacientes no se detecta síntesis de cadena  $\alpha$ -globina por parte del alelo mutado a pesar de que tales cadenas parecen ser estables y capaces de formar tetrámeros de Hb. Por ello estas mutaciones, junto con el defecto estructural (alargamiento de la cadena de globina), van acompañadas de una disminución de la síntesis de cadenas  $\alpha$ -globina y fenotipo de  $\alpha$ -talasemia (hemoglobinopatías talasémicas) de las cuales hay descritas en nuestro medio dos: Hb Lleida y Hb Clinic [46,87].

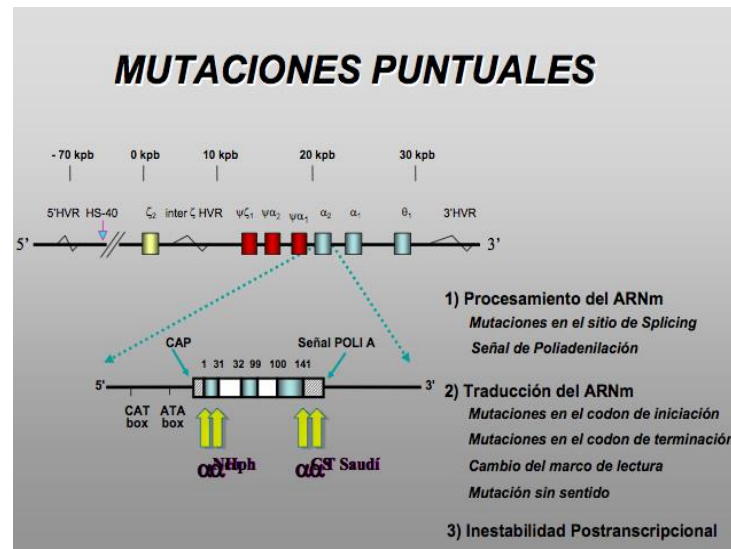


Figura 11. Formas no delecionales en las  $\alpha$ -talasemias.

#### 4.1.2.2. BETA-TALASEMIA.

La  $\beta$ -talasemia está producida por el déficit o ausencia de síntesis de cadenas beta  $\beta$ -globina, situada en el brazo corto del cromosoma 11 (**figura 12**). La herencia de un alelo  $\beta$ -talasémico determina un individuo portador (genotipo heterocigoto) con talasemia menor. La herencia de los 2 alelos mutados (genotipo homocigoto mutado o doble heterocigoto) produce una talasemia mayor; un tercer grupo corresponde a la talasemia intermedia, con manifestaciones clínicas y hematológicas intermedias con respecto a los 2 primeros grupos, en general debidas a genotipos complejos de asociación de distintas mutaciones.

Al contrario que en la  $\alpha$ -talasemia, el mecanismo es predominantemente no delecional, y la gran mayoría se suelen producir por mutaciones puntuales (sustitución de una base nitrogenada por otra que producen cambio de un aminoácido por otro) que alteran los procesos de transcripción, procesamiento o traducción del ARN mensajero (**figura 12**); sólo un pequeño porcentaje es consecuencia de la deleción de fragmentos del gen  $\beta$ -globina o de la adición de nucleótidos. Aunque existen numerosas mutaciones descritas para la  $\beta$ -talasemia y con un mecanismo molecular muy heterogéneo, éstas tienen una distribución característica en cada población que hace que en cada zona existan un grupo de mutaciones (unas 25 mutaciones) que representan la gran mayoría de los alelos  $\beta$ -talasémicos en las poblaciones de todo el mundo y justifican el 90% de las beta talasemias, como se describió en el apartado de epidemiología [80,87,88].

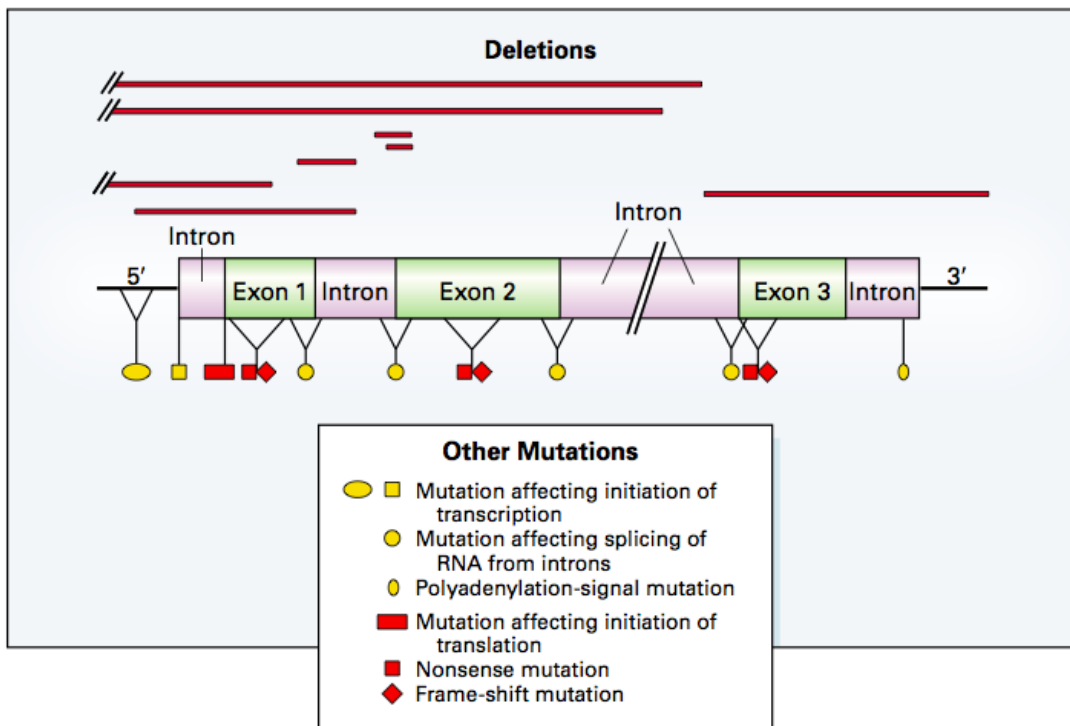
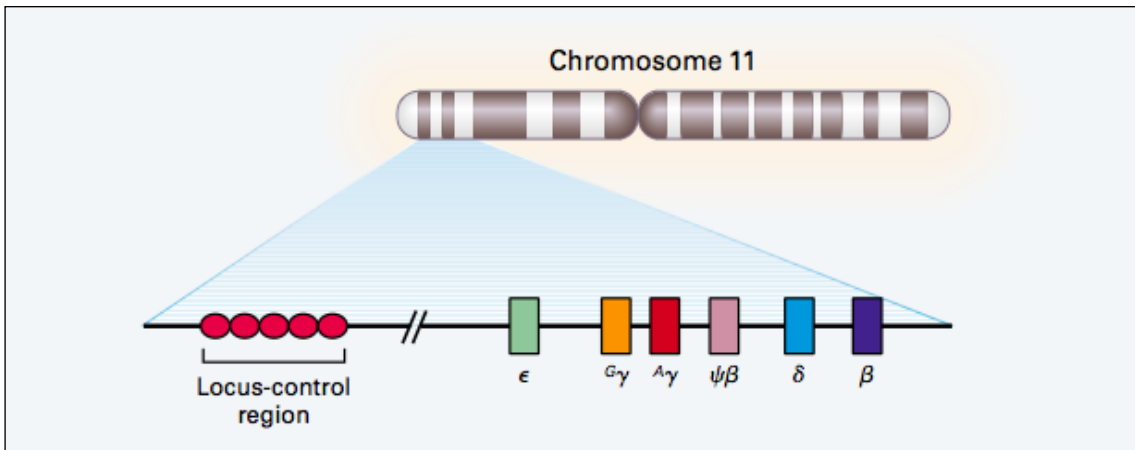


Figura 12. Estructura normal del gen  $\beta$ -globina y las ubicaciones y tipos de mutaciones resultantes en  $\beta$ -talasemia. Adaptado de Olivieri NF et al. [88].

Al igual que en las  $\alpha$ -talasemias, se pueden clasificar según las manifestaciones clínicas o según el defecto molecular que las origina:

a) Clasificación clínica:

1. Rasgo talasémico  $\beta$  o  $\beta$ -talasemia menor: anemia microcítica hipocroma no transfusión dependiente.
2. Talasemia  $\beta$ -intermedia: sujetos con mayor grado de anemia pero que no necesitan transfusiones o sólo de manera esporádica.

3.  $\beta$ -talasemia mayor: debido a mutaciones homocigotas, producen anemia severa dependiente de transfusión y tienen gran repercusión socio-sanitaria.

b) Clasificación genética.

Actualmente hay descritas más de 200 variantes  $\beta$ -talasémicas en el gen que codifica para  $\beta$ -globina, reportadas en la base de datos de mutaciones "Hb Var database" Database issue: D537-541. <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>. Aunque la mayoría son pequeñas mutaciones puntuales de nucleótidos, algunas deleciones también pueden causar  $\beta$ -talasemia y existen también deleciones de gran tamaño, donde el defecto molecular involucra la pérdida de los genes que codifican para  $\delta$  y  $\beta$ -globina (alelos  $\delta\beta$ -talasémicos) [88].

1. Todos los genes  $\beta$ -globina contienen tres exones y dos intrones entre los codones 30 y 31 y 104 y 105, respectivamente. La acción principal de todas las mutaciones es abolir la salida de las cadenas de  $\beta$ -globina ( $\beta^0$ -talasemia) o reducir la salida ( $\beta^+$ -talasemia). Las más de 200 mutaciones diferentes que actúan de esta manera pueden interferir con la acción del gen de  $\beta$ -globina en el nivel transcripcional, en el procesamiento del transcrito primario, en la maduración del RNAm, o en la estabilidad post-transcripcional producto del gen  $\beta$ -globina [88].

MUTACIONES PUNTUALES.

Todas las mutaciones dan como resultado o bien la ausencia de la síntesis de las cadenas de  $\beta$ -globina ( $\beta^0$ -talasemia) o bien una reducción en la síntesis de cadenas  $\beta$ -globina ( $\beta^+$ -talasemia) y se dividen, de acuerdo con su efecto sobre el RNAm en tres grandes grupos:

1. **Defectos de transcripción del RNAm.** Son mutaciones situadas en la región promotora del gen  $\beta$ -globina y pueden afectar a las secuencias conservadas del DNA o a las situadas cerca de las regiones CAP y no traductora (UTR) del extremo 5' terminal del gen. Tienen un fenotipo de  $\beta^+$ -talasemia.

- 1.1 Mutaciones de la región CAP (*CAP site mutations*). Alteran la etapa *capping* de la transcripción del RNAm dando lugar a moléculas de RNAm inestables de las que se traducen solo el 10-25% ( $\beta^+$ -talasemia).

- 1.2 Mutaciones de la región 5'UTR apenas disminuyen la síntesis de globina y en estado heterocigoto pueden ser desapercibidas (hemograma normal, As normal), es la  $\beta$ -talasemia silente.
2. **Defectos de maduración del RNAm.** Los fragmentos del RNAm transcritos de las regiones no codificadoras o intrones (*intervening sequences o IVS*) deben ser eliminados mediante procesamiento o maduración del RNAm (*splicing*). Este proceso es imprescindible para que el RNAm sea leído por ribosomas. Así se producen mutaciones en los sitios de corte y empalme que impiden la eliminación de los intrones y el correcto procesamiento del RNAm. Entre los defectos de maduración del RNAm se encuentran:
- 2.1 Mutaciones que anulan el proceso de escisión (*splice junction mutations*). Estas mutaciones se sitúan en las regiones de contacto entre exones e intrones bloqueando la escisión de las secuencias intrónicas y un cese total de la traducción del RNAm.
- 2.2 Mutaciones que crean nuevas señales de escisión (*mutations creating new splicing signals*). Son sustituciones de bases nitrogenadas que aparecen en el interior de los intrones (IVS) sin afectar a las secuencias de consenso y, cuya única consecuencia es la maduración anómala del RNAm.
- 2.3 Mutaciones que activan señales de escisión crípticas (*enhanced cryptic splice sites mutations*). Son mutaciones situadas en el exón 1, que dan lugar a una activación de secuencias escondidas (crípticas) que de esta forma actúan como dinucleótidos dadores capaces de alterar la escisión del RNAm.
- 2.4 Mutaciones de la región de poliadenilación (*RNA cleavage defect mutations*). Se hallan situadas al final del exón 3 donde reside la llamada región de poliadenilación o poli-A (AATAAA) y elimina uno de los puntos de escisión normal del RNAm. La consecuencia es el alargamiento de la molécula del RNAm, que resulta inestable pero parcialmente traducible ( $\beta^+$ -talasemia).
3. **Defectos de traducción del RNAm.** Se deben a mutaciones situadas en codones de iniciación o terminación de la traducción del RNAm. La transcripción del RNAm se realiza normalmente pero falla su proceso de traducción. Las mutaciones que se producen en el codón de iniciación (ATG) anulan por completo la traducción del RNAm por lo que se las conoce como mutaciones "sin sentido" (*nonsense mutations*), siendo la más frecuente



en el área mediterránea la mutación CD39 (C→T) que en España supone el 50% de las  $\beta$ -talasemias. Otras mutaciones ocasionan desviación del patrón de lectura (*frameshift mutations*) con aparición prematura de un codón de terminación ocasionando el cese prematuro de la síntesis de  $\beta$ -globina ( $\beta^0$ -talasemia).

#### DELECCIONES.

Son muy poco frecuentes y todas ellas se acompañan de una ausencia total de síntesis de  $\beta$ -globina ( $\beta^0$ -talasemia). Existen descritas tres formas:

1. Deleciones de la región promotora LCR. El gen permanece intacto pero sin actividad funcional.
2. Deleciones del gen  $\beta$ -globina. La mejor conocida es la deleción del 619 pb que se extiende desde el IVS-2 hasta el extremo 3' del gen  $\beta$ -globina y se halla restringida a individuos de origen indio o pakistaní ( $\beta^0$ -talasemia).

#### 4.1.2.4. DELTA-BETA-TALASEMIA Y PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL.

La  $\delta\beta$ -talasemia y la persistencia hereditaria de Hb fetal (PHHF) constituyen un grupo heterogéneo de alteraciones raras con distribución mundial, caracterizadas por presentar valores elevados de hemoglobina fetal (HbF) en el individuo adulto. La distinción entre  $\delta\beta$ -talasemia y la PHHF se realiza según el porcentaje de HbF, que en el sujeto heterocigoto con PHHF sobrepasa el 30% y se acompaña de índices hematimétricos próximos a la normalidad, mientras que el heterocigoto  $\delta\beta$ -talasemia tiene una tasa de HbF entre el 5 y el 20% y se acompaña de microcitososis e hipocromía eritrocitaria [80].

Las  $\delta\beta$ -talasemias se clasifican en  $\delta\beta^+$  y  $\delta\beta^0$  talasemias, según el grado de síntesis de cadenas  $\delta$  y  $\beta$  por parte del cromosoma afectado. A su vez, la  $\delta\beta^+$ -talasemia puede clasificarse en:

- $\delta\beta^+$ -talasemia que resultan del intercambio de material genético no homólogo con la producción de variantes globínicas, producto de la fusión de las cadenas  $\delta\beta$ , entre las que destaca la Hb Lepore.

-El segundo grupo obedece a dos mutaciones diferentes que afectan al cluster  $\beta$ -globina, inactivando total o parcialmente el gen  $\delta$  o  $\beta$  y además, pueden incluir mutaciones que aumentan la expresión del gen  $\gamma$ -globina, dando lugar a fenotipos muy parecidos a las formas delecionales de  $\delta\beta^0$ -talasemias.

La  $\delta\beta^0$ -talasemia es debida a largas deleciones que implican al cluster  $\beta$ -globina y eliminan los dos genes  $\delta$  y  $\beta$  dejando intacto un gen  $\gamma$  o los dos por lo que se produce una síntesis compensadora de HbF [87,88].

#### 4.1.2.4. DIAGNÓSTICO DE LAS TALASEMIAS.

El parámetro de laboratorio utilizado para la detección de talasemias es la microcitosis, y se ha empleado para la detección de portadores asintomáticos, puesto que ofrece una buena sensibilidad [89]. Posteriormente debe confirmarse el diagnóstico objetivando el incremento en la HbA2 en el caso de la  $\beta$ -talasemia mediante electroforesis de hemoglobinas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar. Hemos de tener en cuenta que estos estudios no son útiles en recién nacidos, puesto que éstos presentan cifras bajas de Hb A2.

En el caso de las  $\alpha$ -talasemia, también puede aparecer microcitosis pero lógicamente sin aumento de HbA2, por lo que la única forma de diagnosticarlos con seguridad es realizar un análisis directo del gen con técnicas de biología molecular (Southern Blot o PCR) [80,87].

#### 4.2.- ANEMIAS HEREDITARIAS POR DEFECTOS EN LA MEMBRANA DEL HEMATÍE: MEMBRANOPATÍAS.

Las anemias hemolíticas por defectos en la membrana del hematíe constituyen un grupo de anemias hereditarias importante. Aunque existen notables similitudes entre ellas, cada una de ellas presenta determinadas características clínicas, morfológicas, de laboratorio y moleculares. La característica común de estas patologías es que producen una alteración de la forma o de la deformabilidad del hematíe [87].

La membranopatía de mayor interés clínico por su frecuencia es la Esferocitosis Hereditaria (EH), seguida por la Eliptocitosis congénita (EC) y la Estomatocitosis Hereditaria (EsH)[87].

#### 4.2.1.- ESFEROCITOSIS HEREDITARIA (EH).

Engloba un grupo heterogéneo de trastornos congénitos, de diferente gravedad clínica y forma de transmisión familiar, caracterizados por la presencia de hematíes de morfología esférica o esferocitos en las extensiones de sangre periférica que presentan una fragilidad osmótica aumentada.

La membrana del hematíe está formada por una doble capa fosfolipídica y las proteínas integrales y estructurales que constituyen el citoesqueleto. Los defectos en la composición proteínica de la membrana producen desacoplamiento entre la bicapa lipídica y el esqueleto, acarreado la pérdida de la forma del hematíe, se reduce su deformabilidad para el paso por áreas de la microcirculación del bazo y una mayor permeabilidad a cationes. Todo esto condiciona una reducción de la vida del eritrocito. En la mayoría de ocasiones se produce por un déficit de anquirina o de espectrina, y se presenta con un cuadro clínico clásico de ictericia, anemia con reticulocitosis y esplenomegalia, con esferocitos circulantes en sangre periférica. También conocida como enfermedad de Minkowsky-Chauffard, es la anemia hemolítica congénita más frecuente en la raza blanca; su incidencia se ha estimado en 1 por cada 3000 nacimientos en el norte de Europa y 1 de cada 2000 nacimientos en el litoral mediterráneo. Aunque se ha descrito en todas las poblaciones y razas, parece ser menos común en personas de origen afroamericano y del sudeste asiático [90], aunque en la mayoría de casos no se encuentra aún bien documentada [14,91-94].

Los defectos en las proteínas de la membrana eritrocitaria producen una disminución en el área de superficie de la misma con la consiguiente reducción de la ratio área/volumen intracelular; esto condiciona la formación de esferocitos, que son menos deformables y más frágiles, los cuales quedan retenidos en el bazo, donde, debido a su mayor fragilidad osmótica se destruyen y provocan un cuadro de hemólisis (**figura 13**) [92].

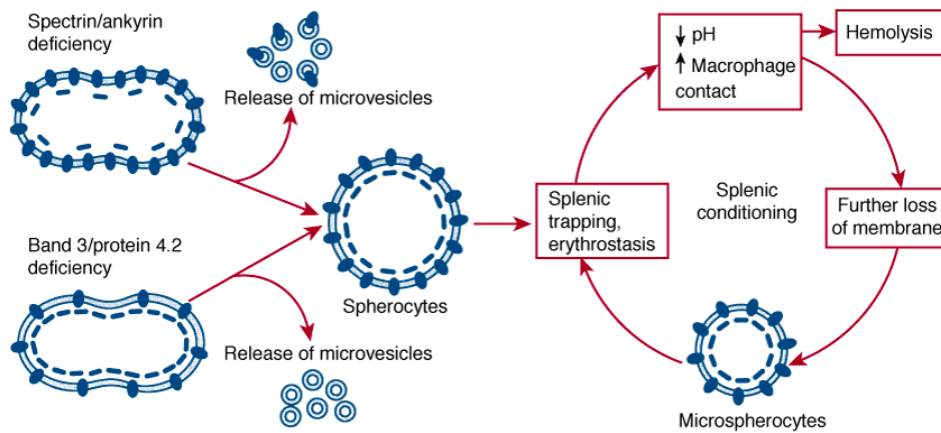


Figura 13. Patogenia de la esferocitosis hereditaria. Adaptado de Perrotta S et al [90].

Aproximadamente 2/3 de los pacientes presentan un patrón de herencia autosómico dominante. También existen patrones autosómicos recesivos y mutaciones de novo [107]. Más raramente se han publicado algunos casos con anemia hemolítica perinatal severa o muerte fetal relacionados con mutaciones homocigotas o dobles heterocigotas que afectan a la banda 3 o a la espectrina [95]. Generalmente, el grado de hemólisis es similar dentro de la misma familia. La mayoría de los casos se producen por defectos de la ankirina, de la beta espectrina y de la banda 3; existen múltiples locus genéticos involucrados. La mayoría son mutaciones privadas [90,96].

El cuadro clínico característico consiste en un cuadro de hemólisis (anemia, reticulocitosis, ictericia, esplenomegalia, cálculos biliares) con presencia de esferocitos con fragilidad osmótica aumentada y antecedentes familiares de un cuadro similar. Se clasifican en leve, moderada o grave en función de la cifra de Hb, bilirrubina y reticulocitos.

El diagnóstico se basa en la historia familiar compatible más el cuadro clínico típico arriba descrito: cuadro de hemólisis o anemia hemolítica no immune, es decir con test de Coombs directo (TCD) negativo, con hiperbilirrubinemia y esplenomegalia. Los datos de laboratorio más destacados son:

- Morfología de sangre periférica: presencia de esferocitos en diferentes grados.
- Índices eritrocitarios: la mayoría de pacientes presentan anemia leve o moderada; característicamente, la CHCM está aumentada, por la relativa deshidratación del hematíe, y el ancho de distribución eritrocitaria aumentado [97].
- El VCM suele ser normal o ligeramente disminuido.

- La fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) está aumentada; esta fragilidad, que a veces no se manifiesta con la sangre fresca en algunos pacientes con EH, se acentúa al incubar la sangre a 37<sup>o</sup> durante 24h, por lo que es el test estándar en el diagnóstico de la EH [98][111].
- Otros tests diagnósticos que presentan mayor sensibilidad, como la ektacitometría de gradiente osmótico, que mide la rigidez de membrana del hematíe; el test de Eosin-5-maleimida (EMA); la electroforesis de las proteínas de la membrana del hematíe en gel de poliacrilamida y en presencia de dodecyl sulfato sódico (SDS-PAGE); o el análisis de DNA por PCR, no se realizan de manera rutinaria por ser muy costosos y se suelen reservar para la confirmación de casos dudosos.

En los casos sin antecedentes familiares el principal diagnóstico diferencial hay que hacerlo con la anemia hemolítica autoinmune (hemólisis con TCD positivo) y con otros defectos de membrana, para lo cual puede ser útil la electroforesis de las proteínas de membrana eritrocitaria.

**Tabla 7. Clasificación de la esferocitosis hereditaria. Adaptado de Eber et al [92].**

Hallazgos laboratorio	Portador asintomático	HS leve	HS moderada	HS moderada/ grave	HS grave
Hb (g/dL)	normal	11-15	8-11	6-8	<6
Reticuloc. (%)	1-2	3-8	±8	≥10	≥10
Bilirrubina (mg/dL)	0-1	1-2	±2	2-3	≥3
Contenido espectralina (% de normal)	100	80-100	50-80	40-80	20-50
Morfología sangre periférica	Normal	Esferocitosis leve	Esferocitosis	Esferocitosis	Esferocitosis y poiquilocitosis
Fragilidad osmótica normal	Normal	Normal/aumentado	Aumentado	Aumentado	Aumentado
Fragilidad osmótica incubada	Aumentada	Aumentada	Aumentada	Aumentada	Muy aumentada

### 4.2.2.- ELIPTOCITOSIS HEREDITARIA (EC).

Al igual que la EH, la EC engloba diversos trastornos que se caracterizan por la presencia de eliptocitos en la sangre periférica. Se produce por déficits de diferentes proteínas de membrana, siendo la más frecuente el déficit de espectrina  $\alpha$  y  $\beta$ , aunque se han identificado alteraciones también en la proteína 4.1 y en Glicoforina C. Todas ellas producen una inestabilidad en la membrana eritrocitaria que conduce a la transformación en eliptocitos.

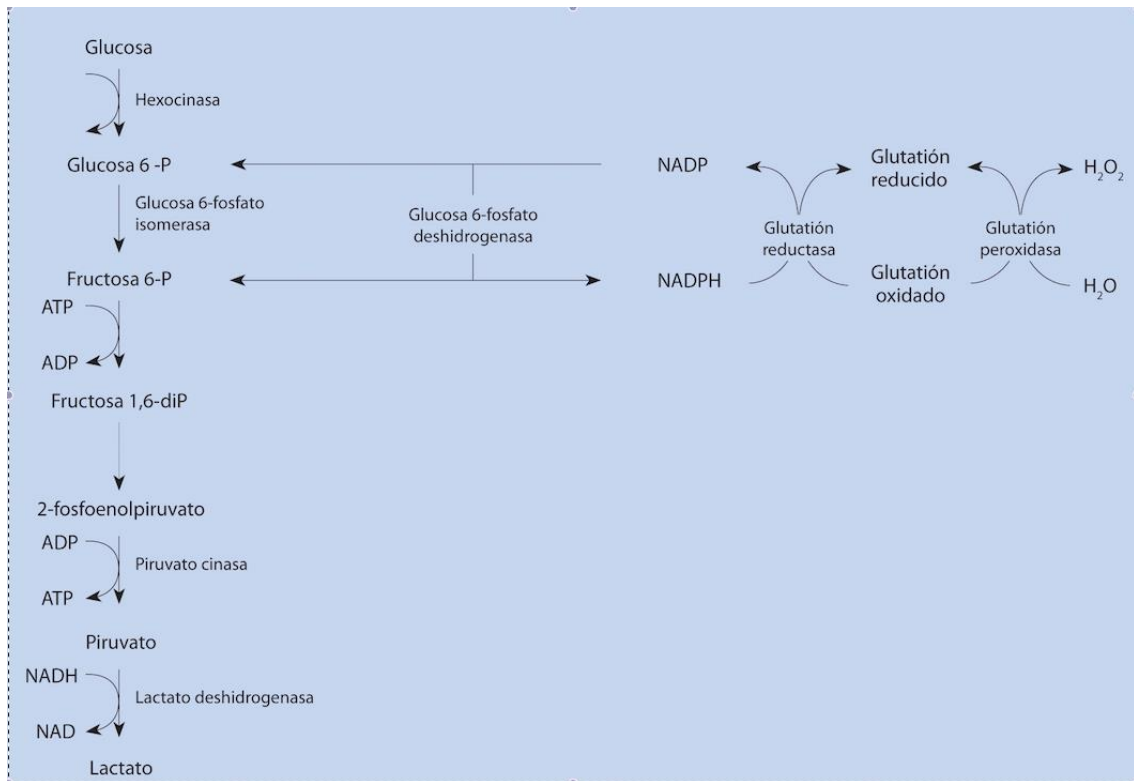
La herencia es autosómica dominante en la mayoría de casos, aunque también se han descrito pacientes con mutaciones de novo. Las características clínicas varían incluso entre pacientes de la misma familia, que oscila desde el portador asintomático (sin anemia, pero que pueden presentar episodios de hemólisis asociados a infecciones, hiperesplenismo, déficit de B12 y otras situaciones) hasta los pacientes con anemia severa y hemólisis crónica. Esto refleja la gran heterogeneidad molecular de esta entidad [98].

### 4.3.- ANEMIAS HEREDITARIAS POR DEFECTOS EN LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO ERITROCITARIO: ERITROENZIMOPATÍAS.

Varios defectos enzimáticos eritrocitarios producen anemias hemolíticas congénitas, siendo los más frecuentes el déficit de G6PDH y el déficit de PK.

#### 4.3.1.- DÉFICIT DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH).

Las crisis hemolíticas desencadenadas por agentes oxidantes son características del déficit de G6PDH. En la ruta metabólica del cortocircuito de las pentosas, se produce nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido (NADPH), reacción mediada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (**Fig. 14**). El NADPH es necesario para mantener el glutatión reducido, que protege la hemoglobina de la acción oxidativa del peróxido de hidrógeno. Cuando disminuye el glutatión reducido, la hemoglobina desnaturalizada precipita (cuerpos de Heinz) y se produce la hemólisis.



**Figura 14. Vías metabólicas intraeritrocitarias. El hematíe necesita energía para mantener sus funciones, siendo la glucosa su único sustrato metabólico. Mediante la glucólisis anaeróbica (vía de Embden-Meyerhof) y el cortocircuito oxidativo de las pentosas, el hematíe obtiene ATP y una serie de productos intermediarios imprescindibles.**

Esta deficiencia enzimática tiene una herencia ligada al cromosoma X, afecta a más de 200 millones de personas en el mundo y es un ejemplo de “polimorfismo equilibrado”, por la ventaja evolutiva de resistencia al plasmodium falciparum en las mujeres heterocigotas, que contrarresta el pequeño efecto negativo de los varones hemicigotos afectados. Se ha clonado y secuenciado el gen responsable y están descritas más de 100 variantes enzimáticas distintas.

Clínicamente, el déficit de G6PDH es responsable de dos síndromes clínicos: una anemia hemolítica episódica intravascular inducida por agentes oxidantes y una anemia hemolítica crónica espontánea no esferocítica. Las tres variantes más frecuentes del enzima que dan lugar a crisis hemolíticas desencadenadas por agentes oxidantes son la africana, la mediterránea y la oriental. Los síntomas aparecen uno o dos días después de haber ingerido las sustancias oxidantes (aspirina, sulfamidas, primaquina, vitamina K, habas frescas, etc.) o de iniciarse una infección vírica o bacteriana. En las formas graves, la anemia intensa puede poner en peligro la vida. Los cuerpos de Heinz aparecen durante las crisis y, como las células que los contienen son eliminadas con rapidez de la circulación, pueden dejar de verse después de 2 ó 3 días. Es frecuente que la primera manifestación de un déficit de G6PD sea en forma de ictericia

neonatal, más aún si a la madre antes del nacimiento o al recién nacido se les administran fármacos oxidantes [4,12,14].

El diagnóstico depende de la demostración de la disminución de actividad del enzima en los eritrocitos, más evidente después de varias semanas del episodio hemolítico, cuando remite la intensa reticulocitosis, porque las células jóvenes poseen una actividad enzimática mayor.

La mejor medida terapéutica es la prevención de los episodios hemolíticos en los pacientes predispuestos evitando la exposición a agentes oxidantes. La esplenectomía en las formas de hemólisis crónica no está generalmente indicada [4,12,14].

### 4.3.2.- DÉFICIT DE PIRUVATOKINASA (PK)

En la deficiencia de piruvato Kinasa (PK) se altera la generación de ATP y los eritrocitos no pueden mantener su contenido de agua y de potasio, se vuelven rígidos y su vida media disminuye. La deficiencia de PK se hereda como un trastorno autosómico recesivo y se debe a mutaciones del gen PKLR localizado en el cromosoma 1q12. Las personas homocigotas presentan reducción marcada de la actividad PK en los eritrocitos o la producción de una enzima anormal con actividad disminuida. Generalmente, se asocia a un síndrome hemolítico crónico, con tasas de hemoglobina entre 8 y 12 g/dl, en general sin necesidad de transfusiones. El diagnóstico precisa la demostración de una marcada reducción de la actividad PK eritrocitaria. En estos pacientes está indicada la esplenectomía [4,12,14].



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 1.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.

---

En el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) se han estudiado las anemias hereditarias desde el año 1978, actuando en muchas ocasiones como Centro de Referencia de la Región de Murcia.

No existen estudios epidemiológicos ni registros oficiales promovidos por los organismos sanitarios competentes de la incidencia y prevalencia de los síndromes anémicos hereditarios en la Región de Murcia, en unas enfermedades que, probablemente, son un grupo de patologías altamente prevalentes en poblaciones de riesgo y cuya importancia está infraestimada desde el punto de vista de Salud Pública.

Por tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que el conocimiento epidemiológico y del espectro mutacional de estas patologías es de gran trascendencia científica y socio-sanitaria ya que sus resultados son claves para desarrollar los registros regionales, los mapas de distribución geográfica e implantar programas de cribado neonatal y evaluarlos como ya se realiza en varias Comunidades Autónomas. Además, estos estudios permiten analizar el impacto que los movimientos migratorios tienen sobre estas patologías, con la enorme trascendencia que estos movimientos tienen actualmente en el sistema nacional de salud y las consecuencias socioeconómicas que una inadecuada planificación puede ocasionar en el sostenimiento del sistema sanitario.

## 2.- OBJETIVOS

---

### **OBJETIVO PRINCIPAL DEL ESTUDIO**

Analizar el perfil epidemiológico y biológico de los pacientes diagnosticados de anemia hemolítica hereditaria en el área de influencia sanitaria del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, el hospital de referencia de la región de Murcia, en un periodo de 19 años (desde el 1 de enero de 1995 hasta el 31 de diciembre de 2013).

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Descripción de las principales alteraciones moleculares de las talasemias en la Región de Murcia.
2. Proporcionar datos clínicos y epidemiológicos que permitan establecer la necesidad de un programa de cribado de anemias hemolíticas hereditarias en nuestra Región.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**



El Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca está dotado de 863 camas, atiende a una población aproximada de 257000 personas y es centro de referencia para estudios de la patología de la serie roja:

- Membranopatías y eritroenzimopatías de toda la Región.
- Hemoglobinopatías y talasemias de las áreas II (Cartagena), III (Lorca), VIII (mar Menor) y IX (Cieza).

Se ha realizado un estudio observacional longitudinal con componente retrospectivo en el que se han evaluado las historias clínicas de los pacientes, adultos y niños, diagnosticados de algún tipo de anemia hemolítica hereditaria en el Servicio de Hematología.

El periodo de reclutamiento ha sido de 19 años: desde el 1 de enero de 1995 hasta el 31 de diciembre de 2013.

## 1.- PACIENTES.

---

Desde Enero de 1995 hasta diciembre de 2002, se revisaron los diagnósticos realizados por año a un total de 444 pacientes. Desde Enero de 2003 hasta diciembre de 2013, se analizaron, además de los diagnósticos, los datos demográficos y analíticos de cada uno de los 1620 pacientes estudiados en ese periodo.

### 1.1.- DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS.

Las variables clínicas y demográficas estudiadas fueron:

1. Sexo
2. Edad al diagnóstico
3. País de origen
4. Etnia
5. Motivo del estudio
6. Diagnóstico
7. Área de salud del paciente

### 1.1.1.- METODOLOGÍA Y BASES DE DATOS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LOS DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS.

Para el estudio de los datos clínicos y demográficos se utilizaron las siguientes fuentes:

- ✓ Registro de estudios de anemia del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Virgen de la Arrixaca: de este registro se seleccionaron los estudios realizados entre 1995 y 2002 que resultaron en un diagnóstico de anemia hemolítica hereditaria.
  
- ✓ Sistema informático de laboratorio (SIL) OMEGA®3000 de Roche Diagnostics, S.L. Basilea. Se trata de un sistema de gestión de laboratorio en el que se recogen los datos analíticos de los pacientes de nuestro centro. Ha estado implantado en el hospital desde el año 2002 hasta el 2013. La selección se realizó mediante la creación de reglas CAR (Conjunto Articulado de Reglas de decisión) para la selección de peticiones que cumplieran los siguientes requisitos:
  - a. Regla 1:  $\beta$ -talasemia 1. Selecciona peticiones con  $HbA_2 > 3,5\%$ , HbF menor de 2% y VCM menor de 80 fL.
  - b. Regla 2:  $\beta$ -talasemia 2. Selecciona peticiones con HbA2 mayor de 3,5% y Hb fetal mayor de 2% con VCM menor de 80 fL.
  - c. Regla 3:  $\delta\beta$ -talasemia. Selecciona peticiones con HbF mayor de 3% y HbA2 menor de 3,5%. Se excluyen los pacientes entre 0 y 9 meses o aquellos con edad desconocida y con aumento de Hb F.
  - d. Regla 4: Hemoglobinopatías: peticiones con electroforesis de hemoglobina anormal (banda anómala).
  - e. Regla 5: peticiones con niveles de G6PDH inferiores a 4,6 U/gr. Hb.
  - f. Regla 6: peticiones con niveles de piruvatokinasa inferiores a 3,7 U/gr. Hb.
  - g. Regla 7: peticiones con genética de cadenas  $\alpha$  globina o  $\beta$  globina.
  - h. Regla 8: Peticiones con RGO normal o RGO incubada alteradas.
  
- ✓ La estación clínica Selene, de Siemens®. Selene es el software informático del Sistema de Información Hospitalario Corporativo del Servicio Murciano de Salud. A través de la misma se contrastaron los datos de la nacionalidad, NHC y domicilio (código postal).
  
- ✓ Página web del Instituto Nacional de Estadística (INE).



Una vez recogidas todas las peticiones que cumplieran alguna de las reglas CAR establecidas, se revisó cada una de ellas, incorporando a una base de datos todos los pacientes en los que se confirmase el diagnóstico de algún tipo de anemia hereditaria, añadiendo todos los datos demográficos y biológicos que faltasen. Se rechazaron todas aquellas que no mostraron resultados concluyentes.

Se revisó la historia clínica de los pacientes incluidos y se recogieron los siguientes ítems:

1. Nº de Historia Clínica (NHC): a través del SIL y Selene. En el caso de no disponer del mismo, se identificó con un NHC provisional asignado por el SIL. Este número ha sido utilizado como campo clave en la base de datos, para evitar estudios duplicados.
2. Código postal: a través del SIL y Selene se recogió el código postal que figurase en la historia clínica, según la localidad de residencia.
3. Área de Salud: Son las estructuras responsabilizadas de la gestión de los centros y establecimientos del Servicio de Salud en su demarcación territorial y de las prestaciones y programas sanitarios a desarrollar por ellos. En la Región de Murcia cada una de ellas dispone de una Gerencia única responsable de la gestión de los recursos de atención primaria y especializada. Hasta el año 2009 incluido había 6 áreas de salud, y a partir de 2010 se ampliaron a 9.

En el proceso de recogida de datos se dividió la procedencia de los estudios de anemia por Áreas de Salud, atendiendo al mapa sanitario vigente desde el año 2009 (**figura 15**). El procedimiento utilizado fue mediante el registro del código postal y posteriormente la comprobación del área a la que pertenecía cada código postal. La población atendida en cada área se consultó en las siguientes fuentes:

- a) Servicio de Planificación y Financiación Sanitaria. Dirección General de Planificación Sociosanitaria, Farmacia y Atención al Ciudadano. Consejería de Sanidad y Política Social.
- b) Centro Regional de Estadística de Murcia (CREM), Padrón Municipal de Habitantes a 1 de enero de cada año, disponibles en [www.carm.es/econet/sicrem/PU\\_padron/](http://www.carm.es/econet/sicrem/PU_padron/)

- c) Base de Datos del Usuario (BDU) de D.G. Asistencia Sanitaria del Servicio Murciano de Salud; recoge la población con TSI (Tarjeta Sanitaria Individual).

**Tabla 8. Áreas sanitarias de la Región de Murcia desde el año 2010.**

ÁREA SALUD	ZONA Y HOSPITAL DE REFERENCIA	Código asignado
	DESCONOCIDO	0
I	ARRIXACA: MURCIA OESTE	1
II	CARTAGENA (H. SANTA LUCÍA)	2
III	LORCA (H. RAFAEL MENDEZ)	3
IV	NOROESTE (H. COMARCAL DEL NOROESTE)	4
V	ALTIPLANO (H. VIRGEN DEL CASTILLO)	5
VI	VEGA MEDIA DEL SEGURA (HGU MORALES MESEGUER)	6
VII	MURCIA ESTE (HGU REINA SOFÍA)	7
VIII	MAR MENOR (HGU LOS ARCOS)	8
IX	CIEZA: VEGA ALTA DEL SEGURA	9
	OTROS: FUERA DE LA REGION	10



**Figura 15. Mapa sanitario de la región de Murcia desde el año 2010.**

4. Fecha de nacimiento. A través del SIL y Selene.
5. Fecha de diagnóstico:

- a) En el caso de encontrar más de un estudio de anemia para un mismo paciente, se seleccionó el más antiguo para la recogida de datos y se descartó el resto salvo que hubiera pruebas adicionales (por ejemplo, genética de cadenas de globina) en cuyo caso se añadió al estudio inicial.
  - b) En el caso que un paciente tuviera más de un estudio pero fuera el último el que dio el diagnóstico definitivo (por ejemplo  $\alpha$ -talasemia que se diagnosticó por estudio genético con electroforesis y estudios de anemia previos no diagnósticos) se dio como fecha de diagnóstico la de la prueba diagnóstica definitiva.
6. Edad al diagnóstico. En el caso de encontrar más de un estudio de anemia para un mismo paciente, se seleccionó el más antiguo para referir la edad.
7. País de origen. Se obtuvo mediante el siguiente procedimiento:
- a) Se consultó a través de la plataforma Selene, en los datos demográficos y en los informes médicos.
  - b) En el caso de que no se encontrasen disponibles, se utilizó el aplicativo de nombres y apellidos de la página web del Instituto Nacional de Estadística (**figura 16**) [99,100] (<http://www.ine.es/apellidos/inicio.do> y <http://www.ine.es/tnombres/inicio.do>). Esta herramienta permite conocer la frecuencia de un apellido del colectivo al que hace referencia. La búsqueda se puede realizar por provincia de residencia, por provincia de nacimiento o por nacionalidad. No se muestran los resultados de nombres o apellidos cuya frecuencia es inferior a 5 para el total nacional por secreto estadístico. Los datos se han extraído de la estadística del Padrón Continuo a fecha de 01/01/2014. En nuestro caso, la búsqueda se realizó por nacionalidad; si el apellido consultado aparecía como procedente de un solo país, se asignaba dicho país al sujeto estudiado. En el caso de que se obtuviera más de un país, se asignaba la etnia pero el país de origen quedaba en el grupo 0: desconocido.

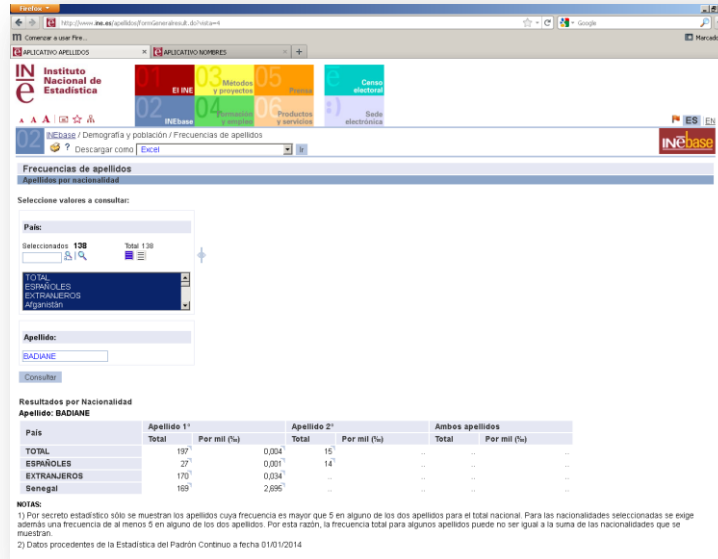


Figura 16. Aplicativo de apellidos del INE ([www.ine.es/apellidos](http://www.ine.es/apellidos))

8. Etnia. Se obtuvo a través de los informes médicos y de los datos de filiación de la seguridad social, así como del aplicativo del Instituto Nacional de Estadística arriba descrito [99]. Se dividió en 7 grupos:

- a) Grupo 0: desconocido
- b) Grupo 1: Caucásica,
- c) Grupo 2: Árabe, refiriéndose a los pacientes procedentes de países de África del norte,
- d) Grupo 3: Negra, para los pacientes de África subsahariana,
- e) Grupo 4: Asiática,
- f) Grupo 5: Indígena americana o latinoamericana, para referirse a los pacientes de Centro y Sudamérica.

9. Motivo del estudio: se consignó si era estudio familiar o por otros motivos.

### 1.2.- DATOS ANALÍTICOS.

Los datos analíticos estudiados recopilados fueron:

- 1) Parámetros de serie roja del hemograma, reticulocitos y porcentaje de reticulocitos.

- 2) Perfil ferrocínético: hierro (Fe), ferritina (Ftna), transferrina (CT), índice de saturación de la transferrina (IST).
- 3) Ácido fólico y vitamina B12 en suero.
- 4) Tiempo de lisis en glicerol.
- 5) Niveles de Niveles de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
- 6) Niveles de piruvato kinasa.
- 7) Electroforesis de hemoglobina, cuantificación de HbA2, cuantificación de HbF, otras bandas de Hb patológica.
- 8) Estudios moleculares: análisis de las principales alteraciones moleculares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  globina.

Los intervalos de normalidad valores de cada prueba han sido los establecidos por nuestro laboratorio en cada momento (laboratorio sometido a acreditación ENAC mediante la norma UNE EN ISO 15189 a partir de 2009. Ver alcance en [www.enac.es](http://www.enac.es)).

En el caso de que en el estudio de anemia no estuviese reflejado alguno de los datos requeridos, se recogieron de las analíticas de los 3 meses previos y posteriores al mismo. Los datos de la genética se recogieron siempre, independientemente del tiempo que hubiera pasado desde el estudio de anemia.

### **1.3.- DIAGNÓSTICOS.**

Los diagnósticos se estratificaron en 4 bloques (**tabla 9**). La PHHF se incluyó dentro de las talasemias [87].

**Tabla 9. Tabla de diagnósticos de AHH.**

ENZIMOPATÍAS	<p>1.1. déficit de piruvatocinasa eritrocitaria</p> <p>1.2. déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa eritrocitaria</p> <p>1.3. otros déficits enzimáticos</p>
MEMBRANOPATÍAS	<p>1.1. esferocitosis hereditaria</p> <p>1.2. eliptocitosis congénita y otras alteraciones de membrana</p>
TALASEMIAS	<p>1.1. <math>\alpha</math>-talasemia</p> <p>1.1.1. <math>\alpha</math>- talasemia heterocigota. Rasgo silente.</p> <p>1.1.2. <math>\alpha^0</math> talasemia homocigota. Rasgo talasémico</p> <p>1.1.3. <math>\alpha^0</math> talasemia heterocigota.</p> <p>1.1.4. Hemoglobinopatía H</p> <p>1.1.5. Hemoglobinopatía Bart.</p> <p>1.1.6. <math>\alpha</math>-talasemia no delecional.</p> <p>1.2. <math>\beta</math>-talasemia</p> <p>1.2.1. <math>\beta</math>-talasemia minor</p> <p>1.2.2. <math>\beta</math>-talasemia intermedia</p> <p>1.2.3. <math>\beta</math>-talasemia mayor</p> <p>1.3. <math>\delta\beta</math>-talasemia heterocigota</p> <p>1.4. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal</p>
HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES	<p>1.1. Hemoglobinopatía S</p> <p>1.2. Hemoglobinopatía C</p> <p>1.3. Otras hemoglobinopatías.</p> <p>1.3.1. Otras hemoglobinas anómalas</p> <p>1.3.2. Hemoglobinopatías talasémicas: HbE, Hb CS, Hb Lepore; Hb Knossos.</p> <p>1.3.3. Estados dobles heterocigotos: talasemia-hemoglobinopatía; dobles hemoglobinopatías</p> <p>1.3.4. Hemoglobinas inestables</p> <p>1.3.5. Metahemoglobinemia</p>

## 2.- MÉTODOS DE ESTUDIO/DIAGNÓSTICOS DE LABORATORIO.

### 2.1.- INDICACIONES PARA EL DESPISTAJE DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS.

En nuestro laboratorio, las indicaciones para realizar un estudio de anemia hemolítica durante el proceso de un estudio de anemia son cualquiera de los siguientes hallazgos:

- Anemias microcíticas hipocromas no ferropénicas
  - Anemias hemolíticas crónicas
  - Anemias hemolíticas agudas de causa no inmune.
  - Anemia inducida por fármacos
  - Poliglobulia y/o cianosis en pacientes jóvenes
  - Síndrome de hidropesía fetal de origen incierto
  - Crisis vaso-oclusivas de origen incierto en pacientes procedentes de zonas endémicas de HbS y HbC.
- Prevención en familiares o diagnóstico en los cónyuges para recibir consejo genético.

### 2.2.- PROTOCOLO DE ESTUDIO DE ANEMIA EN EL LABORATORIO DE ERITROPATOLOGÍA DEL HCUVA.

En nuestro laboratorio, dentro de nuestro protocolo de estudio de anemia, disponemos de un algoritmo de estudio inicial de anemia en el que realizamos una batería de pruebas básicas según el tipo de anemia (ver **figura 17**). En esta primera etapa se realiza:

- ✓ **Hemograma** completo con recuento absoluto y porcentual de reticulocitos. El recuento de reticulocitos se realiza de manera automatizada con los mismos analizadores con que se realiza el hemograma desde el año 2000. En los estudios anteriores se realizó mediante tinción supravital con azul de cresil. Durante el periodo del presente estudio hemos utilizado los siguientes analizadores: XN (Sysmex, Roche Diagnostics) y Cell Dyn (3700, 4000 y Sapphire, Abbott SA).
- ✓ **Morfología celular:** Se realiza extensión de sangre periférica y tinción con May-Grumwald-Giemsa. Se revisan las tres series hematopoyéticas haciendo especial énfasis

en la serie roja, buscando alteraciones en la forma, tamaño o coloración de los hematíes.

- ✓ **Bioquímica automatizada:** se realiza la siguiente batería de pruebas: parámetros ferrocinéticos (sideremia, ferritina, transferrina, índice de saturación de la transferrina), parámetros de hemólisis (bilirrubina indirecta, LDH y haptoglobina) y vitaminas (vitamina B12 y ácido fólico).

- ✓ **Test de Coombs Directo**

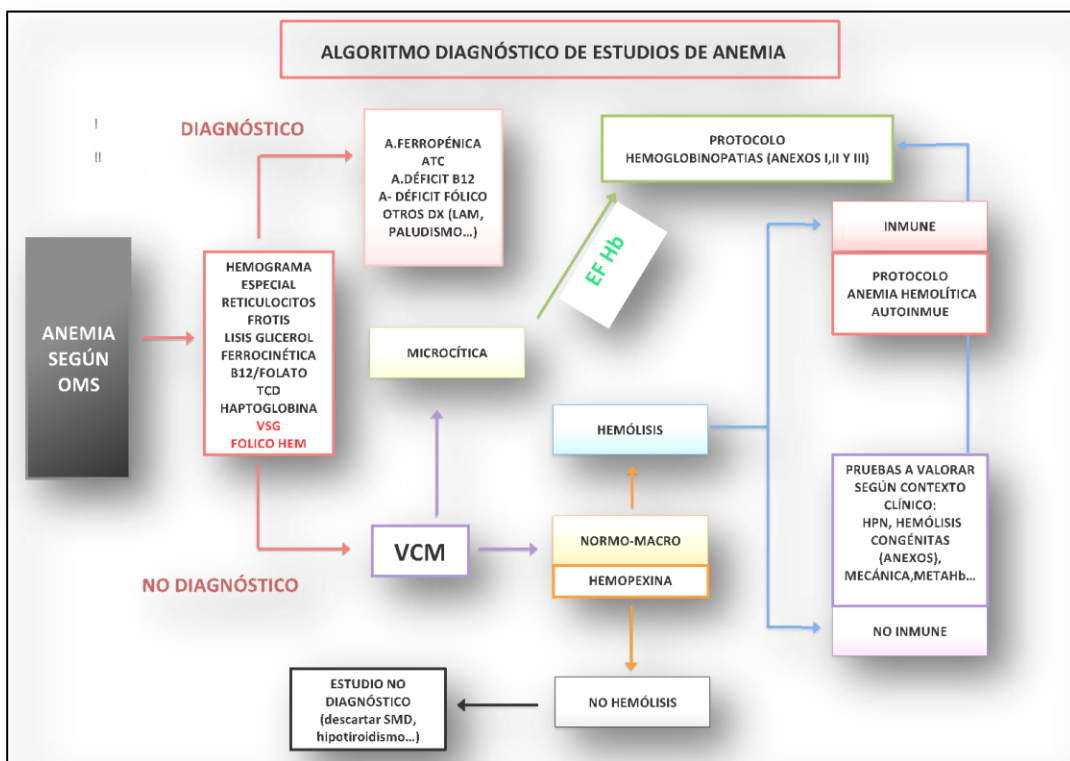


Figura 17. Algoritmo inicial ante todo estudio de anemia.

En el caso de objetivar microcitosis sin ferropenia o normo-macroцитosis con hemólisis no inmune asociada se realiza electroforesis de hemoglobina mediante la técnica disponible en ese momento (ver **figuras 18 y 19**) que han sido la inmunodifusión radial (hasta el año 1998), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC según variant hemoglobin testing system, BioRad, desde 1998 hasta 2010) o electroforesis capilar (MiniCap de Sebia, desde 2010 en adelante). En el caso de identificar una o varias fracciones de hemoglobina anómalas se procede a la identificación de las mismas (**figura 18**). En caso de ser necesario para su identificación, además



se realizaba electroforesis en acetato de celulosa a diferentes pH (medio ácido y alcalino) para su identificación. Por ultimo, en el caso de no lograr identificar la banda anómala, se enviaba a un Centro de Referencia a nivel Nacional.

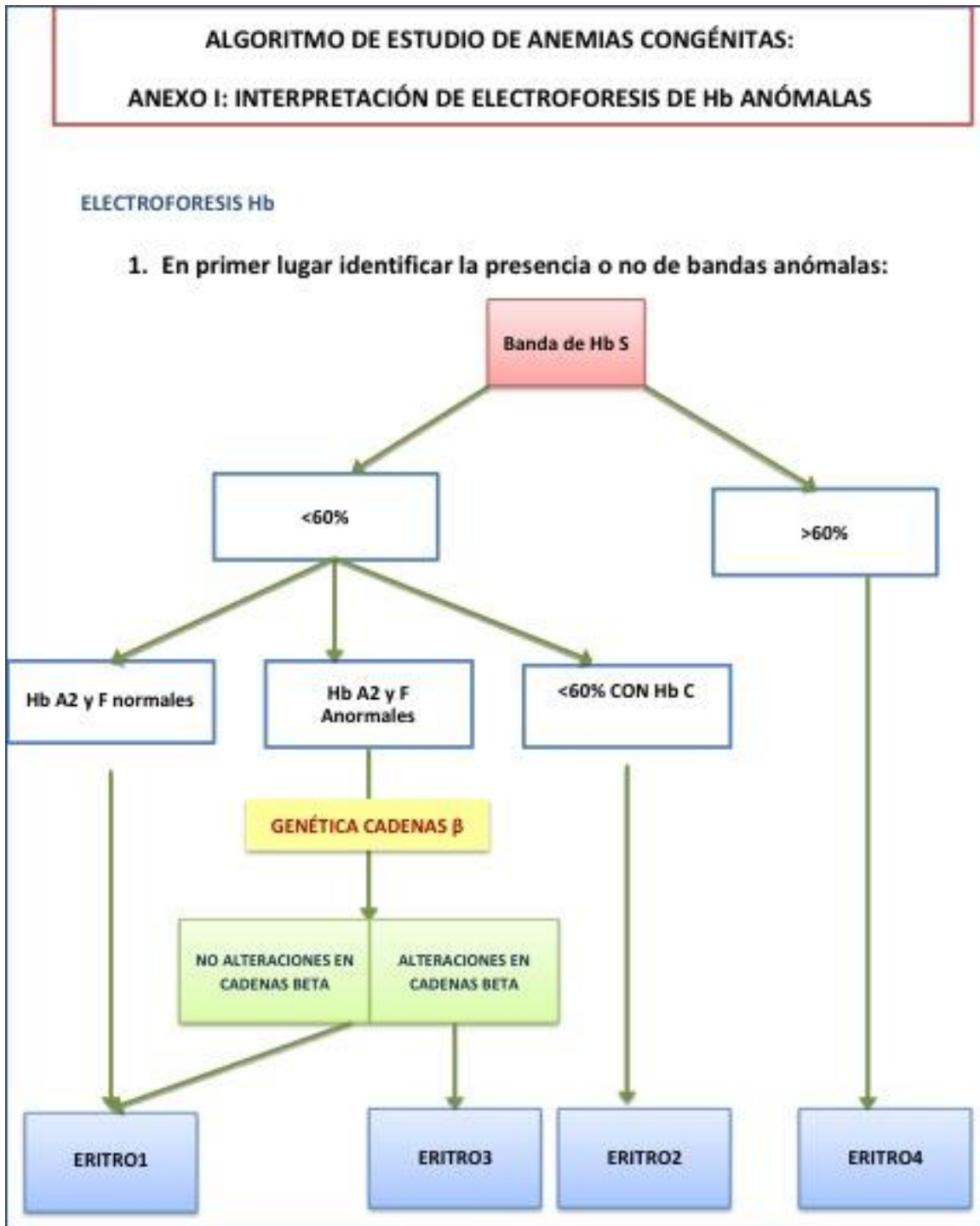


Figura 18. Protocolo de estudio de hemoglobinopatías. Interpretación de electroforesis de hemoglobina patológica con banda de HbS. ERITRO1: Rasgo drepanocítico. ERITRO2: Estado doble heterocigoto (Hemoglobina S y C). ERITRO3: Estado doble heterocigoto (Hemoglobina S y  $\beta$ -talasemia). ERITRO4: Drepanocitosis homocigota.

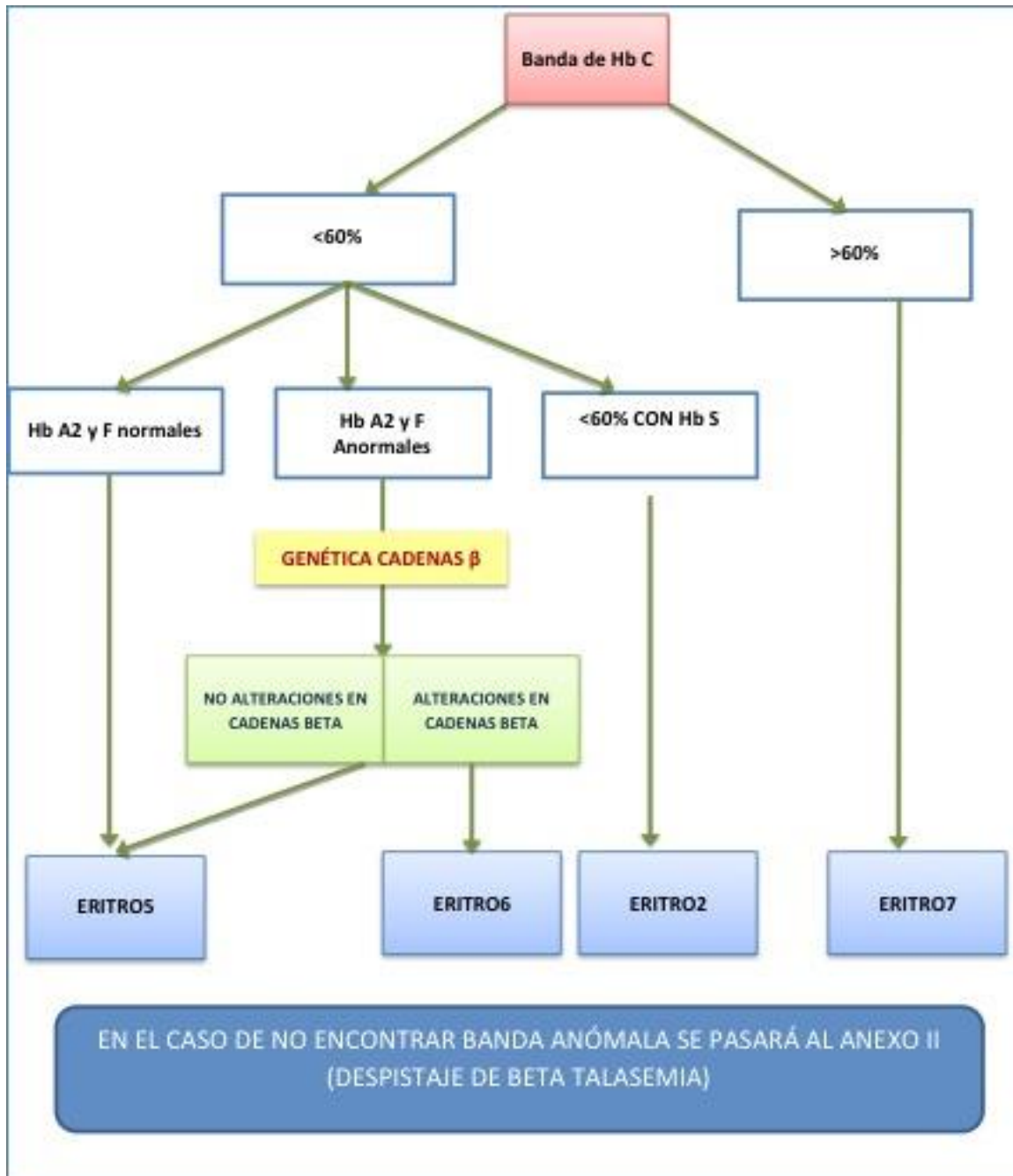


Figura 19. Protocolo de estudio de hemoglobinopatías. Interpretación de electroforesis de hemoglobina patológica con banda de HbC. ERITRO2: Estado doble heterocigoto (Hemoglobina S y C). ERITRO5: Hemoglobina C heterocigota. ERITRO6: Estado doble heterocigoto (Hemoglobina C y  $\beta$ -talasemia). ERITRO7: Hemoglobinopatía C homocigota.

Si no se objetiva ninguna fracción anómala y aparece un aumento de la HbA2 y/o fetal, se realiza despistaje de talasemias (figuras 20, 21, y tabla 10). El despistaje de talasemias se realiza en pacientes con VCM disminuido en los que se ha descartado ferropenia y que presentan un recuento de hematíes normal o aumentado. En casos dudosos con electroforesis

negativa y ferropenia asociada, se recomendaba repetir la prueba una vez corregido el déficit. En el caso de obtener una fracción de Hb A2 y/o Hb fetal elevadas, se procedía a su clasificación según la tabla de diagnóstico (**tabla 10**).

**Tabla 10. Criterios para el diagnóstico de talasemia  $\beta$  y  $\delta\beta$ . Adaptada de Vives-Corróns et al. [87]**

	SUBTIPO	GENOTIPO	Hb	VCM	HbA	HbA2	HbF	OTRAS Hb
TALASEMIA MINIMA	$\beta$ -Tal. minima	$\beta$ silente/ $\beta$	N	N	N	N	N	NO
TALASEMIA MENOR	$\beta$ -Tal. "minor"	$\beta^+$ / $\beta$	N o ↓	↓	N	3-7%	<2%	NO
		$\beta^0$ / $\beta$	N o ↓	↓	N	3-7%	<2%	NO
	$\delta\beta$ -Tal. Heterocigota.	$\delta\beta^+$ / $\beta$	↓	↓	70-90%	2.5-3%	5-20%	NO
		$\delta\beta^0$ / $\beta$	↓	↓	70-90%	2.5-3%	5-20%	NO
Hb-Lepore heterocigota	$\delta\beta^L$ / $\beta$	N o ↓	↓	N	<2%	1-3%	Hb <sup>L</sup> =5-15%	
TALASEMIA INTERMEDIA	$\beta$ -Talasemia Intermedia homocigota (negros)	$\beta^+$ / $\beta^+$	↓↓	↓	5-10%	5-8%	40-80%	NO
		$\beta^0$ / $\beta$	↓	↓	70-90%	>3.2%	2-10%	NO
	Estados dobles heterocigotos	$\beta^+$ / $\delta\beta^0$	↓↓	↓↓	20-30%	<2%	>5%	NO
		$\beta^0$ / $\delta\beta^+$	↓↓	↓↓	-	-		NO
		$\beta^+$ / $\delta\beta^+$	↓↓	↓↓	-	-		NO
		$\beta^0$ / $\delta\beta^0$	↓↓	↓↓	0%	<2%	60-90%	NO
$\beta^0$ o $\beta^+$ / $\delta\beta^L$	↓↓	↓↓	N	<2%	5-10%	Hb <sup>L</sup> =2-5%		
TALASEMIA MAYOR	$\beta$ -Talasemia mayor homocigota (mediterránea)	$\beta^0$ / $\beta^0$	↓↓↓	↓↓	0%	1-8%	>94%	NO
		$\beta^+$ / $\beta^+$	↓↓↓	↓↓	20-30%	3-9%	20-90%	NO
	Estados dobles heterocigotos	$\beta^+$ / $\beta^0$	↓↓↓	↓↓	0%	1-3.5%	<75%	NO
$\delta\beta^L$ / $\delta\beta^L$	↓↓↓	↓↓	0%	0%	70-90%	Hb <sup>L</sup> =8-30%		

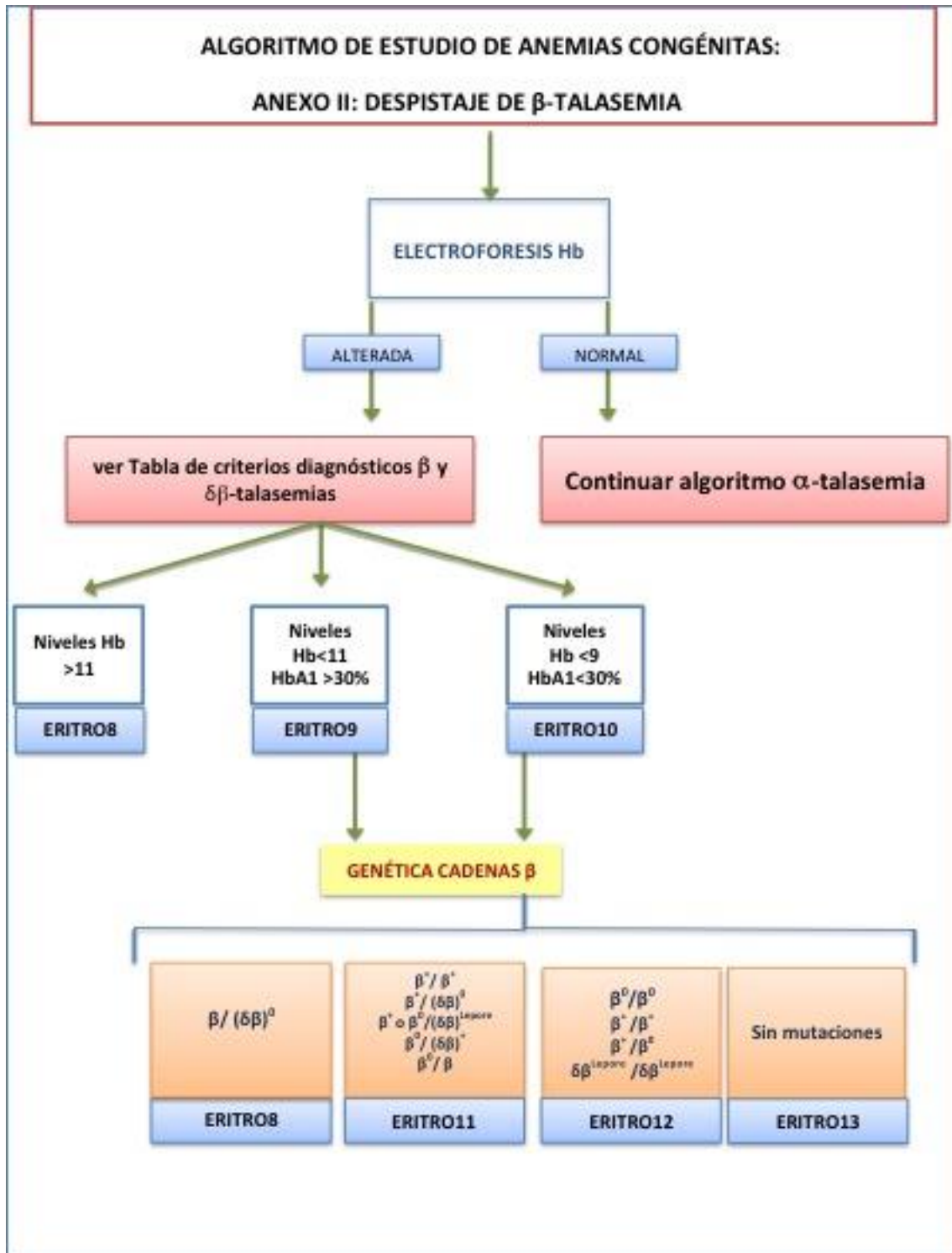


Figura 20. Algoritmo de estudio de anemias hemolíticas congénitas: despistaje de  $\beta$ -talasemia. ERITRO8:  $\beta$  o  $\delta\beta$  talasemia menor. ERITRO9: fenotipo  $\beta$ -talasemia intermedia. ERITRO10: fenotipo  $\beta$ -talasemia mayor. ERITRO11:  $\beta$ -talasemia intermedia [especificar mutación]. ERITRO12:  $\beta$ -talasemia mayor [especificar mutación]. ERITRO13: no se han identificado mutaciones en las cadenas  $\beta$ -globina.



Figura 21. Algoritmo de estudio de anemias hemolíticas congénitas: despistaje de  $\alpha$ -talasemia.

ERITRO11:  $\alpha^+$ -talasemia, rasgo silente. ERITRO12:  $\alpha^0$ -talasemia, talasemia menor. ERITRO13: Hemoglobinopatía H.

ERITRO14: No se han identificado mutaciones en el gen  $\alpha$  globina.

En el caso de no identificar ninguna fracción anómala, con patron ferrocínético que descarta ferropenia, se procede a realizar el estudio molecular de la cadena  $\alpha$ -globina. Si se identifica una banda anómala diferente a la HbA2 o Fetal, se procede a la identificación de la hemoglobinopatía en cuestión; si no se identifica con la electroforesis inicial, mediante la realización de otra electroforesis complementaria (EF ácida o HPLC).

En el caso de las hemoglobinopatías, se suelen remitir ante cuadro de hemólisis no explicada, sobre todo en pacientes extranjeros, para estudio de familiares y/o cónyuges o por alteraciones de la serie roja observadas en la morfología celular. En estos casos se realiza electroforesis independientemente de los resultados del hemograma.

Una vez estudiados los parámetros iniciales, si está indicado se realizan las pruebas específicas para el diagnóstico de anemia hemolítica hereditaria. En función de la orientación clínica y los resultados iniciales, se procede de manera escalonada a realizar las técnicas que se exponen a continuación. En la sección 2.3 se describen detalladamente estas técnicas.

### 2.3.- DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ESTUDIO DE ANEMIA UTILIZADAS EN EL LABORATORIO DE ERITROPATOLOGÍA.

#### 2.3.1.- TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MEMBRANOPATÍAS.

En todos los estudios de anemia realizamos el tiempo de lisis en glicerol como parte del estudio inicial en todos los pacientes. En el caso de observar tiempo de lisis acortado con criterios de hemólisis (aumento de bilirrubina y LDH, disminución de haptoglobina), si se identifican esferocitos en la morfología celular y/o CHCM aumentada, se realiza el test de fragilidad osmótica eritrocitaria (FO) como test diagnóstico de esferocitosis hereditaria.

##### 2.3.1.1. LISIS EN GLICEROL.

Fundamento. Es la técnica de *screening* para la esferocitosis hereditaria. Consiste en medir con un espectrofotómetro el tiempo que tardan en lisarse los hematíes sometidos a un cambio osmótico al añadir glicerol. La cinética de la hemólisis se registra como la disminución de la absorbancia a 620 nm. Los resultados se expresan como GLT50: tiempo que tarda en producirse el 50% de la hemólisis de los hematíes al ser incubados con una solución acidificada de glicerol [101].

##### Equipos, especímenes y reactivos utilizados:

- ✓ Espectrofotómetro UV 1603. SHIMADZU CORPORATION (Japan).
- ✓ Sangre de un tubo de EDTA o de heparina.
- ✓ Glicerol, agua destilada.

En nuestro laboratorio consideramos normal un tiempo de:  $36'' \pm 8''$  (28-44''). Como se aprecia en la **tabla 11** es una prueba con baja sensibilidad y especificidad por lo que en nuestro laboratorio solo la utilizamos como método de "screening".

**Tabla 11. Comportamiento del tiempo de lisis en glicerol en distintas situaciones.**

ALARGAN EL TEST	ACORTAN EL TEST	SIN SIGNIFICACIÓN
Talasemias "minor"	Esferocitosis hereditaria	Insuficiencia renal crónica
Anemias ferropénicas	Elitptocitosis	Paraanemias diversas
Anemias normocíticas inespecíficas	Gestación	AHAI (aunque sí es más corto que el normal)
Anemias macrocíticas y megaloblásticas		
Hemoglobinopatías		
Pancitopenias aplásticas		
Sangre de cordón		

### 2.3.1.2. FRAGILIDAD OSMÓTICA (FO) O RESISTENCIA GLOBULAR ERITROCITARIA (RGO).

La membrana del hematíe es semipermeable (es decir, que deja pasar libremente el agua pero no los demás solutos). Por ello cuando el eritrocito se incuba en un medio hipertónico, pierde agua y se deshidrata y cuando se incuba en un medio hipotónico, se hiperhidrata. Si la hipotonía del medio supera cierto límite, se puede romper la membrana y producirse hemólisis.

La intensidad de la hemólisis depende del grado de hipotonía del medio, de modo que siempre existe cierto número de eritrocitos de aguantar esta hipotonía, excepto cuando ésta es absoluta (agua destilada), en que la hemólisis es del 100%. La medida de la capacidad de una población de eritrocitos para resistir el efecto hipotónico del medio se denomina resistencia o fragilidad globular osmótica. En determinadas situaciones, como la esferocitosis hereditaria, los hematíes son osmóticamente más frágiles y la hemólisis ocurre en presencia de una hipotonía menor (a concentraciones salinas mayores).

Con esta prueba exponemos a los hematíes a soluciones crecientes de cloruro sódico y mediante un espectrofotómetro medimos la Hb liberada tras su lisis, determinando así su capacidad de resistir el efecto hipotónico del medio [102]. En la **figura 22** se muestran las curvas y valores de referencia de ambas.

En nuestro laboratorio se realiza directamente la prueba normal (FON) e incubada (FOI) a los pacientes con hemólisis que son remitidos por estudio familiar.

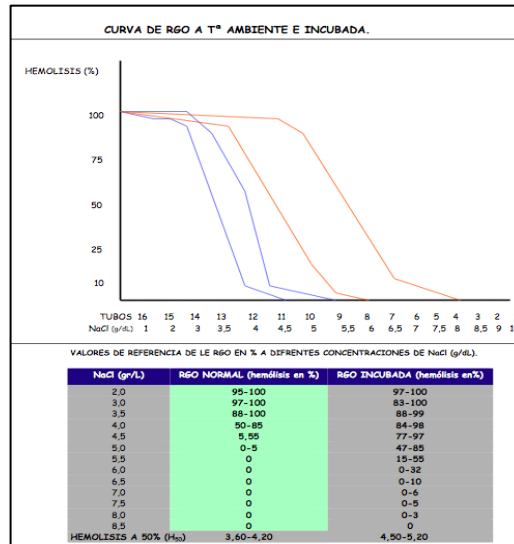


Figura 22. Curvas y valores de referencia de la FON y FOI

La sensibilidad de esta prueba es del 71,4% y la especificidad del 74,1% por lo que no es una prueba diagnóstica definitiva de EH (ver **tabla 12**) sino que en nuestro laboratorio para establecer el diagnóstico definitivo de EH tenemos que tener un cuadro clínico compatible con o sin antecedentes familiares, parámetros de hemólisis con test de coombs directo negativo y una prueba de fragilidad osmótica positiva.

Tabla 12. Condiciones que aumentan y disminuyen la RGO

Disminuyen la RGO	Aumentan la RGO
Esferocitosis hereditaria	Talasemias
Estomatocitosis hereditaria	Hemoglobinopatías
Anemia hemolítica autoinmune	Anemias ferropénicas
Anemia hemolítica microangiopática.	Xerocitosis congénita

Equipos, especímenes y reactivos:

- ✓ Sangre total con Heparina.
- ✓ Solución tamponada de cloruro sódico en concentraciones crecientes preparada de acuerdo a nuestro manual de técnicas de Laboratorio.
- ✓ Espectrofotómetro UV 1603. SHIMADZU CORPORATION (Japan).

**2.3.2.- TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ERITROENZIMOPATÍAS.**

El despistaje de eritroenzimopatías se realiza en los pacientes con episodio de anemia hemolítica no inmune, en recién nacidos con hemólisis no aclarada y en pacientes con familiares afectados de alguna de estas patologías. Nuestro Servicio es centro de referencia para el estudio



de eritroenzimopatías de la Región. En nuestro laboratorio se realiza el estudio de las enzimas piruvato kinasa (PK) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Tanto los niveles de G6PDH como los de PK dependen de la juventud eritrocitaria, por lo que aumenta en muestras con reticulocitosis; por este motivo se debe realizar la cuantificación fuera de las crisis hemolíticas.

El diagnóstico mediante cuantificación de la actividad enzimática. Éstos métodos se basan en la preparación de una mezcla reactiva en la que la enzima a estudiar constituye la etapa limitante. Los métodos cualitativos se han utilizado para el escrutinio del déficit de G6PDH [103].

#### **2.3.2.1. PRUEBA DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO.**

Es un método cualitativo para estudio del déficit de G6PDH. Se ha utilizado como *screening* para la detección de portadores heterocigotos [104].

Fundamento: El test estima la reducción de NADPH de forma indirecta. El azul de metileno transfiere hidrógeno del NADPH a la metahemoglobina, promoviendo su reducción. Se basa en mezclar los hematíes con una solución con azul de metileno al 0,3% y observar el sobrenadante tras la centrifugación. Los hematíes normales decoloran el azul de metileno y el sobrenadante aparece incoloro. Por el contrario, en pacientes con déficit de G6PDH el sobrenadante permanece azul. Esta técnica permite detectar a portadores heterocigotos con una sensibilidad del 75%.

#### **2.3.2.2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE LA ENZIMA G6PDH.**

Fundamento: La G6PDH cataliza el primer paso de la vía de las pentosas fosfato, oxidando la G6P a 6- fosfogluconato y reduciendo el NADP a NADPH. El principio para la cuantificación de la actividad enzimática se basa en la reducción de NADP a NADPH en presencia de G6P y hemolizado. Se realiza la medición por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda [103].

##### Equipos y reactivos:

- ✓ Kit comercial de ensayo cuantitativo enzimático para determinación de déficit de G6PDH (Sigma-Aldrich, Trinity Biotech, Instruchimie).
- ✓ Espectrofotómetro UV visible, marca *Shimadzu*, modelo UV 1603.

Los valores de normalidad son los descritos en cada técnica (146-376 U/10<sup>12</sup> RBC o 4,6-13,5 U/gr. Hb).

### 2.3.2.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE LA ENZIMA PK.

Fundamento: La PK cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP en piruvato y ATP. La técnica se basa en la reducción del ADP en ATP en presencia de PEP y hemolizado [103].

#### Equipos, especímenes y reactivos:

- ✓ Suero fresco.
- ✓ Hematíes lisados con agua destilada.
- ✓ Kit de ensayo commercial cuantitativo enzimático para determinación del déficit de PK. (Greiner Diagnostic, Ben, Instruchimie).
- ✓ Espectrofotómetro UV visible, marca *Shimadzu*, modelo UV 1603.

Los valores de normalidad son los descritos en la técnica utilizada en cada momento (anteriores al 2003: 60-220 mU/10<sup>9</sup> hematíes. A partir de 2003: 3,7-8,2 U/gr. Hb).

### 2.3.3.- TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TALASEMIAS Y HEMOGLOBINOPATÍAS.

El diagnóstico de las hemoglobinopatías se basa en la separación y cuantificación de las fracciones de hemoglobina normal y anormal, mediante diversas técnicas. La electroforesis de hemoglobina separa las diferentes moléculas según su movilidad en un campo eléctrico.

Atendiendo al soporte utilizado se pueden distinguir:

- ✓ EF realizadas en soporte sólido (EF en acetato de celulosa),
- ✓ EF realizadas en una matriz porosa (EF en gel)
- ✓ EF realizadas en disolución (EF libre).

La movilidad de cada molécula es diferente con cada técnica. Esto resulta de utilidad a la hora de identificar una banda de Hb anómala, ya que conocer el perfil de migración en los diferentes soportes puede ayudar a confirmar el diagnóstico en caso de dudas. Las técnicas utilizadas en nuestro centro para el análisis de hemoglobinas han sido las que se enumeran a continuación.

### 2.3.3.1. ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA A PH ALCALINO (PH 8,6).

Fundamento: La electroforesis de hemoglobinas separa las diferentes moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Algunas variantes de Hb migran a la misma velocidad, por lo que en ocasiones se ha complementado con la electroforesis en gel a pH ácido, que mide una propiedad distinta de la carga eléctrica (**figuras 23 y 24**).

#### Equipos y reactivos:

- ✓ Kit Hb-12 alcalino de SAS-10. Helena Laboratories (Beaumont, TEXAS)
- ✓ Soporte Titan III acetato de celulosa. Helena Laboratories (Beaumont, TEXAS)
- ✓ Cámara de electroforesis modelo 4063. Helena Laboratories (Beaumont, TEXAS)

Metodología. Se hidratan las tiras de Titan en el tampón. Una vez hidratadas, con la cámara preparada con tampón en las cubetas exteriores, se coloca papel secante en el puente de la cámara para favorecer el transporte. Se secan las tiras para retirar el exceso de tampón y se coloca la tira en el soporte de aplicación. Se toma la muestra hemolizada con el aplicador y se marca en soporte (la tira) de acetato de celulosa. Se coloca en la cámara sobre el papel secante con la muestra en el polo negativo. Se aplica corriente de 250 voltios durante 30 minutos. Se extrae, se colorea con rojo *Ponceaux* durante 5 minutos; se lava con ácido acético al 5%, se seca en la estufa de cultivo a 37°C y se procede a la lectura.

### 2.3.3.2. ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA A PH ÁCIDO (PH 6,0).

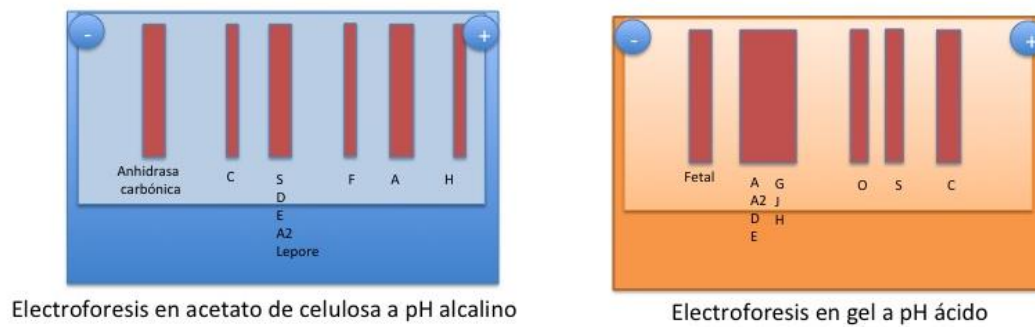
Fundamento: Se basa en las interacciones de la Hb con un tampón electroforético ácido y el soporte de gel. Aporta evidencia complementaria de la presencia de Hb anómalas (**figuras 23, 24 y 25**).

#### Equipos y reactivos:

- ✓ Kit Hb-10 ácida de SAS-MX. Helena Laboratories (Beaumont, TEXAS)
- ✓ Soporte Titan III acetato de celulosa. Helena Laboratories (Beaumont, TEXAS)
- ✓ Cámara de electroforesis modelo 4063. Helena Laboratories (Beaumont, TEXAS)

Metodología. Se hemoliza la muestra, se añade el tampón en las cubetas internas de la cámara. Se colocan las muestras en el gel con la plantilla. Se colocan en la cubeta con el tampón

ácido a una corriente de 50 voltios durante 30 minutos, con la muestra en el polo positivo (aniónico). Se extraen de la cubeta, se fijan con una solución de metanol, ácido acético y H<sub>2</sub>O destilada 5 minutos. Se tiñe 5 minutos con colorante violeta ácido. Se lavan ligeramente con el tampón de la fijación y se dejan en la estufa a 60-70° hasta que estén secas unas 2h. Una vez seca, se retira el sobrante de colorante hasta que queden transparentes y se procede a la lectura.



**Figura 23. Separación de las diferentes hemoglobinas en la electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino (a la izquierda) y en gel a pH ácido (derecha)**

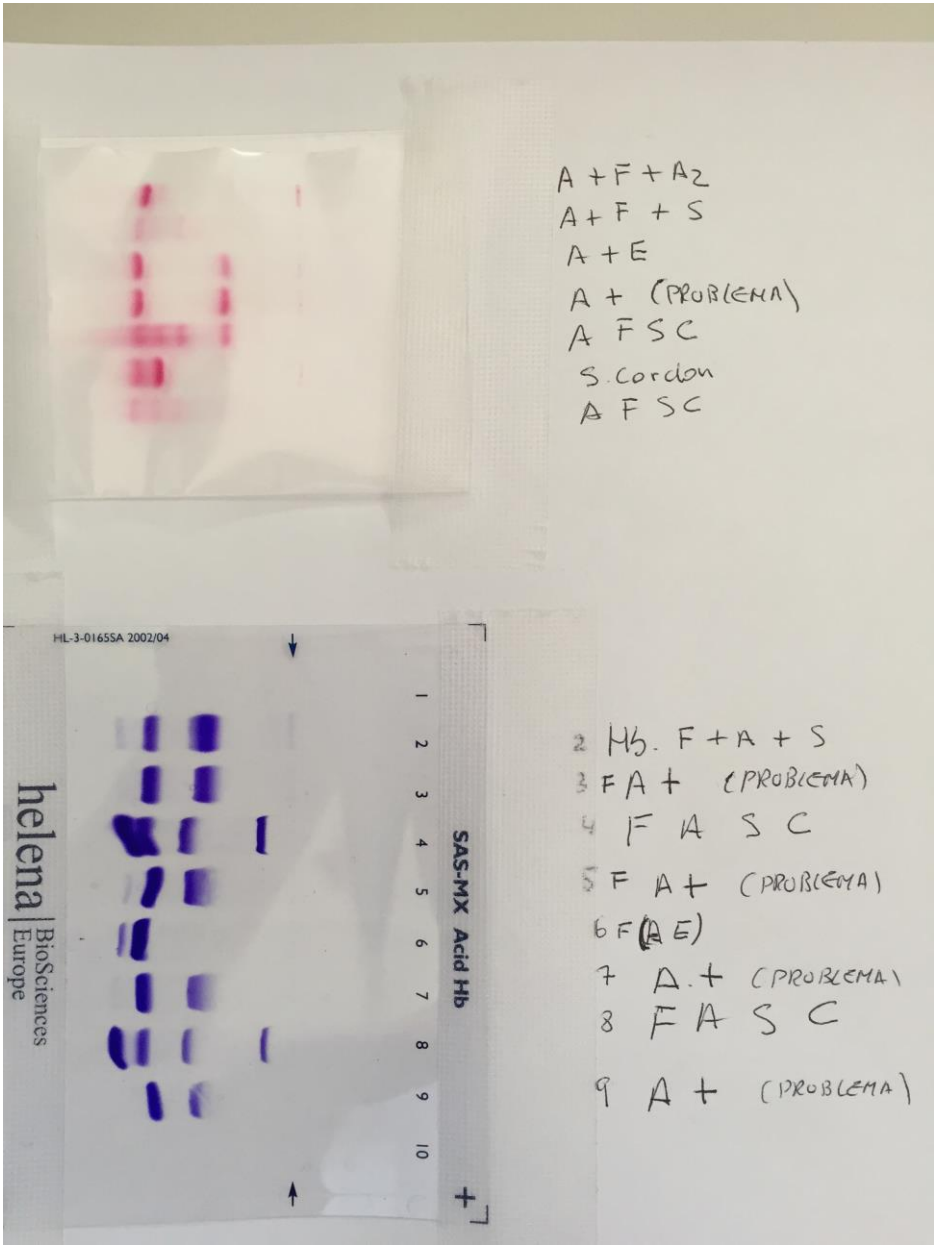


Figura 24. Electroforesis de hemoglobina en acetato decelulosa a pH ácido y alcalino en nuestro laboratorio. Movilidad electroforética de las distintas hemoglobinas.

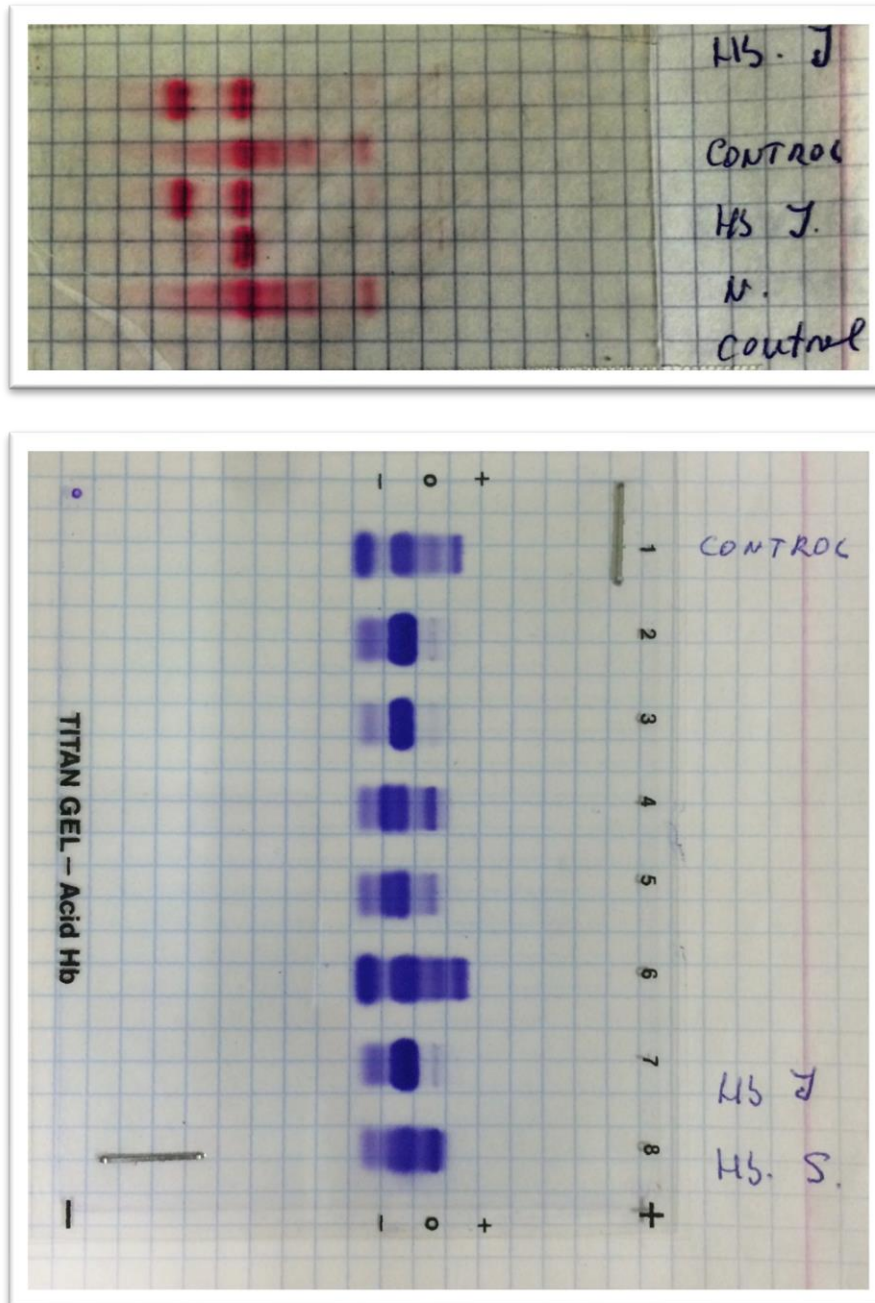


Figura 25. Diferentes patrones de migración en las electroforesis a pH alcalino y ácido.

### 2.3.3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Fundamento: se trata de un método automático para la cuantificación de las fracciones de hemoglobina. Es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En la cromatografía de intercambio iónico, la

retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna.

Los valores normales con esta técnica son: HbA<sub>2</sub>: 0-3,5%; HbF: 0-1,5%.

Equipo utilizado: Variant Hemoglobin Testing System (**figura 26**). Bio-Rad Laboratories (Hercules, California. US).

Se han utilizado los siguientes programas automáticos:

- ✓ Escrutinio de  $\beta$ -talasemia (**figura 27**). El programa para la detección de la  $\beta$ -talasemia consiste en la cuantificación de la HbF y HbA<sub>2</sub> y requiere unos 6 min. para completarse. Aunque con la fracción HbA<sub>2</sub> existe una coelución de las Hb E, D, J, K y N, ello carece de importancia en la práctica clínica, puesto que valores de HbA<sub>2</sub> de alrededor del 30% deben de hacer sospechar la existencia de alguna de estas hemoglobinopatías en estado heterocigoto y proceder a la correspondiente investigación.
- ✓ Escrutinio de la anemia falciforme y otras hemoglobinopatías estructurales. El programa de detección de la anemia falciforme tiene como objetivo la cuantificación de la HbS y es útil para detectar el carácter de portador de esta anemia. Este programa requiere unos 3 min. y con él se separan claramente las Hb A, F, S, C, D y E (coeluida con la fracción normal A<sub>2</sub>), lo que aumenta su interés por cuanto permite aplicarlo a la detección sistemática de las principales hemoglobinopatías estructurales presentes en la población.
- ✓ Cuantificación de la hemoglobina glicosilada. Permite la cuantificación de hemoglobinas glicadas, de interés en los pacientes diabéticos.
- ✓ Escrutinio de  $\alpha$ -talasemia: permite la detección de HbH y Hb Bart.
- ✓ Programa de análisis de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  la determinación del cociente  $\alpha/\beta$  y por tanto el diagnóstico diferencial entre alteraciones cualitativas y cuantitativas de las cadenas de globina.

Las muestras se inyectan en el flujo con un gradiente preprogramado para controlar la mezcla de tampón de elución que fluye por el cartucho de análisis. La fuerza iónica de la mezcla de tampón de elución aumenta al elevar la contribución porcentual del tampón de elución. Conforme aumenta la potencia iónica de la mezcla, las hemoglobinas retenidas con más fuerza eluyen del cartucho de análisis. Un fotómetro de longitud de onda doble (415 y 690 nm) controla la elución de hemoglobina desde el cartucho, detectando los cambios de absorbancia a 415 nm. El filtro secundario a 690 nm corrige en los valores de referencia los efectos causados al mezclar tampones con distintas fuerzas iónicas. Los cambios de absorbancia se controlan y visualizan como un cromatograma de la absorbancia frente al tiempo. Los datos de análisis procedentes del detector se procesan en el integrador incorporado y se imprimen en un informe de muestra.

Para facilitar la interpretación de resultados, se han establecido intervalos para las hemoglobinas más frecuentes, en función de sus tiempos de retención característicos. El tiempo de retención es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el vértice de un pico de hemoglobina. Cada hemoglobina tiene un tiempo de retención característico. Las diferencias menores registradas en el grado de separación de cada cartucho de análisis se corrigen mediante el uso del calibrador de hemoglobina A<sub>2</sub>/F (HbA<sub>2</sub>/F).

La HPLC es capaz de identificar las siguientes hemoglobinas: HbA, Hb A<sub>2</sub>, HbF, HbE, Hb S, HbC y HbD. La identificación de estas variantes de hemoglobina se efectúa utilizando intervalos de tiempo de retención, como el "intervalo D", "intervalo S" e "intervalo C". La elución de la hemoglobina E, la segunda variante de hemoglobina de aparición más frecuente, se realiza dentro del intervalo de tiempo de retención de la hemoglobina A<sub>2</sub> utilizando el programa *VARIANT β-thalassemia Short Program*. Su diferenciación de la hemoglobina A<sub>2</sub> puede establecerse por referencia al cálculo del porcentaje de área en el informe de la muestra. La hemoglobina E en estado heterocigótico (fenotipo AE) suele estar presente en un rango entre 30 y 35%.





Figura 26. Variant Hemoglobin Testing System. Bio-Rad Laboratories (Hercules, California. US)

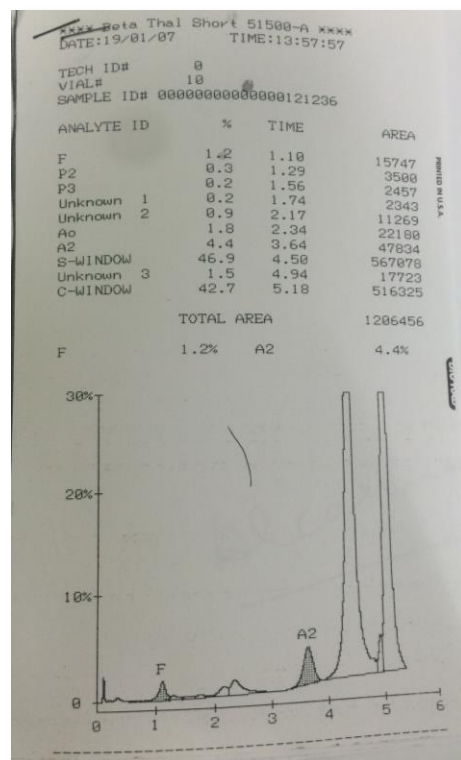


Figura 27. Perfil de migración de la  $\beta$ -talasemia por HPLC.

### 2.3.3.4. ELECTROFORESIS CAPILAR (EC).

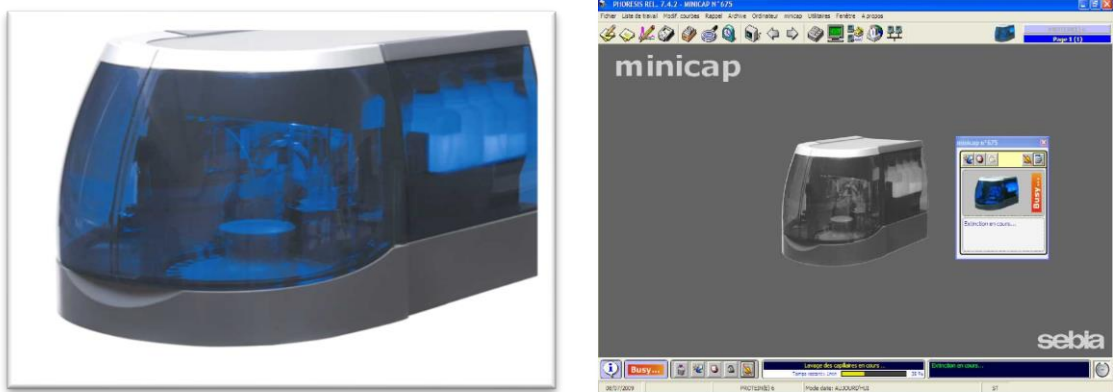
Fundamento: Utiliza el principio de electroforesis en solución libre. La electroforesis capilar es una técnica automática que separa diferentes moléculas presentes en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico y de acuerdo a la relación masa/carga de las mismas. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño que recibe el nombre de capilar. Dentro de este capilar se encuentran la disolución que contiene las moléculas a separar

y el tampón o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. Las moléculas catiónicas migrarán hacia el cátodo (electrodo negativo) y las aniónicas migrarán hacia el ánodo. La velocidad de migración está en relación directa con el tamaño y la carga de cada molécula. Las moléculas de hemoglobina son detectadas en una burbuja que hay en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a la longitud de onda específica de las hemoglobinas (415 nm). La detección directa permite una cuantificación relativa de cada fracción de hemoglobina. Los resultados se posicionan automáticamente con respecto a la HbA<sub>1c</sub>: se diferencian 15 zonas en las que se muestran las variantes normales y anormales de Hemoglobina (**figura 29**). El equipo posee una biblioteca de las hemoglobinas normales y variantes que pueden aparecer en cada zona (Z1 a Z15), y muestra un desplegable con las mismas en cada zona (ver **figura 30 y 31**).

En el caso de muestras sin HbA<sub>1c</sub> o HbA<sub>2c</sub>, la caracterización a partir de las zonas de identificación se obtiene haciendo una dilución de la muestra problema con control normal. La cuantificación se obtiene a partir de la muestra inicial.

Los valores de referencia normales con esta técnica son: HbA<sub>2c</sub>: 2,2-3,2%; HbF 0-0,5%.

Equipo utilizado: Sistema de electroforesis capilar MINICAP®. *Sebia Electrophoresis* (Norcross, GA. USA). Programa PHORESIS®. *Sebia Electrophoresis* (**figuras 28 y 29**).



**Figura 28. MINICAP de Sebia.**

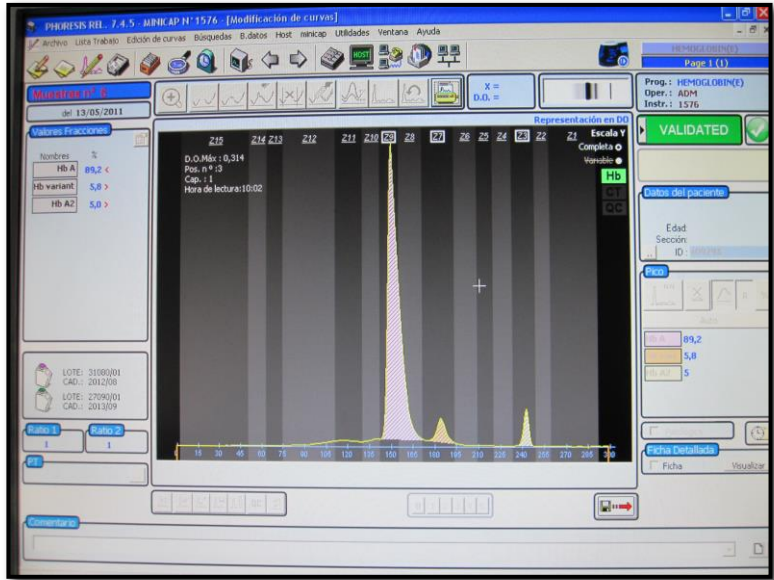


Figura 29. Programa PHORESIS del MINICAP (Sebia).

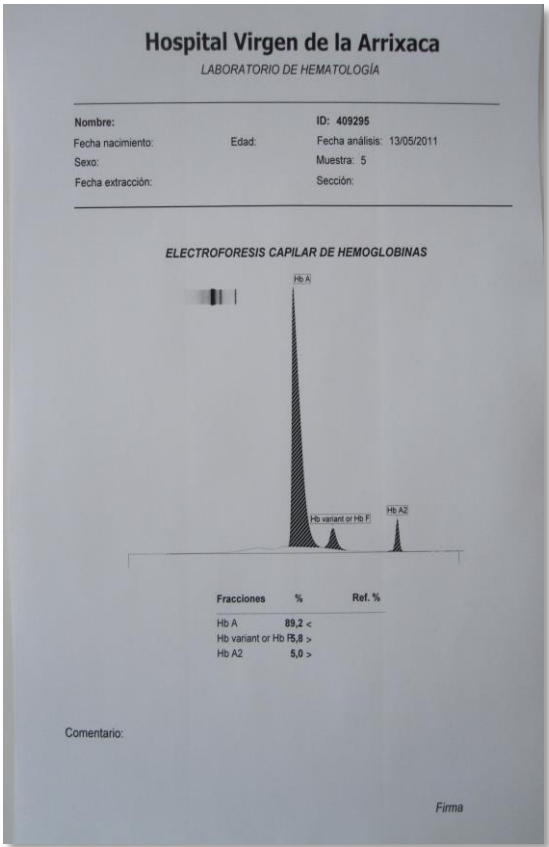
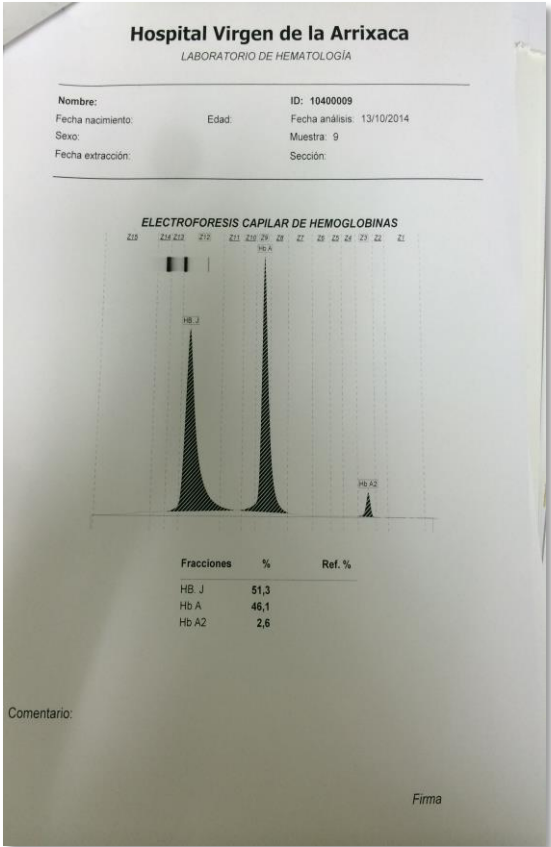


Figura 30. Patrones de migración de diferentes Hb anómalas. A la izquierda, Hb J. A la derecha, β-talasemia.

Zone N°	Variants	Gene
1	Hb δA'2 Hb αA2 "Hasharon" HbA <sub>2</sub> variant* "Winnipeg" HbA <sub>2</sub> variant* "Q-India" HbA <sub>2</sub> variant* "Q-Thailand" HbA <sub>2</sub> variant* other HbA <sub>2</sub> variants	δ α (α Hasharon / δ) (α Winnipeg / δ) (α Q-India / δ) (α Q-Thailand / δ)
2	Hb C Hb Constant Spring "Setif" HbA <sub>2</sub> variant*	β α (α Setif / δ)
3	HbA <sub>2</sub> Hb O-Arab	α <sub>2</sub> δ <sub>2</sub> β
4	Hb E Hb Köln "M-Iwate" HbA <sub>2</sub> variant* Denatured Hb C	β β (α M-Iwate / δ)
5	Hb S Hb Hasharon Hb Handsworth Denatured Hb O-Arab	β α α
6	Hb D-Punjab (D-Los Angeles) Hb Osa Christiansborg Hb D-Ouled Rabah Hb Lepore (Lepore BW) Hb G-Philadelphia Hb Korle-Bu (G-Acca) Hb Köln Hb G-Taipei Hb Winnipeg Hb Setif Hb Q India Hb Q Iran Hb D Iran	β β β δβ hybrid α β β β α α α α β
6	Hb Stanleyville II "J-Toronto" Hb A <sub>2</sub> variant* "J-Rovigo" Hb A <sub>2</sub> variant* Denatured Hb E	α (α J-Toronto / δ) (α J-Rovigo / δ)
7	Hb F Hb Q-Thailand (G-Taichung) Hb Richmond Hb G-San José Hb Porto Alegre Hb Presbyterian Denatured Hb S	α <sub>2</sub> γ <sub>2</sub> α β β β β
8	Hb Fac Hb Atlanta Hb Athens-GA (Waco)	β β
9	Hb A Hb Phnom Penh Hb Toulon Hb Okayama Hb Fontainebleau Hb Raleigh Hb Hekinan Hb Camperdown	α <sub>2</sub> β <sub>2</sub> α α β α β α β
10	Hb Hope Hb M-Iwate	β α
11	Denatured Hb A Hb J-Kaohsiung	β
12	Hb Bart's Hb Providence Hb J-Brossais Hb J-Toronto Hb J-Meimung (J-Bangkok) Hb J-Mexico Hb J-Baltimore	γ <sub>4</sub> β α α β α β
13	Hb J-Rovigo Hb N-Baltimore	α β
14		
15	Hb H	β <sub>4</sub>

Figura 31. Se muestran las 15 zonas del aparato de EC, con las hemoglobinas que aparecen en cada una.

### 2.3.3.5. ESTUDIO MOLECULAR DE LAS CADENAS DE GLOBINA.

El estudio molecular de las cadenas de globina se ha realizado en pacientes con sospecha de  $\alpha$ -talasemia (pacientes con microcitosis sin ferropenia, eritrocitosis y con electroforesis de hemoglobina sin aumento de la HbA<sub>2</sub>). También se ha realizado en el caso de  $\beta$ -talasemias con cifras de hemoglobina inferiores a las esperadas y/o en presencia de una electroforesis con fracción de HbF > 5% (sospecha de  $\beta$ -talasemia intermedia).

**Fundamento:** Consiste en la identificación de las principales alteraciones moleculares mutaciones descritas en los genes  $\alpha$  y  $\beta$ -globina en nuestro medio mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa más hibridación inversa de los productos de PCR biotinilados a una matriz paralela de oligonucleótidos aleoespecíficos inmovilizados en tiras de membrana.

#### Equipos y reactivos:

- ✓ El método empleado ha sido el sistema Strip Assay®. ViennaLab Diagnostics GmbH. (Vienna, Austria). Los kits de los que hemos dispuesto en nuestro laboratorio han sido:

- $\alpha$ -globin Strip Assay<sup>®</sup>. ViennaLab Diagnostics GmbH. (Vienna. Austria).
  - $\beta$ -globin Strip Assay IME<sup>®</sup>. ViennaLab Diagnostics GmbH. (Vienna. Austria).
  - $\beta$ -globin Strip Assay MED<sup>®</sup>. ViennaLab Diagnostics GmbH. (Vienna. Austria).
- 
- ✓ Kit de extracción Spin Micro DNA. ViennaLab Diagnostics GmbH. (Vienna, Austria).
  - ✓ Robot extractor de DNA, BioRobot EZ1 (Qiagen)
  - ✓ Sistema de incubación con plataforma de agitación y temperatura regulable (Auto-LIÂ-48 (Inmunogenetics<sup>®</sup>).
  - ✓ Microcentrífuga.
  - ✓ Termociclador.
  - ✓ Taq ADN polimerasa.
  - ✓ Agitador.

En el caso de la  $\alpha$ -talasemia el kit permite identificar las 21 alteraciones moleculares más frecuentemente encontradas en el área Mediterránea, Oriente Medio y Sudeste Asiático, que engloba más del 90% de las mutaciones de estas áreas.

En el caso de la  $\beta$ -globina, existen tres kits que permiten identificar las mutaciones más frecuentes en cada área (englobando más del 90% de las alteraciones descritas en cada área):

- MED: identifica 22 mutaciones que cubren más del 90% de las identificadas en el área Mediterránea;
- IME: identifica 22 mutaciones que cubren más del 90% de las identificadas en Oriente Medio y la India;
- SEA: identifica 22 mutaciones que cubren más del 90% de las identificadas en el Sudeste Asiático.

Metodología. El procedimiento consta de 3 pasos:

1. Extracción de DNA.
2. Amplificación del DNA mediante PCR usando primers marcados con biotina. Se prepara una dilución de Taq DNA polimerasa en el Tampón de dilución. En el caso del gen  $\alpha$ -globina, se preparan tres tubos de reacción para cada muestra con tres mezclas de reacción de PCR, cada una de ellas contienen diferentes longitudes de fragmentos. Para

el gen  $\beta$  sólo es necesario un tubo de reacción por muestra. Se introducen en el termociclador con el siguiente programa:

Para el gen  $\alpha$ :

- pre-PCR: 95°C/;
- termociclado:  
97°C/40", 64°C/40", 72°C/1'30" (3 ciclos)  
97°C/40", 58°C/40", 72°C/1'30" (37 ciclos)
- Extensión final: 72°C/5'

Para el gen  $\beta$ :

- pre-PCR: 94°C/2';
- termociclado: 94°C/15", 58°C/30", 72°C/45" (35 ciclos)
- Extensión final: 72°C/3'

3. Hibridación de los productos de amplificación en tiras que contienen sondas de oligonucleótido alelo específico fijadas en líneas paralelas. Se precalientan el baño, el tampón y la solución de lavado a 45°C. Se colocan las tiras reactivas con unas pinzas en los compartimentos del cajón de hibridación, se añade DNAT y los productos de amplificación, se mezcla bien, se incuba durante 5' a temperatura ambiente, se añade tampón de hibridación a 45°C en cada compartimento y se sumergen las tiras reactivas cada una en un compartimento. Se incuba 30 minutos a 45°C en la plataforma de agitación del baño de agua a 50 rpm. Al finalizar la incubación, se aspiran las soluciones de hibridación.
4. Lavado riguroso a 45°C con la solución de lavado A.
5. Revelado del color: se incuba con **Conjugate Solution**. Se lava con la solución de lavado B; se añade **Color Developer** y finalmente se lava con agua destilada. Se dejan secar en la oscuridad sobre papel absorbente y una vez secos se procede a su lectura. El resultado se coloca en un papel colector suministrado con el kit, en el que aparece un modelo con la posición correspondiente para cada mutación, así como las "wild-type" o normales, indicadas en el papel (ver **figuras 32, 33 y 34**).
6. Lectura a través de escaneo en programa *globin Strip Assay*.
7. Realizar informe clínico especificando tanto del genotipo como del fenotipo según la alteración molecular detectada (ver **tablas 13 y 14**).

**Tabla 13. Mutaciones/deleciones de los genes  $\alpha$ -globina.**

ALFA TALASEMIA DELECIONAL.	<p>-Delección <math>\alpha^{3,7}</math> (delección de un gen <math>\alpha</math>, en heterocigosis u homocigosis).</p> <p>-Delección <math>\alpha^{4,2}</math> (delección de un gen <math>\alpha</math>, en heterocigosis u homocigosis).</p> <p>-Delección <math>\alpha^{20,5}</math> (doble delección de dos genes <math>\alpha</math> de un mismo cromosoma: <math>\alpha_1 + \alpha_2</math>).</p> <p>-Delección <math>--^{SEA}</math> (doble delección de dos genes <math>\alpha</math> de un mismo cromosoma: <math>\alpha_1 + \alpha_2</math>).</p> <p>-Delección <math>--^{MED}</math> (doble delección de dos genes <math>\alpha</math> de un mismo cromosoma: <math>\alpha_1 + \alpha_2</math>).</p> <p>-Delección <math>--^{THAI}</math> (doble delección de dos genes <math>\alpha</math> de un mismo cromosoma: <math>\alpha_1 + \alpha_2</math>).</p> <p>-Triplicación de genes <math>\alpha^{3,7}</math></p>
ALFA TALASEMIA NO DELECIONAL.	<p>-Mutación puntual G por A (codón 14) del gen <math>\alpha_1</math>.</p> <p>-Mutación puntual G por A (codón 59) del gen <math>\alpha_1</math> (Hb Adana).</p> <p>-Mutación puntual G por A (codón 59) del gen <math>\alpha_2</math>.</p> <p>-Delección -G (codón 59) del gen <math>\alpha_2</math>.</p> <p>-Delección pentanucleótido en el IVS-1 del gen <math>\alpha_2</math>.</p> <p>-Delección ATG por ACG en el codón de iniciación del <math>\alpha_2</math>.</p> <p>-Mutaciones en el codón de terminación del gen <math>\alpha_2</math> (codón 142): elongación cadena <math>\alpha_2</math>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutación T por C: hemoglobina CONSTANT SPRING.</li> <li>• Mutación T por A: hemoglobina ICARIA.</li> <li>• Mutación A por T: hemoglobina PAKSE.</li> <li>• Mutación A por C: hemoglobina KOYA DORA.</li> </ul> <p>-Mutación puntual T por C (codón 125) del gen <math>\alpha_2</math>: hemoglobina QUONG SZE (cadenas <math>\alpha</math> inestables).</p> <p>-Mutaciones del poli-A:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutación AATAAA por AATAAG: poli A1 (gen <math>\alpha_2</math>, tipo Saudí).</li> <li>• Mutación AATAAA por AATGAA: poli A2 (gen <math>\alpha_2</math>, tipo Turco).</li> </ul>

**Tabla 14. Mutaciones/delecciones de los genes  $\beta$ -globina.**

<b>1. DEFECTOS DE LA TRANSCRIPCIÓN:</b> $\beta^+$ talasemia menor.	<u>Mutaciones de la región promotora:</u> disminución de la transcripción. $\beta^+$ talasemia menor.	-Mutación puntual C por T (posición 101) -Mutación puntual C por G (posición 87) -Mutación puntual T por A (posición 30) -Mutación puntual A por G (posición 31) -Mutación puntual A por G (posición 29). -Mutación puntual A por G (posición 28).
	<u>Mutaciones del cocón de iniciación:</u> $\beta^+$ / $\beta^0$ talasemia menor.	-Mutación puntual ATG>ACG
<b>2. DEFECTOS PROCESAMIENTO RNAm:</b> $\beta^+$ / $\beta^0$ talasemia menor.	<u>Mutaciones de la región CAP:</u> transcripción de moléculas de RNAm inestables. $\beta^+$ talasemia menor.	-Mutación puntual A por C en nucleótido 1: CAP+1
	<u>Mutaciones en el proceso de "splicing":</u> alteran la escisión y empalme. $\beta^0$ talasemia menor.	-Mutación puntual G por A en posición 1 en el intrón 1: IVS-1.1 G>A -Mutación puntual G por T en posición 1 en el intrón 1: IVS-1.1 G>T -Mutación puntual G por A en posición 130 en el intrón 1: IVS-1.130 G>A -Mutación puntual G por A en posición 1 en el intrón 2: IVS2.1 G>A -Mutación puntual C por T en posición 654 en el intrón 2: IVS2.1 C>T -Mutación puntual C por G en posición 745 en el intrón 2: IVS2.745 C>G -Mutación puntual C por A en posición 848 en el intrón 2: IVS 2.848 C>A
	<u>Mutaciones de las secuencias consenso:</u> disminuyen la maduración. $\beta^+$ talasemia menor.	-Mutación puntual G por C en posición 5 en el intrón 1: IVS-1.5 G>C -Mutación puntual T por C en posición 6 en el intrón 1: IVS-1.6 T>C
	<u>Mutaciones intrónicas:</u> aparición de secuencias crípticas	-Mutación puntual G por A en posición 110 en el intrón 1: IVS-1.110 G>A $\beta^+$ talasemia menor. -Mutación puntual T por G en posición 116 en el intrón 1: IVS-1.116 T>G $\beta^0$ talasemia menor.
	<u>Mutaciones sin sentido:</u>	-Mutación TGG por TGA (codón 15) -Mutación TGG por TAG (codón 15) -Mutación CAG por TAG (codón 39) -Mutación A por T (codón 17) -Mutación AGG por ACG (codón 30) -Mutación GAG por TAG (codón 43) -Mutación GAG por TAG (codón 90) -Mutación GAA por TAA (codón 121)
<b>3. DEFECTOS EN LA TRADUCCIÓN:</b> $\beta^0$ talasemia menor.	<u>Frameshift (mutación con cambio o con desplazamiento o desfase del marco de lectura; inserta o borra un simple nucleótido y produce "stop" en la traducción).</u>	-Delección -CT (codón 5) -Delección -A (codón 6) -Delección -AA (codón 8) -Inserción +G (codón 8/9) -Delección -C (codón 16) -Inserción +C (codón 27/28) -Delección -T (codón 36/37) -Delección -C (codón 44) -Inserción +A (codón 71/72) -Delección -GT (codón 89/90) -Inserción +A (codón 95) -Delección -TTCT (codón 41/24) -Delección 7 pb (codón 22) -Delección 25 pb (IVS1-25)
	<b>4. GRANDES DELECCIONES</b> $\beta^0$ talasemia menor.	Delección del extremo 3' (exón 3, -619 pb) -Delección de todo el gen.



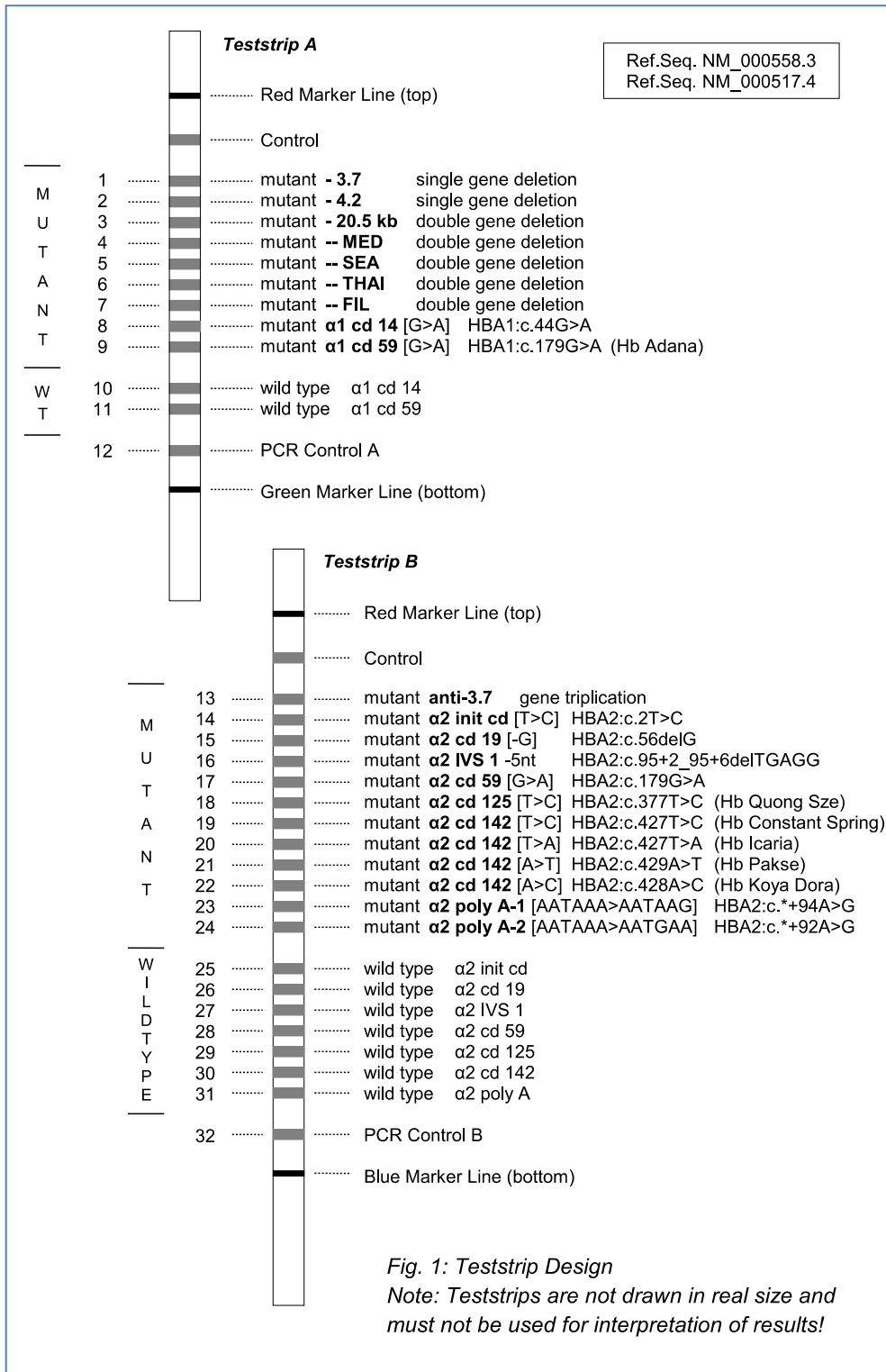


Figura 32. Patrón de diseño del test strip assay  $\alpha$ -globin. Presentan las variantes normales (wild type) además de las mutaciones posibles estudiadas, por lo que se puede identificar la mutación en estado homo y heterocigoto.

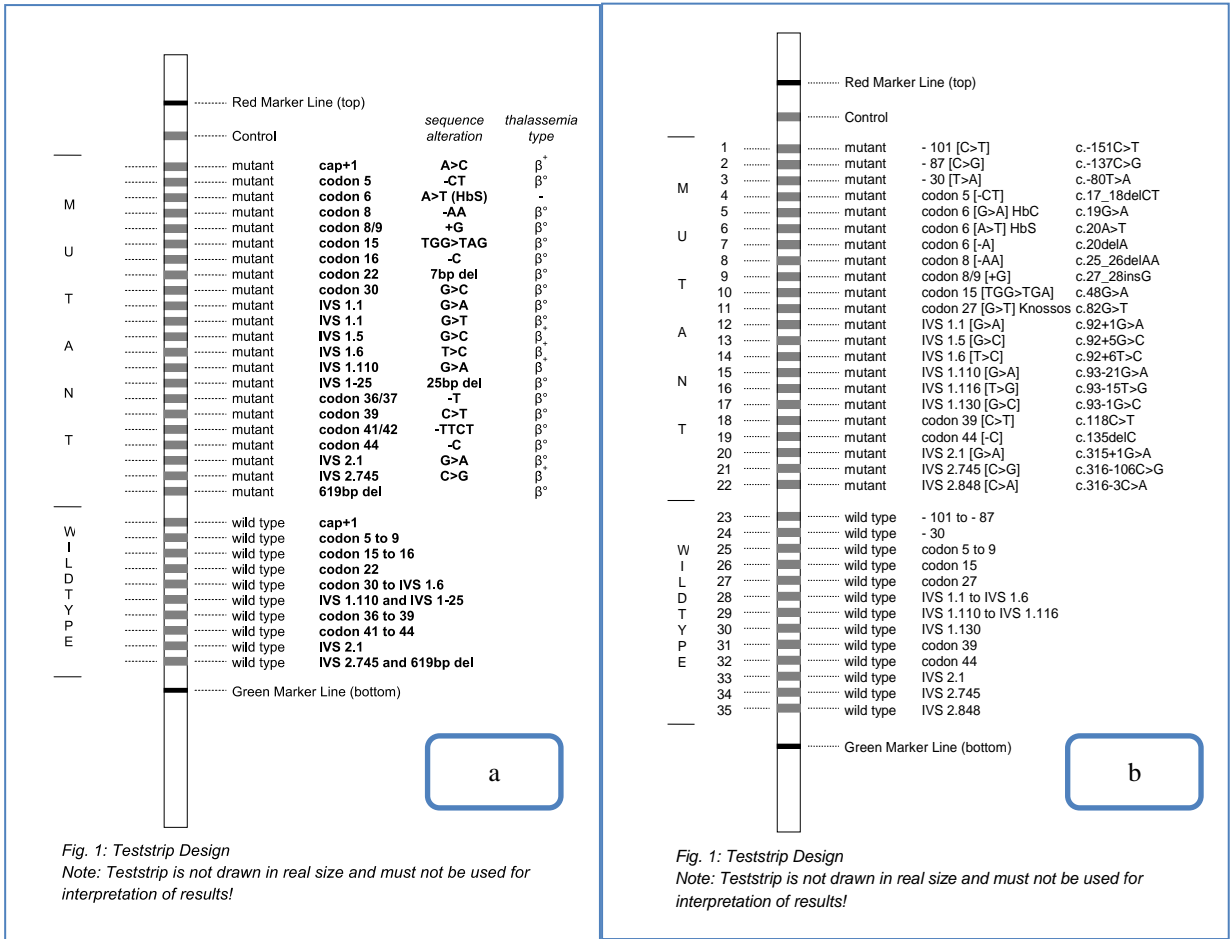


Figura 33. Patrón de diseño del test stripassay IME (a) y del test stripassay MED (b).

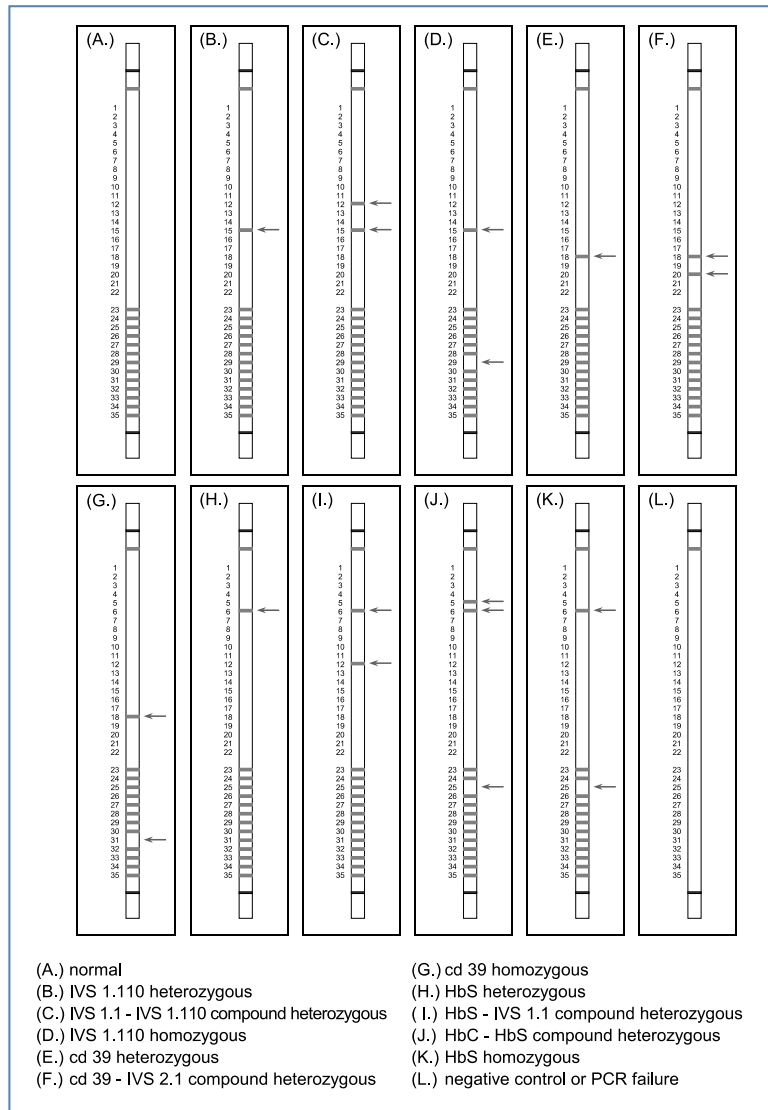


Figura 34. Ejemplos de resultados de mutaciones con el  $\beta$ -globin test assay MED.

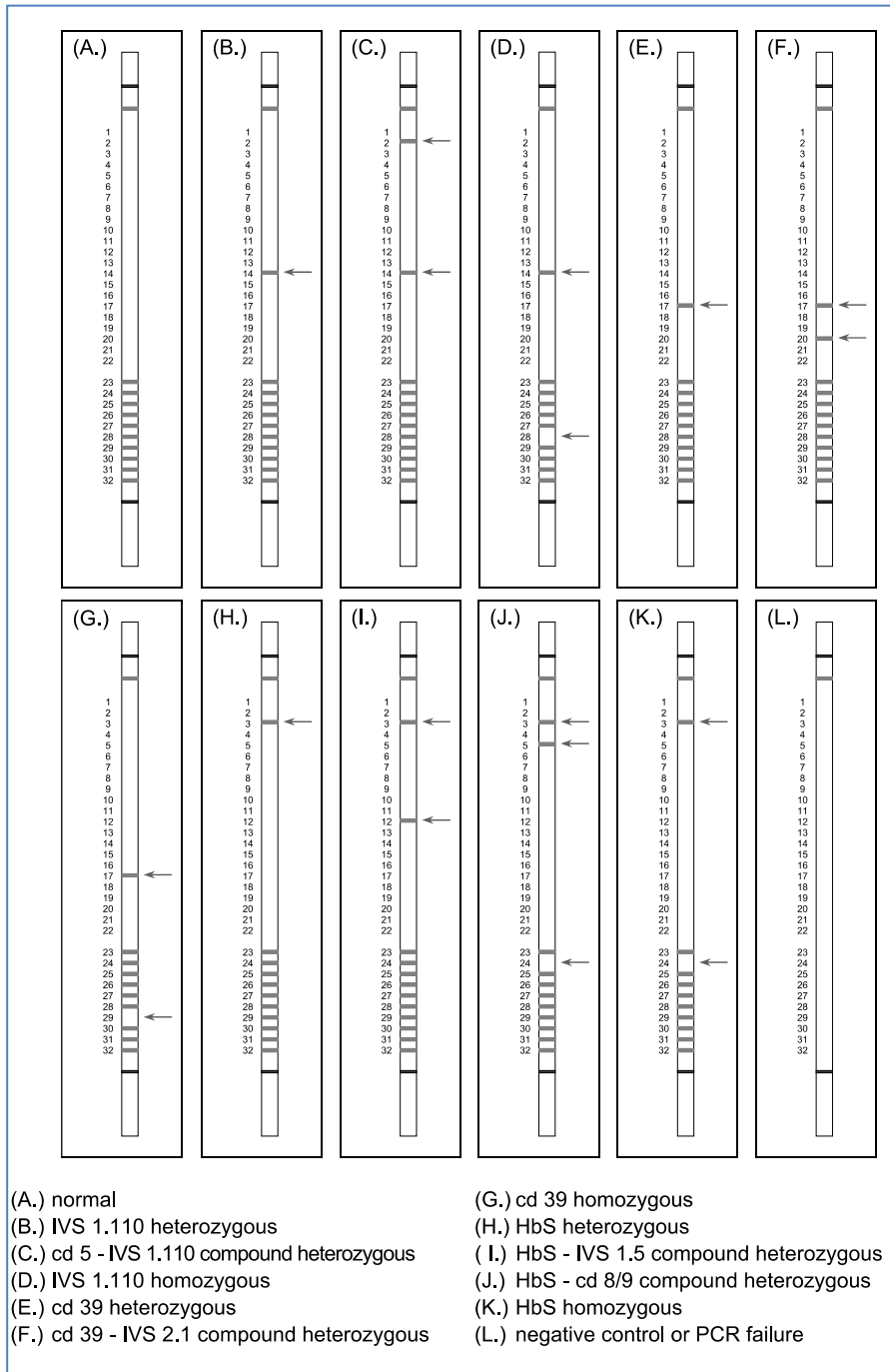


Figura 35. Ejemplos de resultados con el  $\beta$ -globin test assay IME.

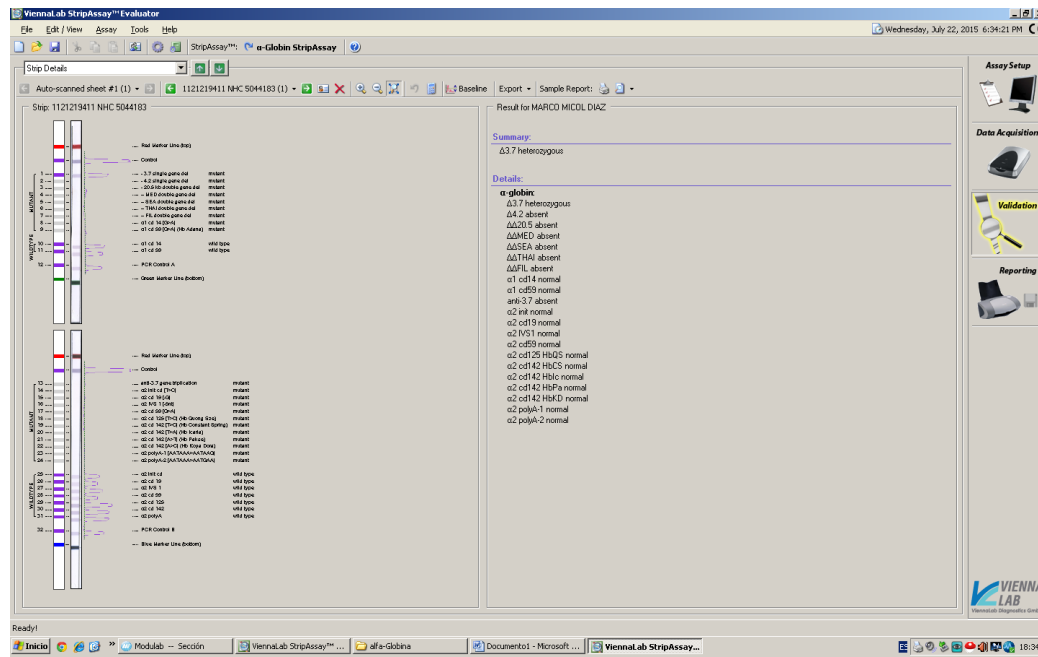
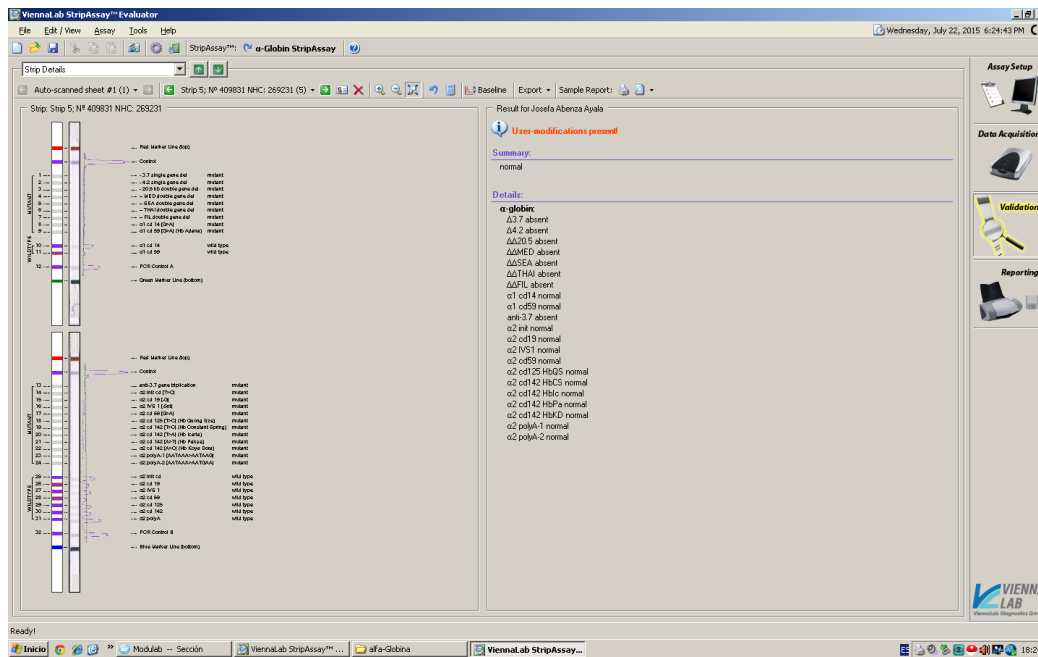


Figura 36. Sistema de identificación de las mutaciones de la cadena  $\alpha$  globina. Arriba estudio normal. Abajo, deleción 3,7 heterocigota.

### 3.- HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.

Los datos se recogieron con una base de datos de Access (Microsoft Office). La hoja de recogida de datos se muestra en la **figura 37**.

**Figura 37. Base de datos de estudios de anemias hereditarias.**

El campo clave utilizado fue el NHC para evitar duplicidades de estudios. Se eliminaron los registros con números de historia provisional que se hallaron duplicados, mediante la comprobación de nombre, apellidos y fecha de nacimiento, recogidos en una tabla independiente sin datos clínicos asociados.

## 4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

---

Se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 21 y XLSTAT versión 2015.5.01.22573.

Para el análisis descriptivo se utilizaron medias y desviación estandar (DE) o mediana y rango y se expresaron en gráficos y tablas de frecuencia.

Para la realización de los estudios de incidencia se hizo la media de la población de la región de los últimos 5 años, tanto total como por áreas de salud. El resultado obtenido fue la población con la que se trabajó. La incidencia se calculó por cada 100.000 habitantes/año.

A partir de las tablas de incidencia y de incidencia acumulada se calculó la frecuencia de cada subtipo de anemia en nuestra población (%) para compararlo con la frecuencia publicada en los principales estudios existentes en nuestro medio (ver introducción-epidemiología).

Tratamos de comparar una frecuencia observada en una muestra con una frecuencia esperada, según los datos de la literatura. Para ello realizamos para cada contraste una tabla de contingencia 2x2 y a continuación aplicamos prueba de contraste de hipótesis para la comparación de proporciones entre dos muestras mediante el test exacto de Fischer. De esta forma tratamos de averiguar si puede aceptarse la hipótesis de que una muestra dada procede de una distribución de probabilidad especificada en la hipótesis nula, es decir si existe relación de dependencia entre ambas distribuciones. Dicha hipótesis nula se rechaza si existe una diferencia significativa entre la frecuencia observada y la esperada ( $P < 0,05$ ).

Asimismo se realizó análisis de diferencias entre subtipos de  $\alpha$ -talasemia y  $\beta$ -talasemia en los parámetros hematimétricos y perfil ferrocínético. Se realizó el test de Kolmogorov Smirnov y se observó que las distribuciones de valores no seguían una curva normal, por lo que se emplearon test no paramétricos (U de Mann Whitney). En los casos con distribución de frecuencia normal se aplicaron test paramétricos (T de Student). El nivel de significación se estableció para valores de  $p < 0,05$ . Para los gráficos se utilizó el programa Microsoft Excel® (Microsoft®, USA).





## RESULTADOS

## 1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES. DIAGNÓSTICO POR GÉNERO, NACIONALIDAD Y ETNIAS.

### 1.1.- NÚMERO Y TIPO DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS.

Desde el año 1995 hasta 2013, se diagnosticaron un total de 2066 pacientes con algún tipo de anemia hereditaria en nuestra área. Las anemias hemolíticas más prevalentes en nuestro medio fueron las talasemias (81,7%). Las hemoglobinopatías y las esferocitosis hereditaria representaron el 9,73% y 4,59% de los casos respectivamente. El % de enzimopatías detectadas fue del 3,97% (Déficit de G6PDH 3,73% y déficit de PK 0,24%). En la **tabla 15** se muestran las frecuencias de cada patología. El sistema informatizado del laboratorio (SIL) fue implantado en nuestro laboratorio en 2003, por lo que los datos se muestran agrupados en dos periodos de tiempo: pre-SIL (1995-2002) y post-SIL (2003-2013).

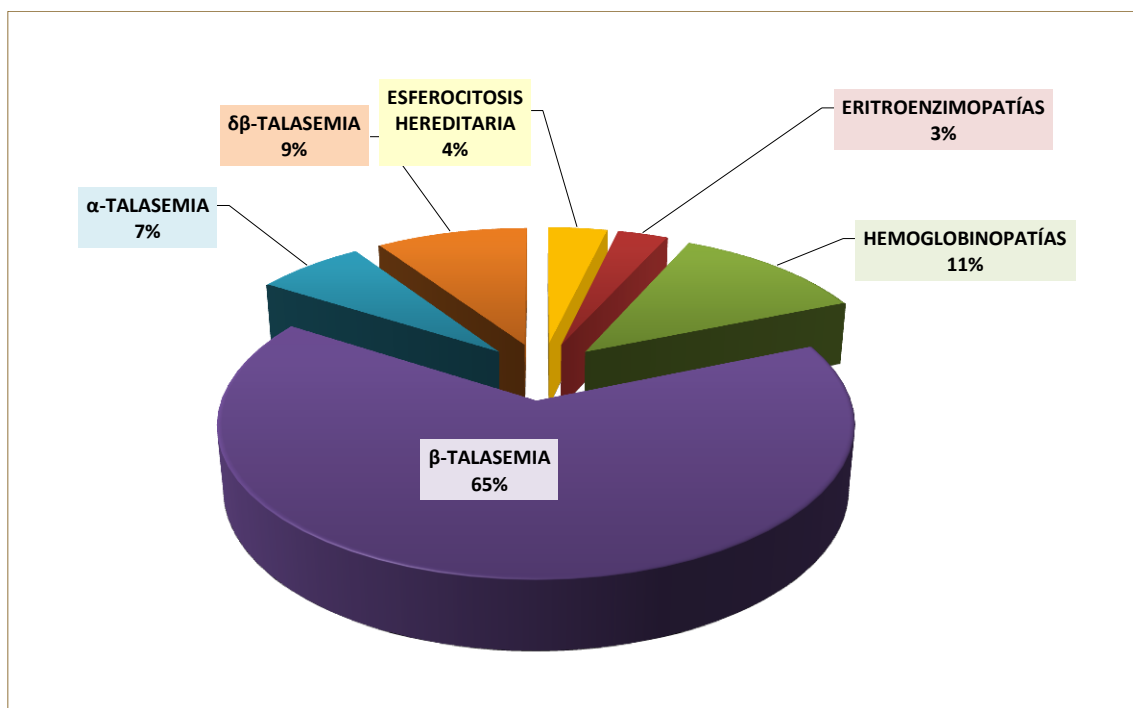
**Tabla 15. Número de diagnósticos realizados en nuestro centro entre los años 1995-2013.**

Diagnósticos	Periodo 1995-2003*	Periodo 2003-2013	Total 1995-2013 (n)
Déficit PK	0	5 (0,32%)	5
Déficit G6PDH	34 (7,67%)	43 (2,75%)	77
Talasemias	352 (79,28%)	1272 (81,38%)	1624
HBPT	20 (4,50%)	186 (11,90%)	206
Esferocitosis	38 (8,56%)	57 (3,65%)	95
TOTAL	444	1563	2007

\* La distribución de los diagnósticos en los dos periodos muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ). PK: piruvatokinasa; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; HBPT: hemoglobinopatías; EH: esferocitosis hereditaria.

Se puede observar que el diagnóstico de talasemias no se modificó de forma significativa al comparar ambos periodos. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas en el número de hemoglobinopatías y déficits de PK con una mayor incidencia en el segundo periodo, a diferencia de la esferocitosis y el déficit de G6PDH que disminuyeron ( $p < 0,01$  en todos los casos)

En el **gráfico 1** se muestra la distribución de patologías en el grupo total de pacientes. Como se puede observar, el grupo mayoritario es el de las talasemias, que constituyen el 82% del total de las anemias hereditarias. Dentro de estas predominan las  $\beta$ -talasemias, que representan un 65% del global de los diagnósticos.

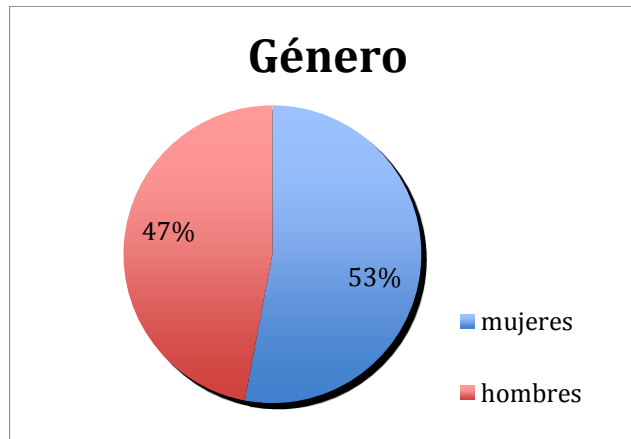


**Gráfico 1. Distribución de las AHH en el grupo total de pacientes.**

A continuación se describen los datos demográficos y analíticos de los pacientes estudiados. Estos datos se refieren a los diagnósticos realizados en el periodo 2003-2013, puesto que carecemos de datos óptimos completos para poder incluir a pacientes previos a dicho periodo.

### **1.2.- DATOS DEMOGRÁFICOS GENERALES.**

Del total de los pacientes estudiados, 828 fueron mujeres y 735 hombres (**gráfico 2**). La mediana de edad fue de 30 años con un rango de 0-94.



**Gráfico 2. Distribución por género de los pacientes diagnosticados de algún tipo de anemia hereditaria.**

La distribución de género según los tipos de anemia se describen en la **tabla 16**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna patología en función del sexo; en el déficit de G6PD un 60% de los pacientes fueron hombres y un 40 % mujeres, con una  $p=0,050$ .

**Tabla 16. Distribución de género en las diferentes patologías**

Diagnóstico por sexo	Mujeres n (%)	Hombres n (%)
Déficit PK	3 (60)	2 (40)
Déficit G6PDH*	17 (39,5)	26 (60,5)
Talasemias	692 (54,4)	580 (45,6)
HBPT	92 (49)	94 (51)
Esferocitosis	25 (43,9)	32 (56,1)

\*:  $p=0,050$

**1.3.- MOTIVO DEL ESTUDIO.**

En cuanto al motivo de estudio, un 4,9% de los pacientes estudiados fueron remitidos por tener algún familiar afecto de anemia hereditaria (**tabla 17**).

**Tabla 17. Estudios familiares en los pacientes diagnosticados de anemia hemolítica hereditaria.**

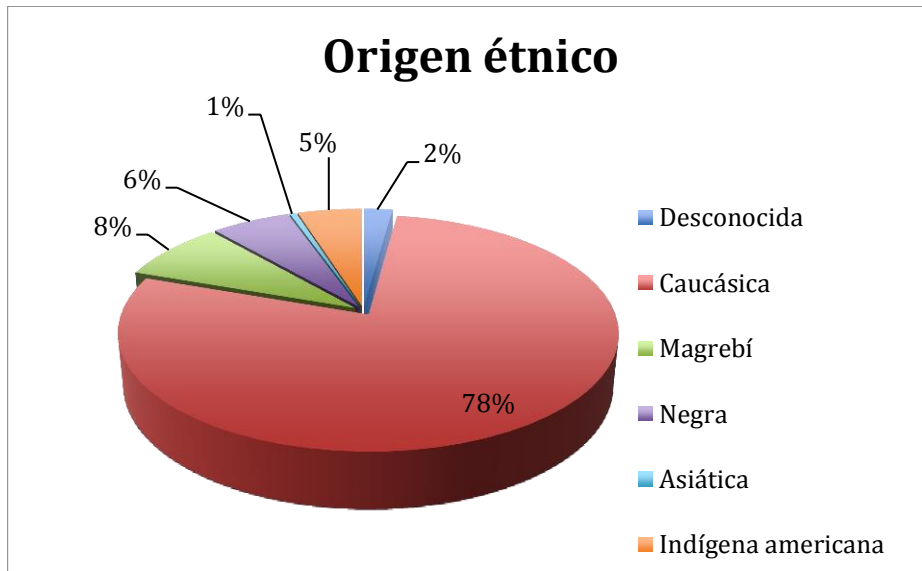
Motivo del estudio	Pacientes (n)	Porcentaje
Estudio no familiar	1486	95,1
Estudio familiar	77	4,9
Total	1563	100

**1.4.- ETNIA.**

Los pacientes fueron distribuidos en función de su nacionalidad española o extranjera (**tabla 18**). El 12% de los pacientes diagnosticados de anemias hemolíticas congénitas eran extranjeros y en un 14% no se registró el país de procedencia del paciente. También se realizó una estratificación en función de las siguientes 5 etnias, al igual que se ha realizado en la mayoría de estudios publicados en la literatura [34]: caucásica, magrebí, negra, asiática (referido a la población del sudeste asiático) e indígena Americano, amerindio o latinoamericanos, referido a los sujetos procedentes de Centro y Sudamérica. Como se puede observar en la **tabla 18** y en el **gráfico 3**, después de la caucásica, la etnia más frecuente observada en los estudios fue la magrebí, seguida de la raza negra. La raza asiática representa el 1% de todos los pacientes diagnosticados.

**Tabla 18. Distribución de pacientes por país de origen.**

País de origen	Pacientes (n)	Porcentaje
Desconocido	219	14
España	1158	74,1
No España	186	11,9
Total	1563	100



**Gráfico 3. Clasificación de todos los pacientes estudiados según los diferentes grupos étnicos.**

Al separar por país de origen, observamos diferencias significativas en cuanto a la distribución de patologías entre los pacientes españoles frente a los extranjeros ( $p < 0,001$ ), siendo la patología más frecuente en los españoles la talasemia, y en los extranjeros las hemoglobinopatías. Entre los pacientes de otros países y de país no conocido la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,06$ ) (tabla 19).

**Tabla 19. Distribución de patologías por país de origen (España vs extranjeros).**

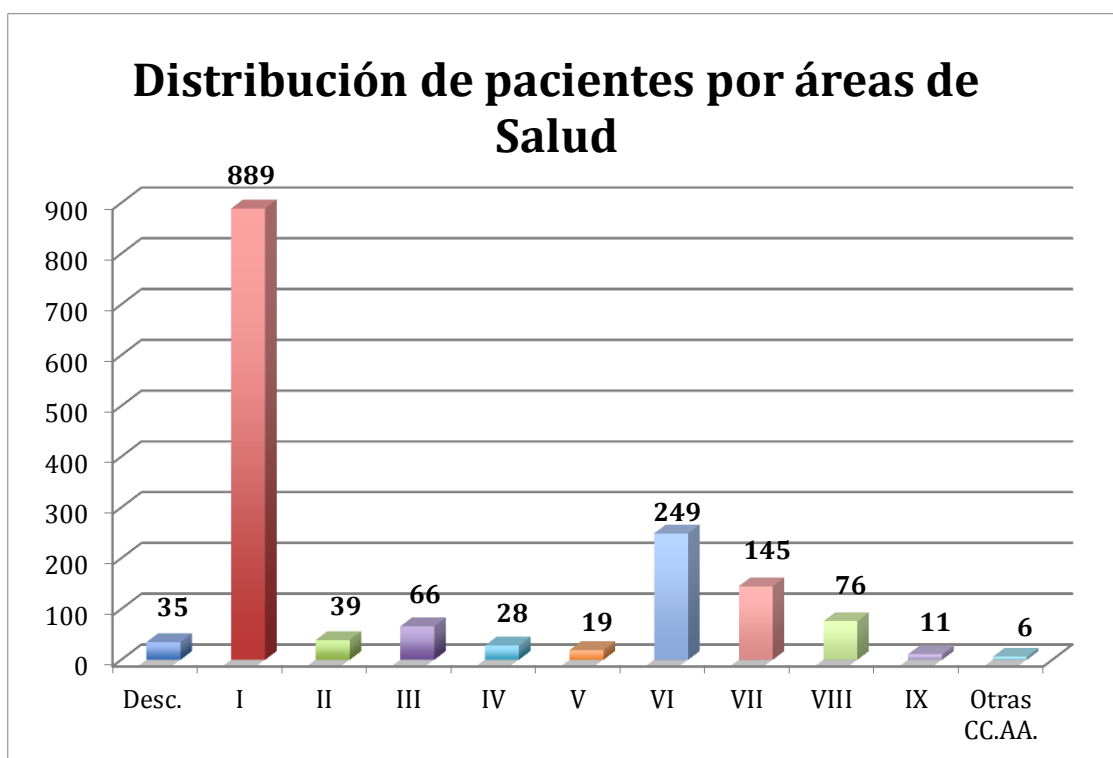
Diagnóstico	Español (%)	No español (%)	Desconocida (%)
Déficit PK	5 (100)	-	-
Déficit G6PDH	26 (65,0)	7 (17,5)	7 (17,5)
Esferocitosis	48 (84,2)	2 (5,3)	6 (10,5)
Talasemias	1113 (87,5)	87 (6,8)	72 (5,6)
HBPT	19 (10,21)	101 (54,30)	55 (35,48)

**1.5.- PROCEDENCIA (ÁREA DE SALUD).**

Si separamos los pacientes por áreas de salud de procedencia, la mayoría de estudios procedieron del área 1 (57%) seguida por el área 6 (16%) (tabla 20 y gráfico 4).

**Tabla 20. Distribución de pacientes por Áreas de Salud. Los resultados se expresan en número total y en porcentaje**

Procedencia	Pacientes (n)	Porcentaje
Desconocida	35	2,22
Área I	889	56,91
Área II	39	2,53
Área III	66	4,25
Área IV	28	1,79
Área V	19	1,23
Área VI	249	15,91
Área VII	145	9,25
Área VIII	76	4,87
Área IX	11	0,68
Otras CC.AA.	6	0,37
Total	1563	100



**Gráfico 4. Número total de pacientes por área de salud.**

La distribución de los resultados por patologías y por áreas de salud se representa en la **tabla 21**. Se observa un aumento significativo de diagnósticos en el Área I con respecto al resto de Áreas del Servicio Murciano de Salud con excepción del Área VII. Existen diferencias significativas al analizar entre sí otras Áreas de Salud como se representa en la **tabla 21**.



**TABLA 21. Distribución de patologías por áreas de salud. Los resultados se expresan en número total (porcentaje).**

Tipo de Anemia Hereditaria	Área 1*	Área 2 **	Área 3 ***	Área 4 #	Área 5 <sup>##</sup>	Área 6 <sup>###</sup>	Área 7	Área 8	Área 9	Desconocida/ Otras CC.AA
Déficit PK (5)	4 (80)	1 (20)	-	-	-	-	-	-	-	-
Déficit G6PDH(43)	14 (32,6)	4 (9,3)	8 (18,6)	1 (2,3)	-	4 (9,3)	4 (9,3)	5 (11,6)	2 (4,7)	1 (2,3)
Esferocitosis(57)	20 (35,1)	1 (1,8)	7 (12,3)	2 (3,5)	3 (5,3)	7 (12,3)	5 (8,8)	4 (7,0)	2 (3,5)	6 (10,5)
Talasemias(1272)	768 (60,4)	25 (2)	45 (3,6)	9 (0,7)	5 (0,4)	220 (17,3)	121 (9,4)	56(4,4)	6(0,4)	17 (1,3)
HBPT (186)	78 (41,9)	8 (4,30)	6 (3,22)	16 (8,60)	12 (6,45)	16 (8,60)	15 (8,06)	11 (5,91)	1 (0,53)	23 (12,36)
Total 1563	884	39	66	28	20	247	145	76	11	47

**Distribución de patologías por áreas de salud. Los resultados se expresan en número total (porcentaje). \*: diferencia estadística del área 1 con el resto de áreas de salud ( $p < 0,001$ ) excepto con el área 7. \*\*: diferencia significativa del área 2 con áreas: 1, 5, 6 y 7 ( $p < 0,010$ ). \*\*\*: diferencia significativa del área 3 con áreas: 1, 4, 5, 6, 7 y 8 ( $p < 0,035$ ). #: diferencia significativa del área 4 con áreas: 1, 3, 6 y 7 ( $p < 0,020$ ). ##: diferencia significativa del área 5 con áreas: 1, 2, 3, 6, 7 y 8 ( $p < 0,001$ ). ###: diferencia significativa del área 6 con área 8 ( $p = 0,001$ ).**

## 2.- ERITROENZIMOPATÍAS.

### 2.1.- ANEMIA HEMOLÍTICA POR DÉFICIT DE PIRUVATOKINASA ERITROCITARIA.

Se diagnosticaron un total de 5 anemias hemolíticas por déficit de PK. La mediana de edad fue de 43 años (rango: 36-72). En cuanto a género, 3 fueron mujeres y 2 hombres. Todos los pacientes eran de origen español y de etnia caucásica. La media de hemoglobina al diagnóstico fue de 11,2 g/dL con VCM normales y reticulocitos elevados. Los datos hematimétricos obtenidos de dos pacientes se muestran en la tabla 22.

**Tabla 22. Valores analíticos en los pacientes con déficit de PK.**

Parámetro (Uds)	Media ± desv. Típ.	Val. normales
Hematíes x10 <sup>6</sup> /uL	4,00±0,14	*
Hb g/dL	11,20± 1,13	*
Hto %	35,05±2,05	*
VCM fL	87,90±2,12	80-100
HCM pg/célula	30,15±1,91	*
CHCM g/dL	34,25±1,34	*
ADE %	11,95±1,2	11,5-14,5
Reticulocitos %	4,48±1,16	1-2
Plaquetas x10 <sup>3</sup> /uL	305,5±54,44	150-350
Leucocitos x10 <sup>3</sup> /uL	6,125±0,27	*
Piruvatokinasas U/gr. Hb	1,12±0,51	3,7-8,2

\*: los valores normales varían en función de edad y género.

Todos los diagnósticos fueron realizados a partir de estudios de anemia no incluidos en estudios familiares. 4 de los pacientes pertenecían al área I y 1 paciente procedía de otra área.

#### 2.1.1.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO

En cuanto al periodo de diagnóstico, en el **gráfico 5** se muestran los años de diagnóstico de los pacientes con déficit de PK eritrocitaria. No fue realizado ningún diagnóstico en el periodo previo a la implantación del SIL, y el primer caso diagnosticado data de 2008.

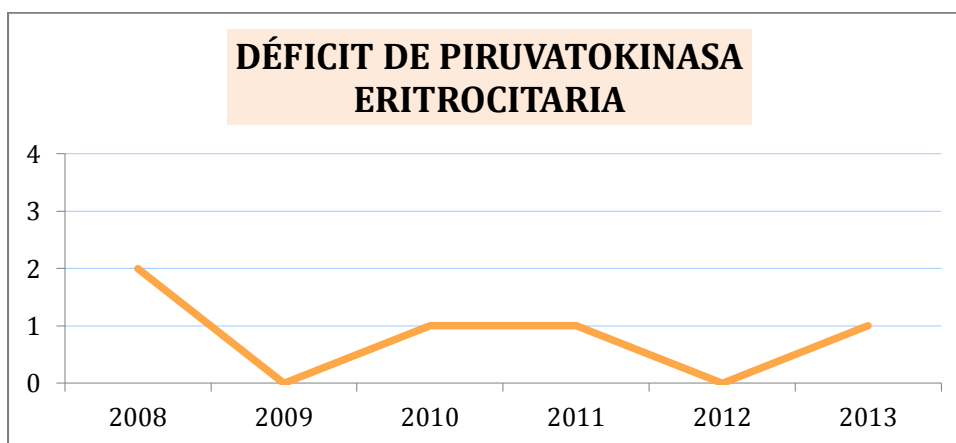


Gráfico 5. Déficit de PK distribuidos por año diagnóstico.

## 2.2.- ANEMIA HEMOLÍTICA POR DÉFICIT DE G6PDH.

Se diagnosticaron un total de 77 déficit de G6PDH (34 pacientes antes de la implantación del SIL y 43 después de la misma). La mediana de edad al diagnóstico del grupo de pacientes estudiados tras la implantación del SIL fue de 22 años (rango 0-71). En cuanto a la distribución por géneros, 17 fueron mujeres y 26 hombres (gráfico 6).

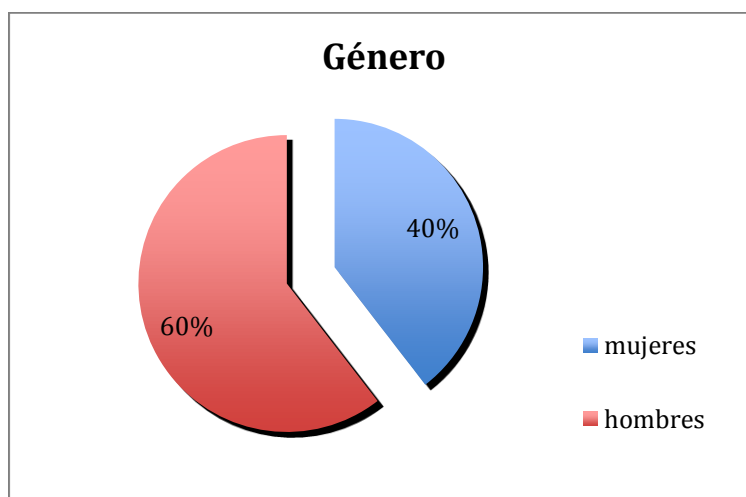
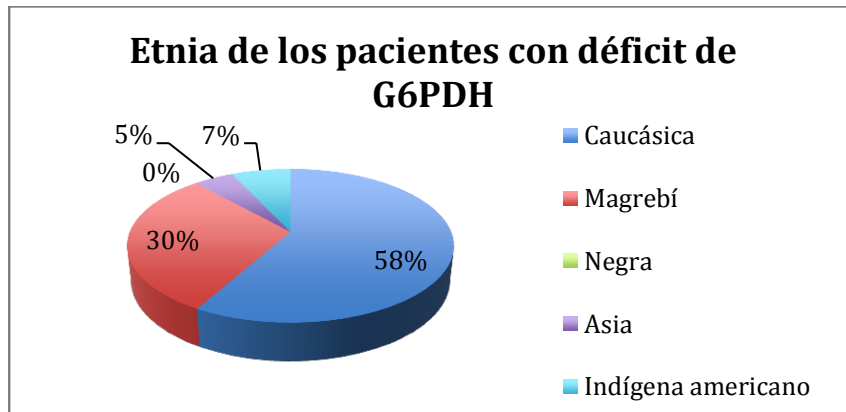


Gráfico 6. Distribución de pacientes con déficit de G6PDH por géneros.

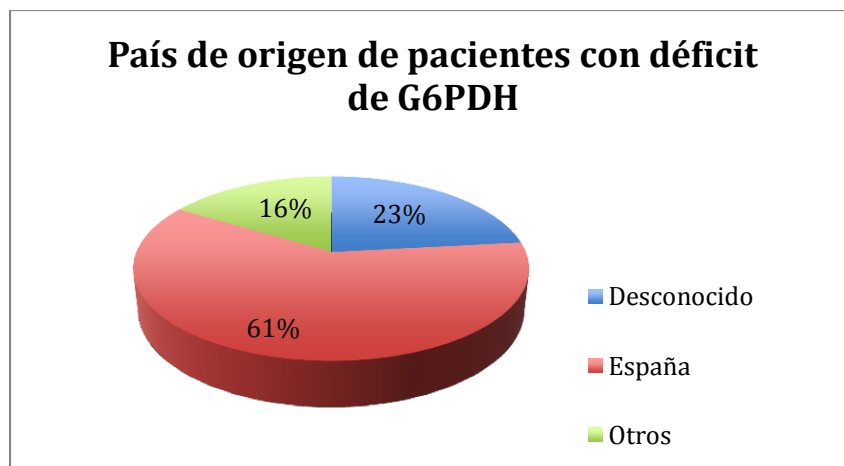
Al separar los pacientes por etnias, observamos que, después de la caucásica (58% del total de los pacientes con déficit de G6PDH), la etnia más frecuente fue la árabe, representando el 30% del total. 3 pacientes fueron de origen latinoamericano (gráfico 7).

No se identificó ningún paciente de raza negra.



**Gráfico 7. Origen étnico de los pacientes diagnosticados de déficit de G6PDH eritrocitaria.**

En la distribución por país de origen, en 11 pacientes no se pudo obtener el mismo. 2 pacientes procedían de China, 1 de Nigeria y 5 de Marruecos. 26 pacientes (61%) eran de origen español (**gráfico 8**).



**Gráfico 8. Distribución por país de origen en los pacientes diagnosticados de déficit de G6PDH.**

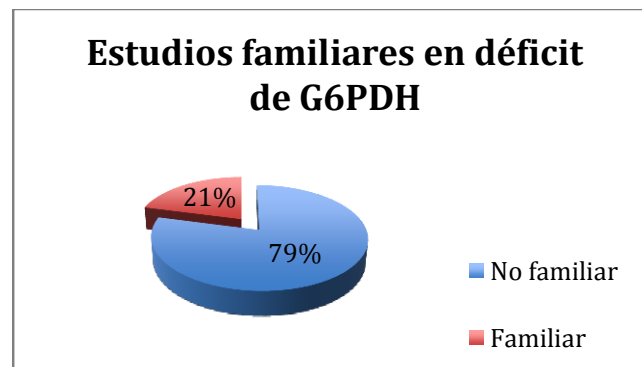
En la **tabla 23** se exponen los resultados de los valores hematimétricos y bioquímicos de los pacientes diagnosticados de déficit de G6PDH en nuestro centro.

**Tabla 23. Valores analíticos en los pacientes con déficit de G6PDH. Al lado de cada parámetro se indica el número de pacientes de los que se disponía de dicho resultado**

Parámetro (n)	Media ± desv. típica	Valores normales.
Hematíes x10 <sup>6</sup> /uL (n=8)	28,68±72,47	*
Hb g/dL(n=8)	9,21±3,67	*
Hto. % (n=8)	26,21±9,95	*
VCM fL (n=8)	87,39±3,88	80-100
HCM pg/célula (n=8)	30,53±2,19	*
CHCM g/dL(n=8)	34,95±2,17	*
ADE % (n=8)	12,43±1,63	11,5-14,5
Reticulocitos %(n=8)	8,27±6,28	1-2
Plaquetas x10 <sup>3</sup> /uL (n=8)	318,5±107,58	150-350
Leucocitos x10 <sup>3</sup> /uL (n=8)	12,58±5,18	*
Fe mcg/dl (n=4)	217,00±102,24	*
Glucosa6PDH u/gr de Hb (n=43)	1,79±1,28	4,6-13,5
Lisis segundos (n=6)	34,33±4,76	28-44

\*: los valores normales varían en función del género y el grupo de edad.

Un total de 9 estudios (21%) se realizaron como parte de un estudio familiar (**gráfico 9**).



**Gráfico 9. Proporción de estudios familiares en los pacientes con déficit de G6PDH.**

**2.2.1.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO**

En el **gráfico 10** se muestra la distribución de diagnósticos por año.

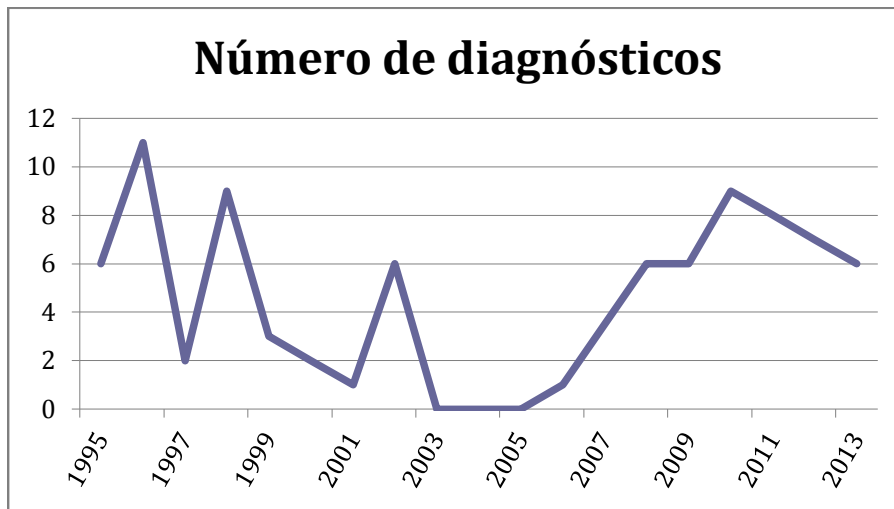


Gráfico 10. Número de diagnósticos por año de déficit de G6PDH

### 3.- MEMBRANOPATÍAS: ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

Se diagnosticaron un total de 95 esferocitosis hereditarias (38 antes de la implantación del SIL y 57 después de la misma). La mediana de edad al diagnóstico fue de 23 años (0-81). En cuanto a la distribución por géneros, 25 fueron mujeres y 32 hombres (**gráfico 11**).

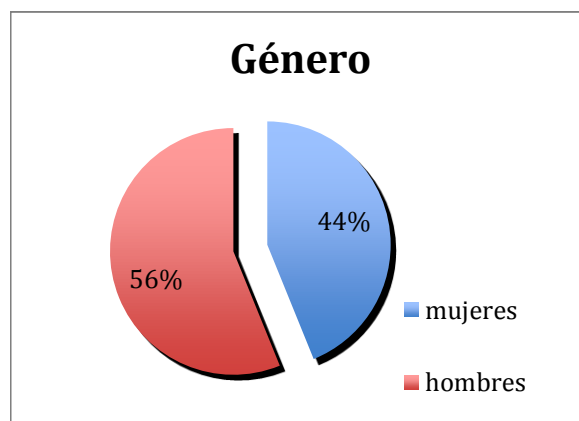


Gráfico 11. Distribución por géneros de pacientes con esferocitosis hereditaria.

En la estratificación por etnia de los pacientes diagnosticados, 6 de ellos eran de origen sudamericano, 2 árabes y 1 no conocida (**gráfico 12**). En 6 pacientes no se pudo obtener el país de origen; un paciente procedía de Ecuador y 2 de Marruecos. El resto (84,2%) eran de origen español (**gráfico 13**).

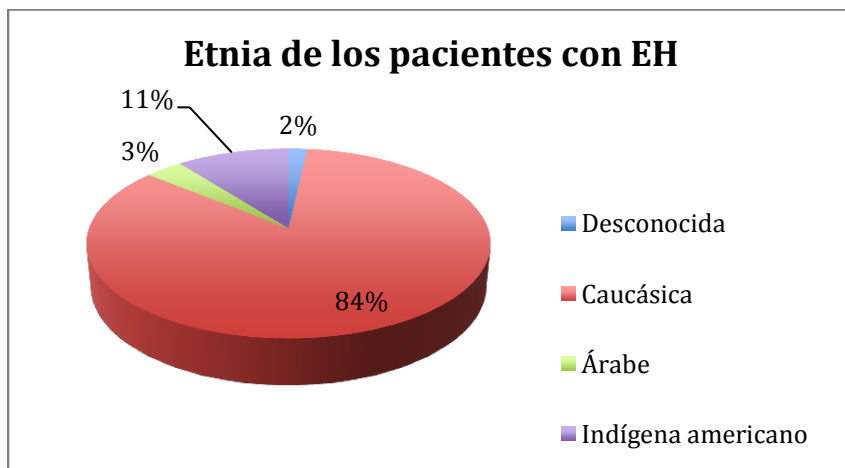


Gráfico 12. Distribución por etnias en pacientes con esferocitosis hereditaria.

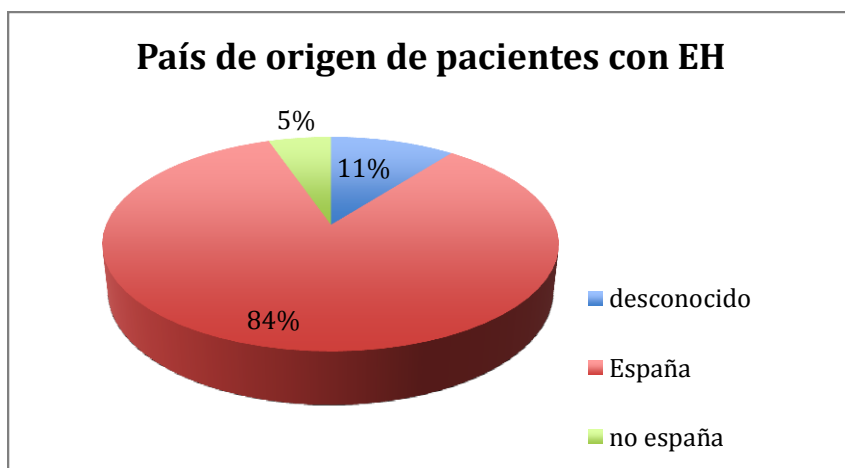


Gráfico 13. País de procedencia de pacientes con esferocitosis hereditaria.

En la **tabla 24** se exponen los valores medios de los parámetros hematimétricos y bioquímicos analizados en los pacientes con EH.

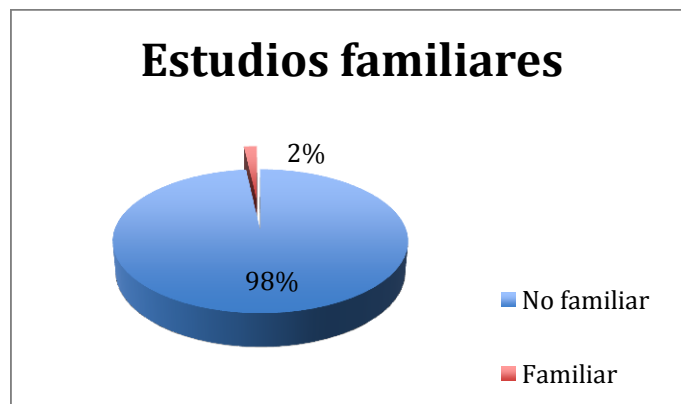
**Tabla 24. Valores analíticos en pacientes con esferocitosis hereditaria.**

Parámetro (n)	Media ± desv. Típica	Valores normales
Hematíes x10 <sup>6</sup> /uL (n=47)	3,78±0,73	*
Hb g/dL (n=47)	11,62±2,21	*
Hto % (n=47)	32,55±5,86	*
VCM fL (n=47)	86,75±7,42	80-100
HCM pg/célula (n=47)	30,93±2,81	*
CHCM g/dL (n=47)	35,41±1,94	*
ADE % (n=47)	16,28±3,52	11,5-14,5
Reticulocitos % (n=47)	8,00±5,76	1-2
Plaquetas x10 <sup>3</sup> /uL (n=6)	359,83±184,22	150-350
Leucocitos x10 <sup>3</sup> /uL (n=6)	11636,67±7212,8	*
Fe mcg/dl (n=5)	139,20±134,6	59-158
Ferritina ng/ml (n=5)	688,20±395,07	*
CT mg/dl (n=5)	192,40±18,64	200-360
IST % (n=5)	41,00±7,35	24-40
Haptoglobina mg/dl (n=5)	10,00±3,46	30-200
Hemopexina mg/dl (n=5)	42,50±28,99	50-115
Lisis segundos (n=47)	26,44±6,11	28-44
Glucosa6PDH U/gr de Hb (n=5)	15,58±2,79	4,6-13,5

\*: los valores normales varían en función del género y el grupo de edad.

Sólo uno de los diagnósticos se realizó en el contexto de un estudio familiar (**gráfico**

14).



**Gráfico 14. Proporción de pacientes diagnosticado de EH a partir de un estudio familiar.**



### 3.1.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO.

Atendiendo a la distribución por año de diagnóstico, se muestra en el **gráfico 15** el número de diagnósticos realizados desde 1995, observándose que 1998 fue el año con mayor número de diagnósticos y que únicamente en el año 2002 no se realizó ninguno.

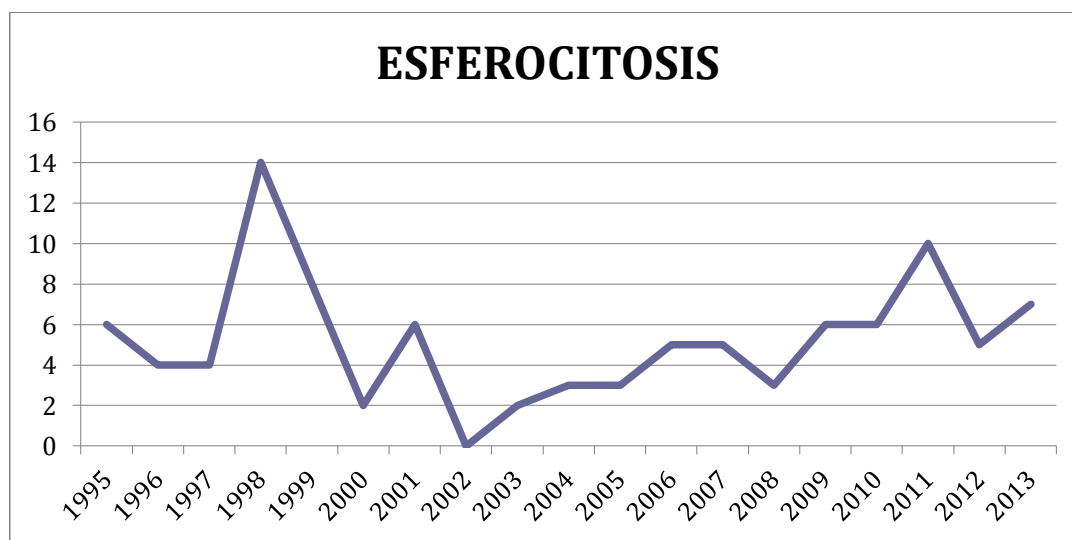


Gráfico 15. Número de pacientes diagnosticados de EH en nuestro Hospital por año.

## 4.- TALASEMIAS.

### 4.1.- $\alpha$ -TALASEMIA.

Se diagnosticaron un total de 115  $\alpha$ -talasemias: 16 en el periodo 1995-2002 y 103 en el periodo 2003-2013. La mediana de edad al diagnóstico fue de 10,5 años (1-76). En cuanto a la distribución por géneros, 47 fueron mujeres y 56 hombres (**gráfico 16**).

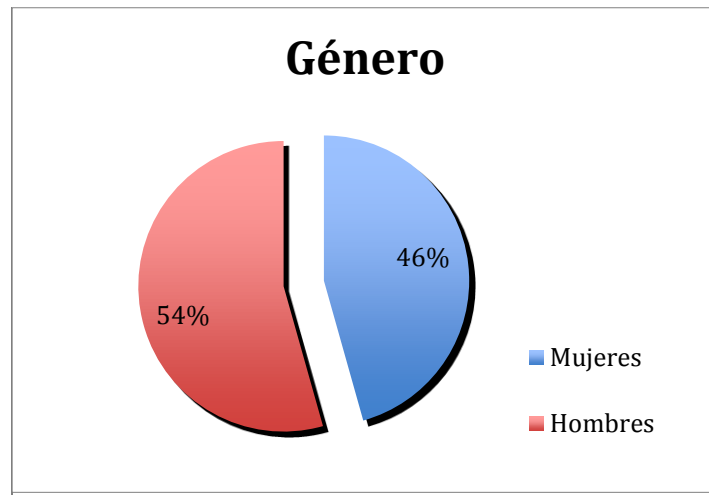


Gráfico 16. Distribución por género de los pacientes con  $\alpha$ -talasemia.

Las etnias de los pacientes diagnosticados en el periodo 2003-2013 fueron las siguientes: 79 caucásica, 7 árabe, 6 negra, 3 asiática, 2 amerindia y 6 de etnia no conocida. En cuanto al país de origen, la mayoría de pacientes en este grupo procedían de España (n=77);. En 13 pacientes no se pudo obtener el país de origen. Los pacientes extranjeros procedieron de los siguientes países: 3 de China, 4 de Nigeria, 3 de Marruecos y 3 de Bulgaria (**gráficos 17, 18 y 19**).

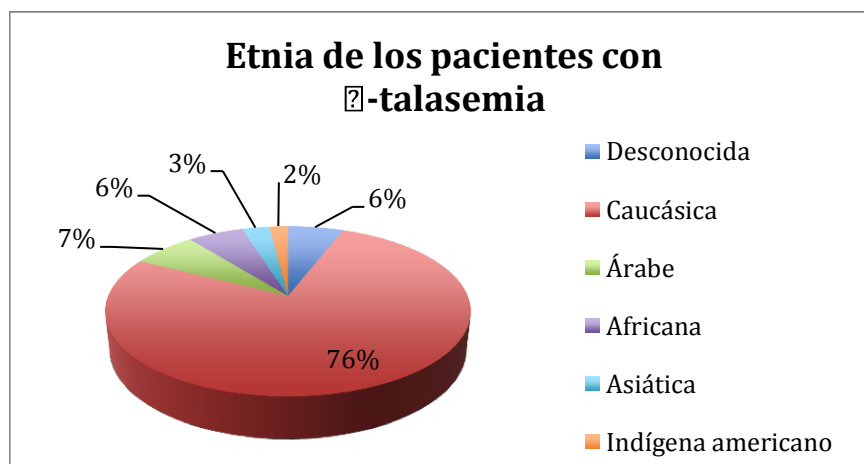


Gráfico 17. Distribución por etnias de los pacientes diagnosticados de  $\alpha$ -talasemia.

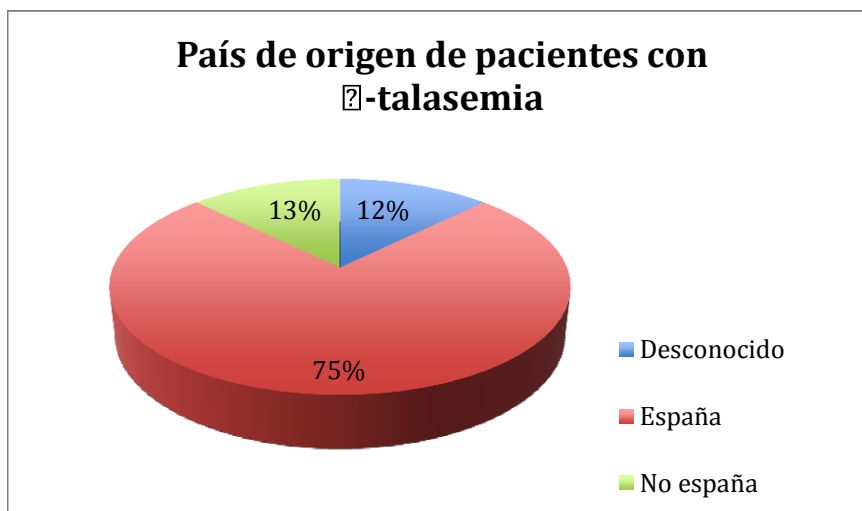


Gráfico 18. País de procedencia de pacientes diagnosticados de α-talasemia.

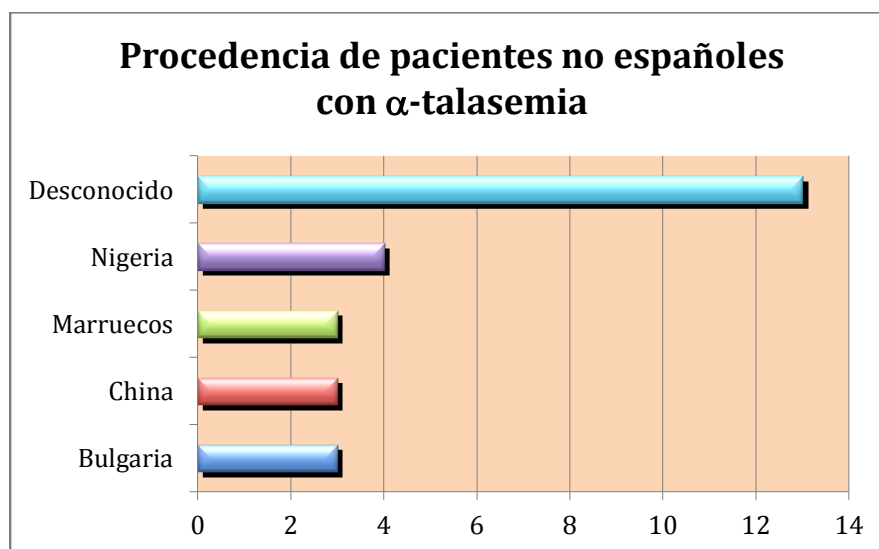


Gráfico 19. Distribución de α-talasemia en función de la nacionalidad extranjera

#### 4.1.1.- DATOS ANALÍTICOS GENERALES

A continuación se exponen los resultados analíticos de los pacientes diagnosticados de α-talasemia en nuestro centro. La **tabla 25** expone los parámetros analíticos del conjunto global de los pacientes diagnosticados de α-talasemia. En la **tabla 26** se reflejan los parámetros hematimétricos de los pacientes en función de su perfil molecular. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en el VCM, HCM y CHCM entre los dos grupos.

No disponemos de datos analíticos de los pacientes diagnosticados de α<sup>T</sup>. Solamente se obtuvieron los datos analíticos de un paciente con Hb H.

**Tabla 25. Valores analíticos en los pacientes con  $\alpha$ -talasemia**

Parámetro (n)	Media $\pm$ desv. típica	Valores normales
Hematíes $\times 10^6/\mu\text{L}$ (n=64)	5,23 $\pm$ 0,68	*
Hb g/dL (n=64)	12,56 $\pm$ 1,65	*
Hto. % (n=64)	38,00 $\pm$ 4,70	*
VCM fL (n=64)	73,08 $\pm$ 6,67	80-100
HCM pg/célula (n=64)	24,18 $\pm$ 2,82	*
CHCM g/dL(n=64)	33,03 $\pm$ 1,48	*
ADE % (n=64)	13,94 $\pm$ 2,70	11,5-14,5
Reticulocitos % (n=33)	1,12 $\pm$ 0,42	1-2
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$ (n=64)	296,00 $\pm$ 108,2	150-350
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ (n=64)	7,58 $\pm$ 2,60	*
Fe mcg/dl(n=52)	145,48 $\pm$ 481,51	59-158
Ferritina ng/ml (n=50)	85,68 $\pm$ 138,78	*
CT mg/dl (n=49)	282,65 $\pm$ 51,04	200-360
IST % (n=20)	31,85 $\pm$ 15,04	24-40
Lisis segundos (n=21)	39,38 $\pm$ 8,96	28-44
HbA2 % (n=77)	2,72 $\pm$ 0,44	**
HbF % (n=71)	0,56 $\pm$ 1,42	**

\*: los valores normales varían en función del género y el grupo de edad.

\*\* : los valores normales varían en función de la técnica utilizada.

**Tabla 26. Parámetros analíticos de los pacientes con  $\alpha$ -talasemia según el perfil molecular.**

Parámetro	$\alpha^0$ -talasemia		$\alpha^+$ -talasemia	
	N	Media $\pm$ desv. típica	N	Media $\pm$ desv. típica
Hematíes $\times 10^6/\mu\text{L}$	43	5,14 $\pm$ 0,54	16	5,42 $\pm$ 0,93
Hb g/dL	43	12,72 $\pm$ 1,64	16	12,17 $\pm$ 1,83
Hto %	43	38,19 $\pm$ 4,50	16	37,53 $\pm$ 5,72
VCM* fL	43	74,53 $\pm$ 6,21	16	69,63 $\pm$ 5,41
HCM* pg/célula	43	24,84 $\pm$ 2,65	16	22,57 $\pm$ 1,91
CHCM* g/dl	43	33,28 $\pm$ 1,49	16	32,41 $\pm$ 1,22
ADE %	43	13,81 $\pm$ 2,61	16	14,03 $\pm$ 2,66
Retic.%	19	1,06 $\pm$ 0,25	10	1,11 $\pm$ 0,24
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	43	294,86 $\pm$ 96,87	16	294,37 $\pm$ 138,69
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	43	7,61 $\pm$ 1,97	16	7,71 $\pm$ 4,1
Fe mcg/dl	37	172,08 $\pm$ 57,30	11	67,73 $\pm$ 29,33
Ferritina ng/ml	35	77,63 $\pm$ 19,11	11	78,18 $\pm$ 19,43
CT mg/dl	35	282,71 $\pm$ 56,25	10	268,60 $\pm$ 33,17
IST %	13	33,15 $\pm$ 15,28	4	22,00 $\pm$ 7,83
Fólico ng/ml	2	7,35 $\pm$ 2,90	3	10,40 $\pm$ 3,50
B12 pg/ml	2	457,50 $\pm$ 91,22	3	637,67 $\pm$ 95,47
HbA2 %	52	2,75 $\pm$ 0,49	17	2,55 $\pm$ 0,28
HbF %	48	0,40 $\pm$ 0,99	16	0,57 $\pm$ 0,84
Lisis segundos	12	38,67 $\pm$ 8,24	6	44,00 $\pm$ 8,05
Haptoglobina mg/dl	14	122,29 $\pm$ 87,07	6	123,50 $\pm$ 29,95

\* existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos grupos.

Del total de los pacientes diagnosticados de  $\alpha$ -talasemia, 22 de los estudios se realizaron como parte de un estudio familiar (**gráfico 20**).

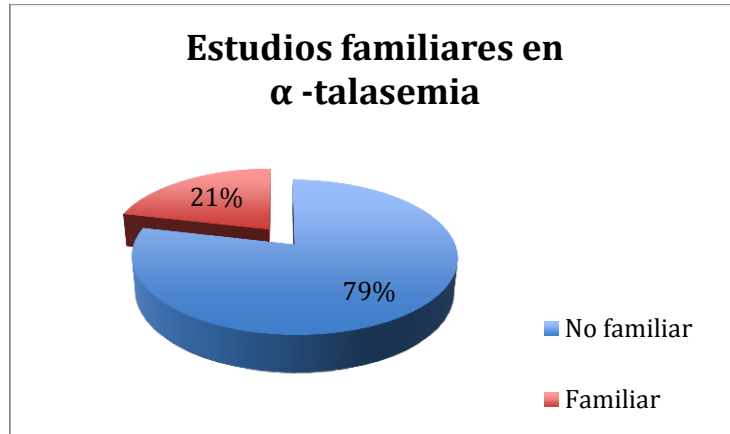


Gráfico 20. Proporción de  $\alpha$ -talasemias diagnosticadas en el contexto de un estudio familiar.

**4.1.2.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO**

En la distribución por año de diagnóstico existe un aumento en la incidencia de casos durante el año 2008 coincidiendo con el inicio de los estudios genéticos en nuestro centro (gráfico 21).

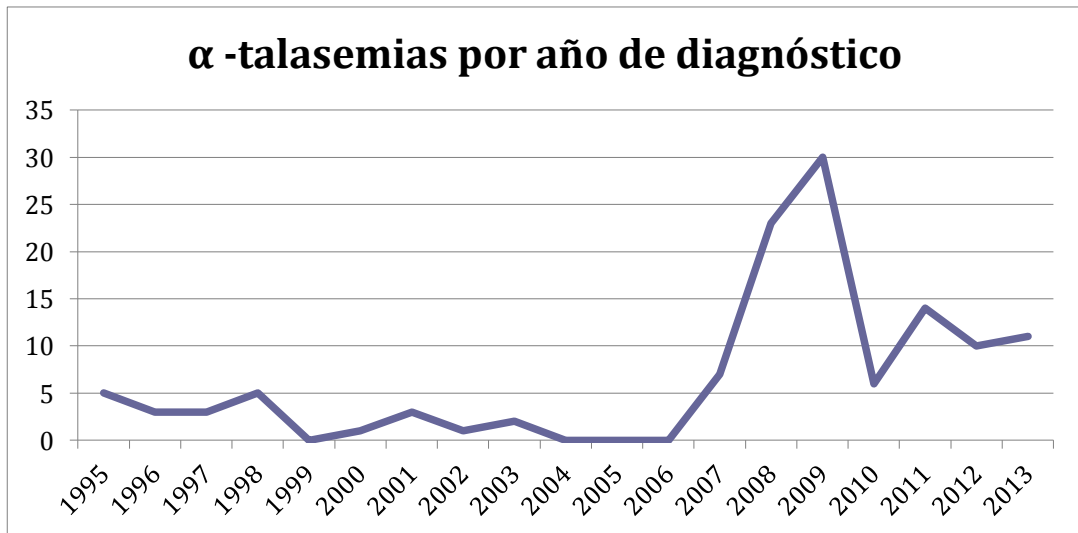
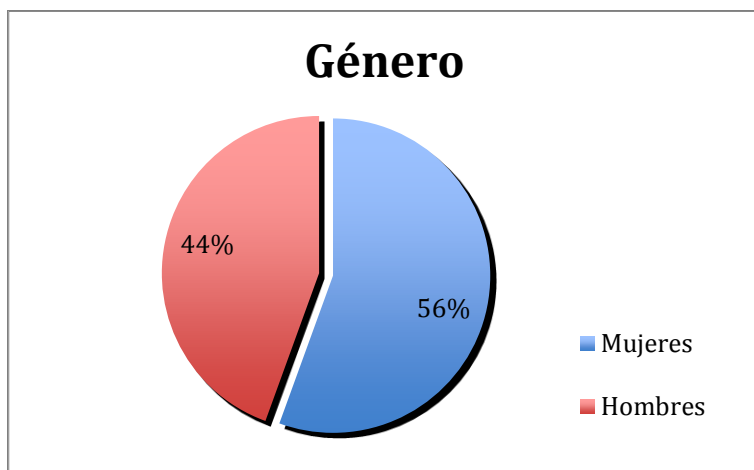


Gráfico 21. Número de pacientes diagnosticados de  $\alpha$ -talasemia por año en nuestro centro.

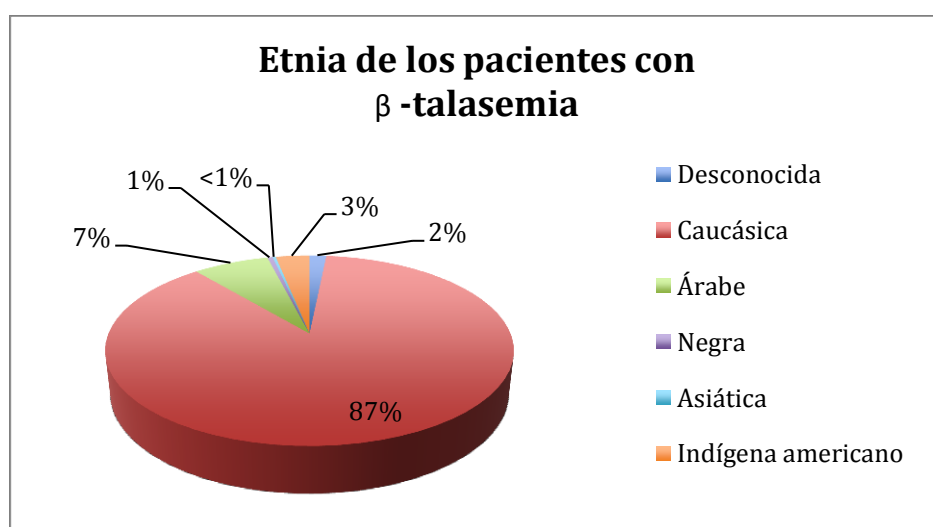
**4.2.- BETA-TALASEMIA.**

En total se diagnosticaron 1285 pacientes: 276 en el periodo anterior a la implantación del SIL (1995-2002) y 1010 en el periodo posterior (2003-2013). La mediana de edad al diagnóstico de los pacientes con  $\beta$ -talasemia fue de 32 años (0-92). En la distribución por géneros, un total de 449 pacientes eran hombres, y 561 mujeres (**gráfico 22**).



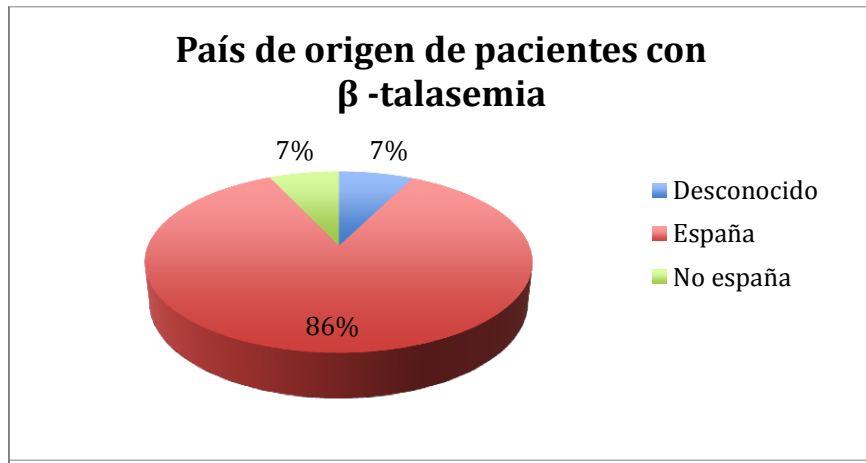
**Gráfico 22.** Distribución por género de los pacientes diagnosticados de  $\beta$ -talasemia.

La etnia mayoritaria fue la caucásica (87%), seguida de la árabe y la amerindia. Fueron diagnosticados 3 pacientes de raza asiática (**gráfico 23**).



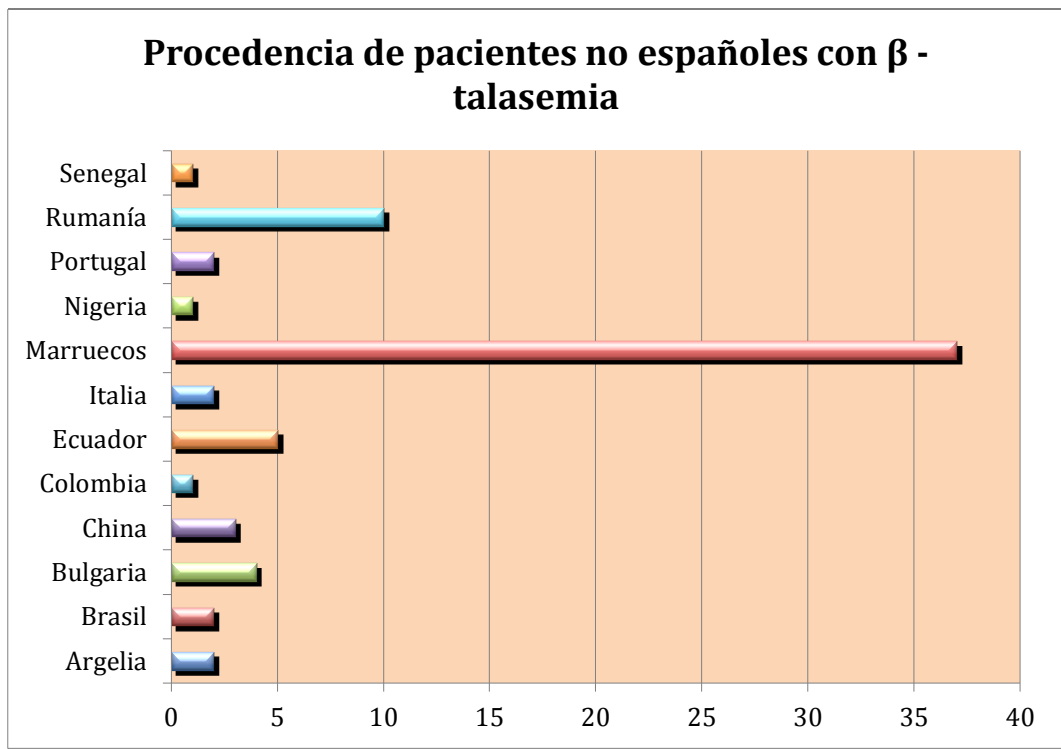
**Gráfico 23.** Distribución por etnias de los pacientes diagnosticados de  $\beta$ -talasemia.

En cuanto al país de origen, la mayoría de los pacientes procedían de España, como se representa en el **gráfico 24**.



**Gráfico 24.** País de procedencia de pacientes diagnosticados de  $\beta$ -talasemia.

De los pacientes procedentes de otros países, la mayoría eran de Marruecos. También destaca la presencia de un 14% de pacientes procedentes de Rumanía (**gráfico 25**).



**Gráfico 25.** Pacientes extranjeros con  $\beta$ -talasemia por país de procedencia



**4.2.1.- DATOS ANALÍTICOS GENERALES**

Del total de  $\beta$ -talasemias, se realizó diagnóstico de  $\beta$ -talasemia intermedia a 69 pacientes (6,83%); y de  $\beta$ -talasemia mayor, a 3 pacientes (0,30%). A continuación (**tabla 27**) se exponen los valores medios de los parámetros hematimétricos y bioquímicos analizados en los pacientes con  $\beta$ -talasemia.

**Tabla 27. Valores analíticos en pacientes con  $\beta$ -talasemia**

	$\beta$ -tal. minor		$\beta$ -tal. intermedia		$\beta$ -tal. mayor	
	N	Media $\pm$ DE	N	Media $\pm$ DE	N	Media $\pm$ DE
Hematíes $\times 10^6/\mu\text{L}$	511	6,6153 $\pm$ 21,04	42	5,06 $\pm$ 0,64	3	3,033 $\pm$ 0,67
Hb g/dl	512	11,82 $\pm$ 2,87	43	9,99 $\pm$ 0,80	3	7,6 $\pm$ 1,95
Hto %	511	35,76 $\pm$ 4,67	42	30,49 $\pm$ 2,66	3	22,3 $\pm$ 4,36
VCM fl	511	63,13 $\pm$ 4,66	44	60,86 $\pm$ 5,90	3	73,367 $\pm$ 5,98
HCM pg/célula	511	20,71 $\pm$ 2,37	43	19,97 $\pm$ 2,04	3	24,767 $\pm$ 1,25
CHCM g/dl	511	32,59 $\pm$ 1,49	43	32,79 $\pm$ 1,29	3	33,733 $\pm$ 2,89
ADE %	509	17,20 $\pm$ 2,35	42	18,94 $\pm$ 4,09	3	28,667 $\pm$ 0,78
Retic.%	74	2,44 $\pm$ 2,04	19	2,40 $\pm$ 1,36	3	5,9 $\pm$ 1,82
Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	503	275,82 $\pm$ 90,52	43	364,27 $\pm$ 165,34		
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	503	7,85 $\pm$ 4,27	44	8,45 $\pm$ 2,76	3	17,77 $\pm$ 12,93
Fe mcg/dl	219	90,71 $\pm$ 79,46	30	68,7 $\pm$ 30,37	3	173 $\pm$ 22,07
Ferritina ng/ml	209	141,08 $\pm$ 278,55	32	72,81 $\pm$ 83,25	3	172,33 $\pm$ 33,62
CT mg/dl	146	259,74 $\pm$ 46,06	29	255,1 $\pm$ 62,69	3	202,66 $\pm$ 16,07
IST %	94	26,01 $\pm$ 14,08	12	27,26 $\pm$ 17,23	3	86,33 $\pm$ 17,16
haptoglobina	44	152,27 $\pm$ 112,04	7	169,57 $\pm$ 115,59	1	12,00

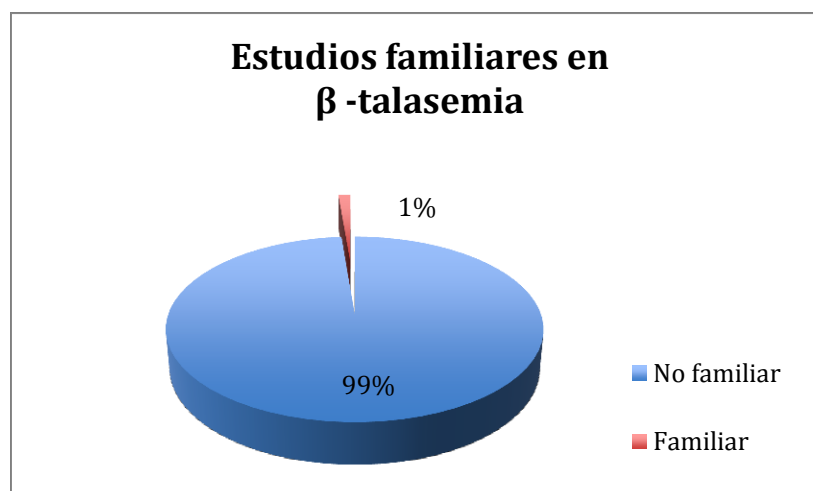
Si separamos las  $\beta$ -talasemias según su perfil molecular encontramos que existen diferencias significativas en los niveles de Hb y el Hto al comparar las  $\beta^+$ -talasemias frente a las  $\beta^0$ -talasemias (**tabla 28**).

**Tabla 28. Parámetros analíticos en los pacientes con  $\beta$ -talasemia en función del perfil molecular.**

Parámetro	$\beta^+$ -talasemia		$\beta^0$ -talasemia	
	n	media+/- DE	N	media+/- DE
Hematíes $\times 10^6/uL$	6	5,73 $\pm$ 0,60	14	5,05 $\pm$ 0,85
Hb (g/dL) *	6	12,47 $\pm$ 1,95	14	10,69 $\pm$ 1,20
Hto (%) *	6	37,23 $\pm$ 4,50	14	32,11 $\pm$ 4,15
VCM fL	6	65,32 $\pm$ 6,12	14	64,5 $\pm$ 6,67
HCM pg/célula	6	21,88 $\pm$ 3,17	14	21,56 $\pm$ 2,94
CHCM g/dl	6	33,45 $\pm$ 2,16	14	33,36 $\pm$ 1,51
ADE %	6	17,68 $\pm$ 6,25	14	18,10 $\pm$ 3,08
Retic.%	4	2,15 $\pm$ 1,29	7	1,81 $\pm$ 1,34
Plaquetas $\times 10^3/uL$	6	356,83 $\pm$ 124,56	14	307,50 $\pm$ 96,67
Leucocitos $\times 10^3/uL$	6	7,21 $\pm$ 1,08	14	8,196 $\pm$ 4,11
Fe mcg/dl	4	80,75 $\pm$ 7,41	6	144,33 $\pm$ 126,54
Ferritina ng/ml	5	52,00 $\pm$ 31,73	9	243,33 $\pm$ 395,67
CT mg/dl	5	292,00 $\pm$ 48,16	8	233,13 $\pm$ 49,84
IST %	4	24,75 $\pm$ 6,29	2	23 $\pm$ 7,07
Fólico ng/ml	1	8,50	2	4,20 $\pm$ 1,56
B12 pg/ml	1	530	2	624,00 $\pm$ 511,95

\*existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos grupos.

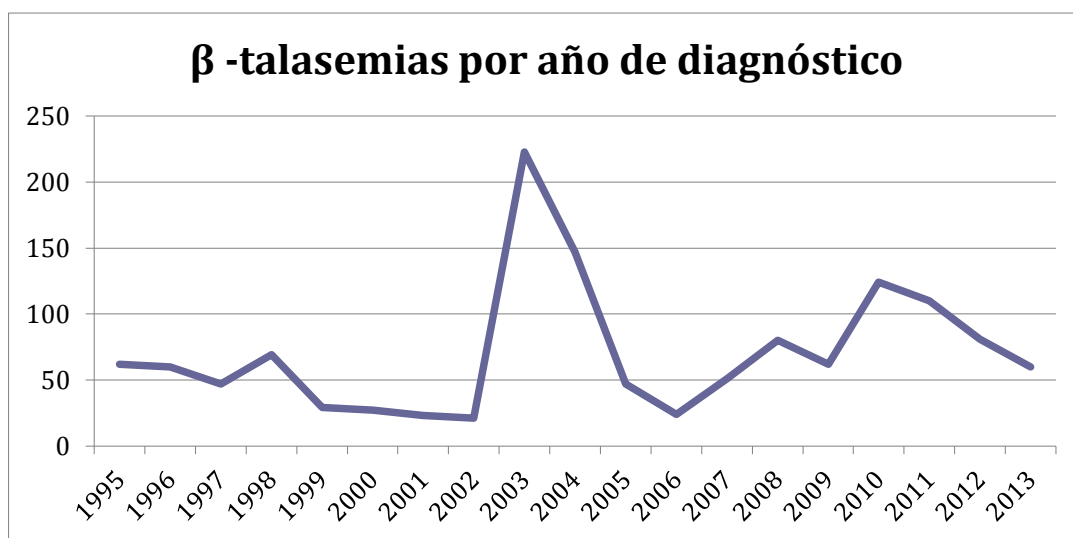
Prácticamente todos los pacientes (99%) fueron diagnosticados fuera de un estudio familiar (**gráfico 26**).



**Gráfico 26. Proporción de pacientes diagnosticado de  $\beta$ -talasemia a partir de un estudio familiar.**

#### 4.2.2.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO

Si dividimos los pacientes por año de diagnóstico, se observa un aumento en la incidencia de casos diagnosticados en el período 2003-2004 durante los primeros años de informatización de los sistemas. En los años posteriores existe mayor número de diagnósticos que en los previos a la instauración del SIL (**gráfico 27**).



**Gráfico 27. Número de pacientes diagnosticados de  $\beta$ -talasemia por año en nuestro centro.**

#### 4.3.- DELTA-BETA-TALASEMIA.

Se diagnosticaron un total de 199  $\delta\beta$ -talasemias (54 en el periodo 1995-2002 y 145 en los años 2003-2013). La mediana de edad al diagnóstico fue de 32 años (1-94).

De los pacientes diagnosticados, 83 fueron mujeres y 62 hombres. Los resultados porcentuales se muestran en el **gráfico 28**.

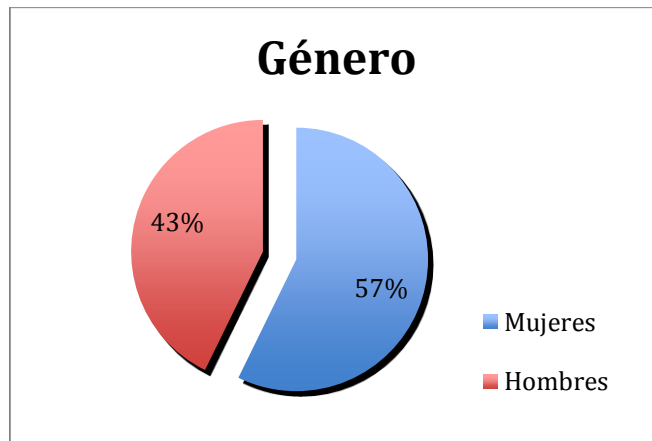


Gráfico 28. Distribución por género de los pacientes diagnosticados de  $\delta\beta$ -talasemia.

La distribución por etnias de los pacientes diagnosticados en el periodo 2003-2013 fue la siguiente: 140 de etnia caucásica, 4 de etnia indígena americana y 1 de etnia desconocida (gráfico 29).

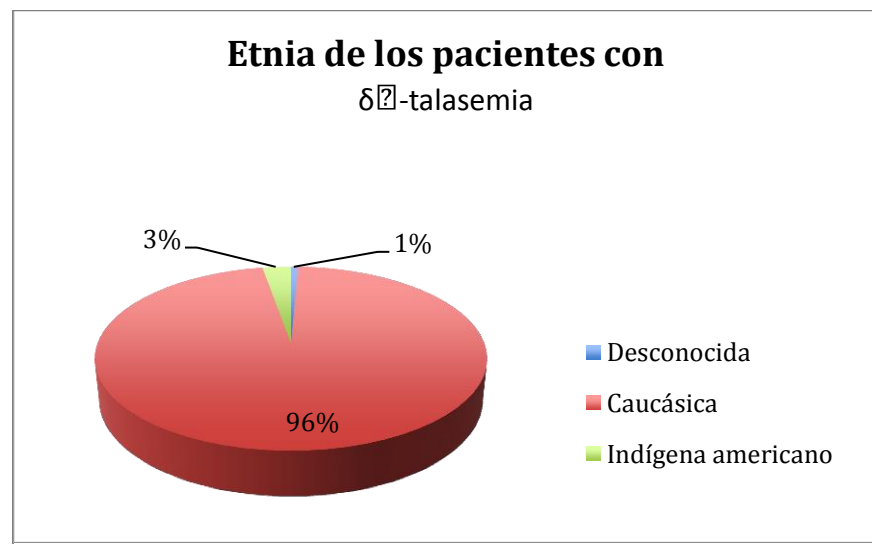


Gráfico 29. Distribución por etnias de los pacientes diagnosticados de  $\delta\beta$ -talasemia.

Atendiendo al país de origen, la mayoría de los pacientes diagnosticados en nuestro centro (98%) eran de origen español (gráfico 30).

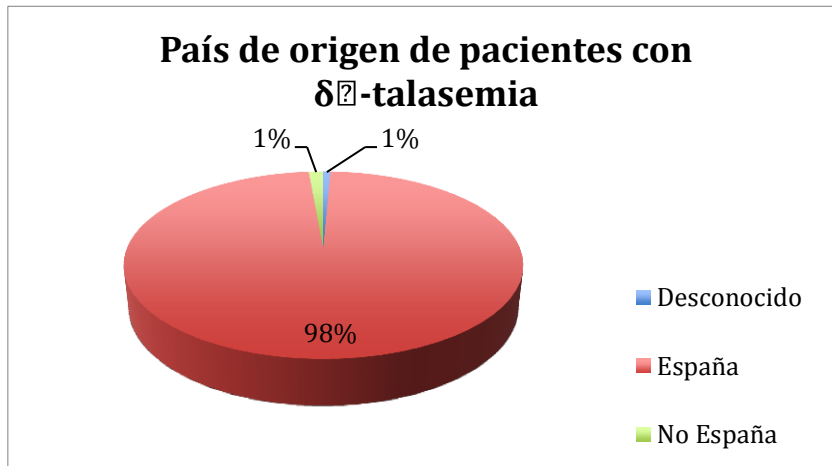


Gráfico 30. País de procedencia de pacientes diagnosticados de  $\delta\beta$ -talasemia.

#### 4.3.1.- DATOS ANALÍTICOS GENERALES

Los datos analíticos se muestran en la **tabla 29**.

**Tabla 29. Valores analíticos en pacientes con  $\delta\beta$ - talasemia**

Parámetro	Media $\pm$ desv. Típica	Valores normales
Hematíes x106/ul (n=94)	5,46 $\pm$ 0,62	*
Hb g/dl (n=94)	11,79 $\pm$ 1,18	*
Hto % (n=94)	35,74 $\pm$ 3,72	*
VCM fL (n=94)	65,93 $\pm$ 6,05	80-100
HCM pg/célula (n=94)	21,77 $\pm$ 2,40	*
CHCM g/dl (n=94)	33,01 $\pm$ 1,50	*
ADE % (n=94)	20,83 $\pm$ 3,09	11,5-14,5
Reticulocitos % (n=15)	1,94 $\pm$ 0,96	1-2
HbA2 % (n=145)	2,85 $\pm$ 0,28	**
HbF % (n=145)	8,32 $\pm$ 3,65	**

\*: los valores normales varían en función del género y el grupo de edad.

\*\* : los valores normales varían en función de la técnica utilizada.

Al comparar estos datos con los datos hematimétricos de las  $\beta$ -talasemias, observamos que existen diferencias significativas en el ADE ( $p=0,001$ ), con una media de 20,83 $\pm$ 3,09 en las  $\delta\beta$ -talasemias frente a un 17,32 $\pm$ 2,66 en el caso de las  $\beta$ -talasemias.

Al igual que en el caso de las  $\beta$ -talasemias, la práctica totalidad de los pacientes diagnosticados (99%) no se realizaron en el contexto de estudios familiares (**gráfico 31**).

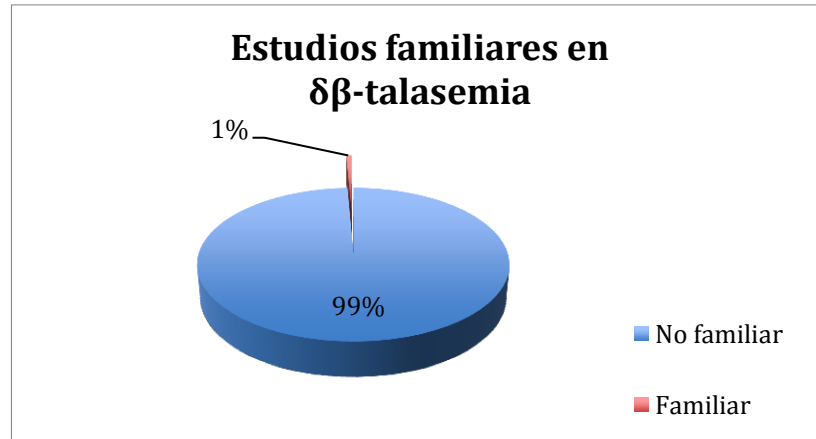


Gráfico 31. Proporción de pacientes diagnosticado de  $\delta\beta$ -talasemia a partir de un estudio familiar.

**4.3.2.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO.**

Al dividir por año de diagnóstico, existe un pico de aumento de diagnósticos de  $\delta\beta$ -talasemias en los años 2003 a 2005 (**gráfico 32**).

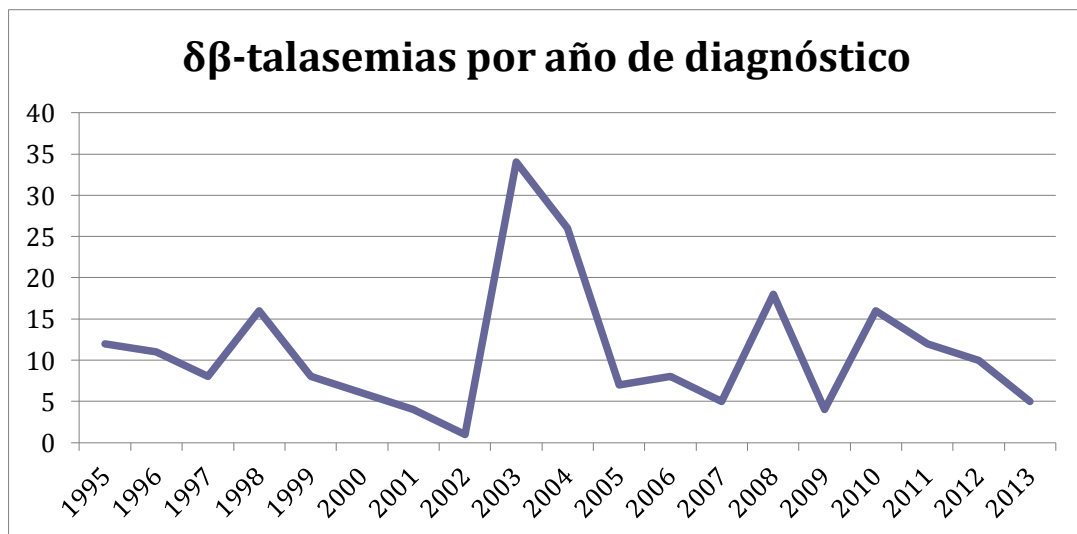
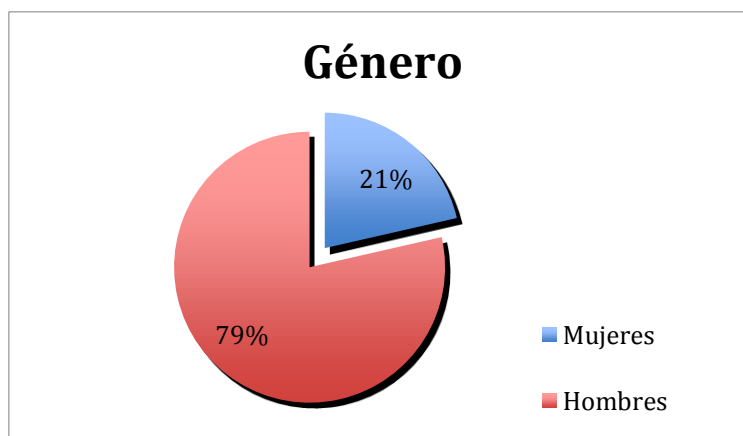


Gráfico 32. Número de pacientes diagnosticados de  $\delta\beta$ -talasemia por año en nuestro centro.

#### 4.4.- PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL (PHHF).

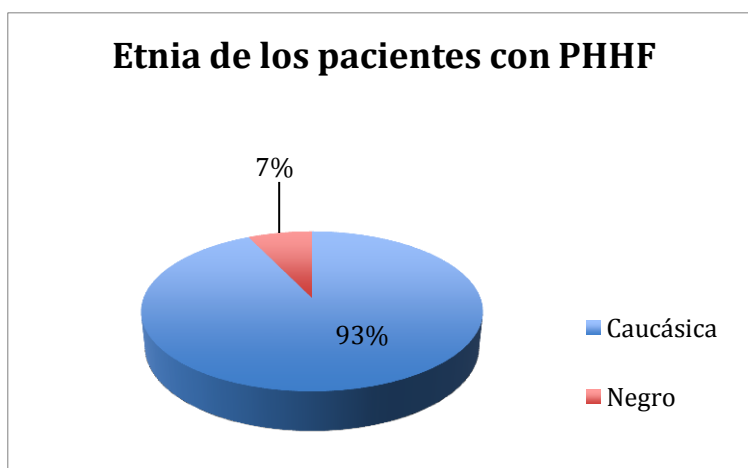
Se diagnosticaron un total de 20 PHHF: 6 en el periodo 1995-2002 y 14 en el periodo 2003-2013. La mediana de edad al diagnóstico fue de 24 años (1-68). En el grupo diagnóstico 2003-2013, sólo 3 pacientes (21%) eran mujeres (**gráfico 33**).



**Gráfico 33. Distribución por género de los pacientes diagnosticados de PHHF.**

Con respecto a las etnias, la gran mayoría (93%) era de origen caucásico. Tan sólo se identificó un paciente extranjero, de origen senegalés (**gráfico 34**).

Respecto al país de origen, el 93% de los pacientes eran españoles (**gráfico 35**).



**Gráfico 34. Distribución por etnias de los pacientes diagnosticados de PHHF.**

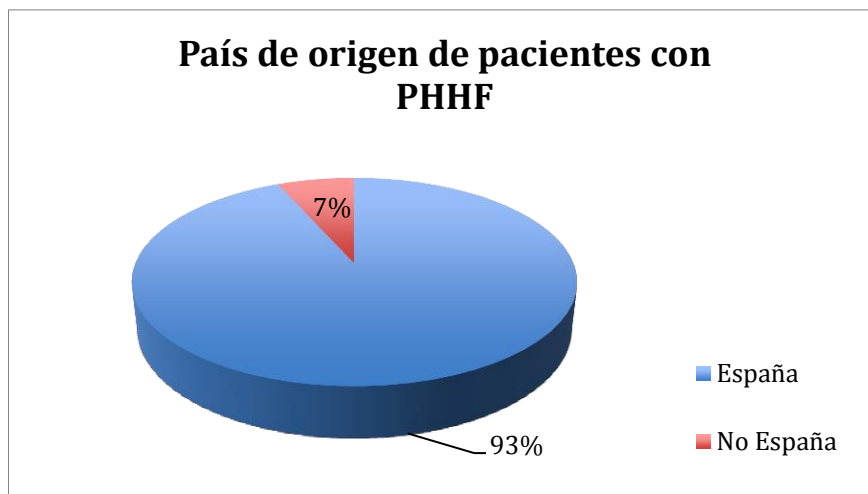


Gráfico 35. País de procedencia de pacientes diagnosticados de PHHF.

#### 4.4.1.- DATOS ANALÍTICOS GENERALES

En la **tabla 30** se exponen los datos analíticos de los pacientes diagnosticados de PHHF. Ninguno de los diagnósticos se realizó en el seno de un estudio familiar.

**Tabla 30. Parámetros analíticos de los pacientes con PHHF**

Parámetro	Media	Valores normales
Hematíes x10 <sup>6</sup> /ul (n=8)	3,60±0,70	*
Hb g/dl (n=8)	11,89±2,49	*
Hto % (n=8)	34,20±7,44	*
VCM fL (n=8)	95,31±9,49	80-100
HCM pg/célula (n=8)	33,26±4,65	*
CHCM g/dl (n=8)	34,89±1,61	*
ADE % (n=8)	15,21±3,97	11,5-14,5
Reticulocitos % (n=8)	5,27±5,17	1-2
Plaquetas x10 <sup>3</sup> /uL (n=8)	325,75±255,6	150-350
Leucocitos x10 <sup>3</sup> /uL (n=8)	7,77±4,77	*
Fe mcg/dl (n=8)	104,86±30,2	*
Ferritina ng/ml (n=8)	658,13±766,32	*
CT mg/dl (n=8)	232,71±48,54	*
HbA2 % (n=14)	2,70±0,31	**
HbF % (n=14)	5,93±2,42	**

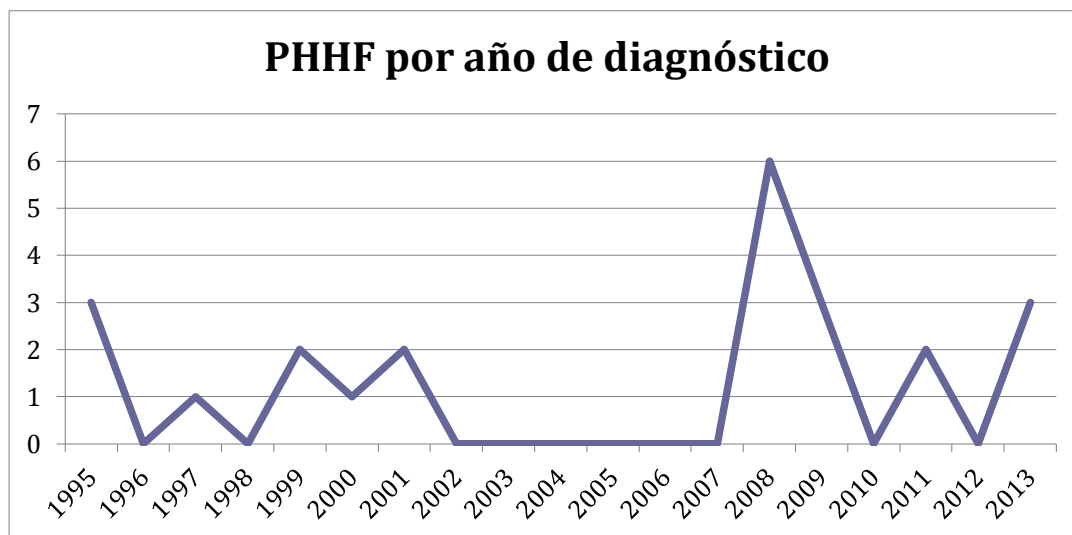
\*: los valores normales varían en función del género y el grupo de edad.

\*\* : los valores normales varían en función de la técnica utilizada.



#### 4.4.2.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO.

En el **gráfico 36** se muestran los diagnósticos realizados por año. Durante los años de implantación del SIL no se realizó ningún diagnóstico de PHHF.



**Gráfico 36. Número de pacientes diagnosticados de PHHF por año.**

#### 4.5.- ALTERACIONES MOLECULARES DE LAS CADENAS DE GLOBINA.

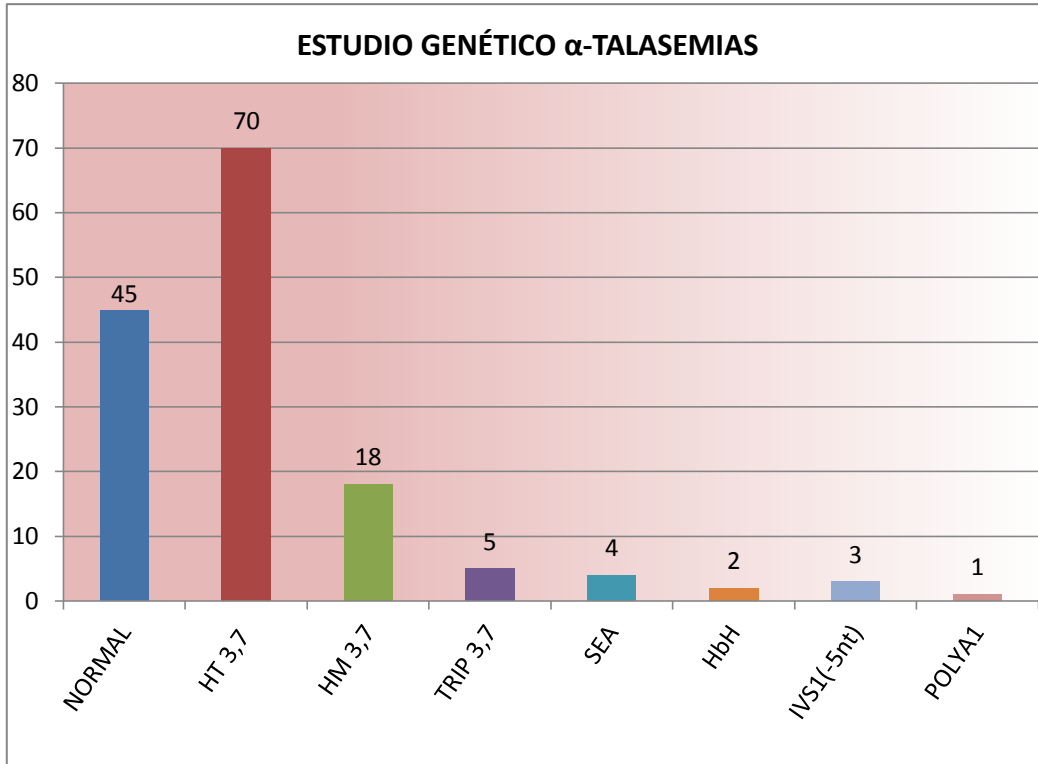
Los estudios moleculares por PCR se iniciaron en nuestro centro en el año 2007. Desde entonces y hasta el año 2013 se han realizado un total de 253 estudios: 148 de cadenas  $\alpha$ -globina y 105 de cadenas  $\beta$ -globina.

##### 4.5.1.- ALTERACIONES MOLECULARES DE LAS CADENAS $\alpha$ -GLOBINA

Se realizaron 148 estudios de las cadenas  $\alpha$ -globina en el periodo estudiado. En 45 estudios no se halló ningún tipo de mutación. En el resto se identificó alguna mutación, sola o asociada a otra anemia hemolítica hereditaria.

Se identificaron un total de 103 pacientes con alteraciones moleculares en los genes  $\alpha$ -globina. La mutación más frecuente encontrada fue la delección  $\alpha^{-3,7}$ , que representó el 85% del total de las mutaciones.

Las alteraciones identificadas se muestran en el **gráfico 37**.



**Gráfico 37. Alteraciones moleculares en pacientes con  $\alpha$ -talasemia.** HT 3,7: deleción  $\alpha$ 3,7 heterocigota. HM 3,7: deleción homocigota  $\alpha$ -3,7. TRIP 3,7:  $\alpha\alpha\alpha$  anti 3,7. IVS1(-5nt): deleción de pentanucleótido en el intrón 1. Las dos últimas (IVS1(-5nt) y POLYA1) son  $\alpha$ -talasemias no delecionales.

En el **gráfico 38** se puede observar que el 94% de las mutaciones son delecionales mientras que solo un 4% son no delecionales, siendo la más frecuente dentro de este subgrupo la IVS1 (-5nt).

La **tabla 31** muestra los diferentes genotipos hallados en número absoluto y porcentualmente.

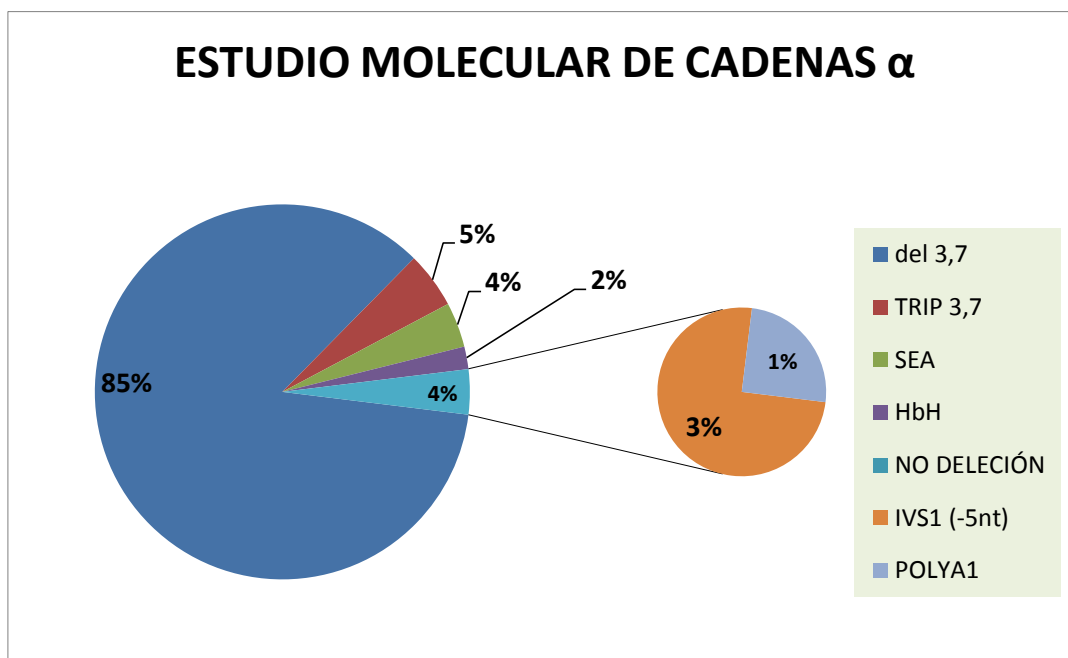


Gráfico 38. Alteraciones moleculares halladas en las cadenas  $\alpha$ -globina.

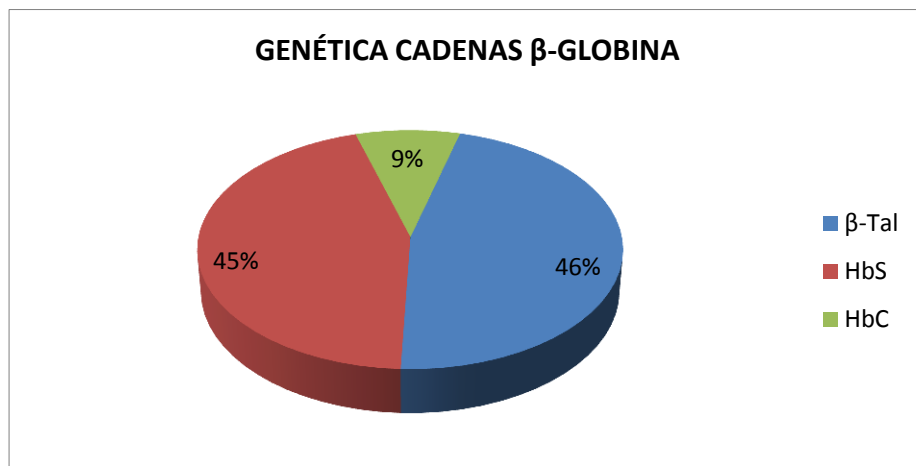
Tabla 31. Distribución de frecuencia de los genotipos estudiados en pacientes con alteraciones en el gen de cadenas  $\alpha$ -globina.

Mutaciones	Genotipos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
$\alpha$ -tal delección			
HT 3,7	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	70	67,96
HM 3,7	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	18	17,48
TRIP 3,7	$\alpha\alpha$ anti- $^{3,7}$	5	4,85
SEA	--SEA	4	3,88
HbH	--/ $-\alpha$	2	1,94
$\alpha$ -tal no delección			
IVS1 (-5nt)	$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$	3	2,91
	$\alpha^{\text{Nco}}\alpha/\alpha\alpha$	0	0
POLYA	PA1 (AATAAG)	1	0,97
	PA2 (AATGAA)	0	
Total		103	100

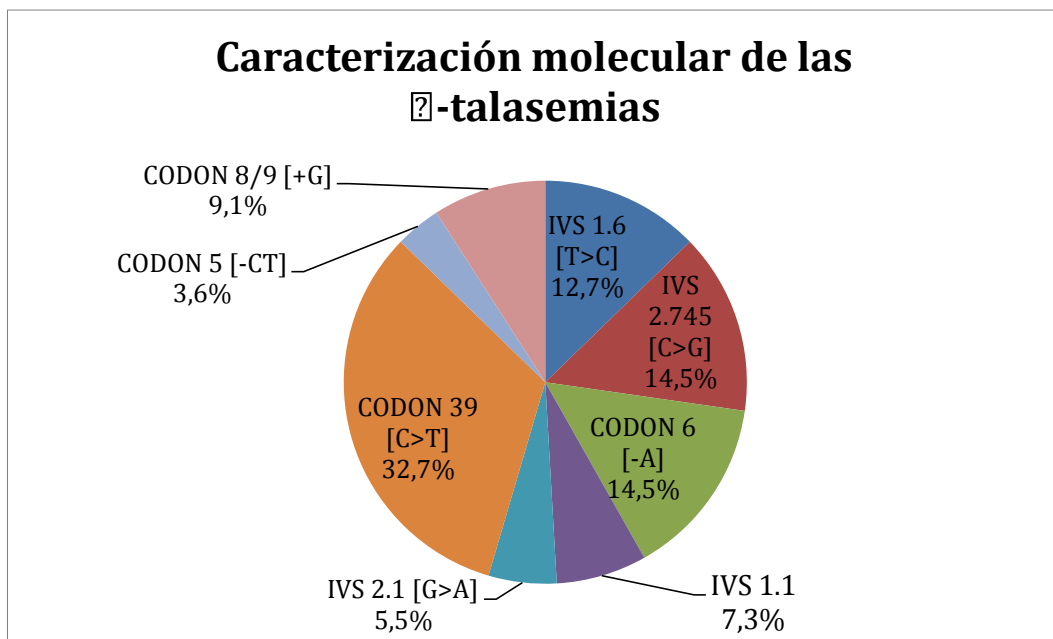
Encontramos 4 pacientes con grandes delecciones en el gen de la cadena  $\alpha$ -globina, específicamente la mutación –SEA. 3 de ellos eran de origen asiático y se realizaron como parte de un estudio familiar. Del cuarto paciente no pudo identificarse el país de procedencia ni la etnia.

**4.5.2.- ALTERACIONES MOLECULARES DE LAS CADENAS BETA-GLOBINA**

Se realizaron un total de 139 estudios moleculares hasta 2013 de las cadenas  $\beta$ -globina, de los cuales 114 presentaban una o más mutaciones. Como puede observarse en el **gráfico 39**, más de la mitad de los casos (53,5%) corresponden a hemoglobinopatías, sobre todo a HbS (44,7%). Un 46,5% de los estudios presentaron alguna mutación correspondiente a  $\beta$ -talasemia. Las mutaciones identificadas se exponen en el **gráfico 40**. En el caso de las  $\beta$ -talasemia mayor, se identificaron una mutación del CD39 [C>T] homocigoto, una mutación IVS 1.110 homocigota y una doble heterocigota IVS 1.6 asociada a CD39 [C>T].



**Gráfico 39.** Resultados de los estudios de las cadenas  $\beta$ -globina.



**Gráfico 40.** Perfil molecular de las  $\beta$ -talasemias en la Región de Murcia.

En la **tabla 32** se describe el genotipo identificado en los pacientes con  $\beta$ -talasemia estudiados a nivel molecular.

**Tabla 32. Perfil genotípico de los pacientes con  $\beta$ -talasemia en Murcia**

Genotipos $\beta$	Número de casos
$\beta^+/\beta$	13
$\beta^0/\beta$	31
$\beta/\text{Hb S o C}$	4
$\beta^+/\beta^+$	3
$\beta^0/\beta^0$	2

## 5.- HEMOGLOBINOPATÍAS.

Se diagnosticaron un total de 208 hemoglobinopatías estructurales: 20 en el periodo 1995-2002, y 186 en el segundo periodo (2003-2013). Del primer periodo sólo se obtuvo el diagnóstico general, por lo que no se dispone del tipo de hemoglobinopatía, estado mutacional, ni datos analíticos o demográficos.

La mediana de edad al diagnóstico de las hemoglobinopatías fue de 27 años (0-66). La hemoglobinopatía más frecuente diagnosticada fue la HbS (66,13%) seguida de la HbC (16,67%).

### 5.1.- DATOS DEMOGRÁFICOS.

La distribución global de hemoglobinopatías en el periodo 2003-2013 por género fue de 92 mujeres (49%) y 94 hombres (51%).

Del total de las HbS, 58 fueron mujeres y 65 hombres, mientras que en el caso de la HbC sólo hubo 10 hombres frente a 21 mujeres diagnosticadas. En el **gráfico 41** se expone la distribución por géneros en las diferentes hemoglobinopatías.

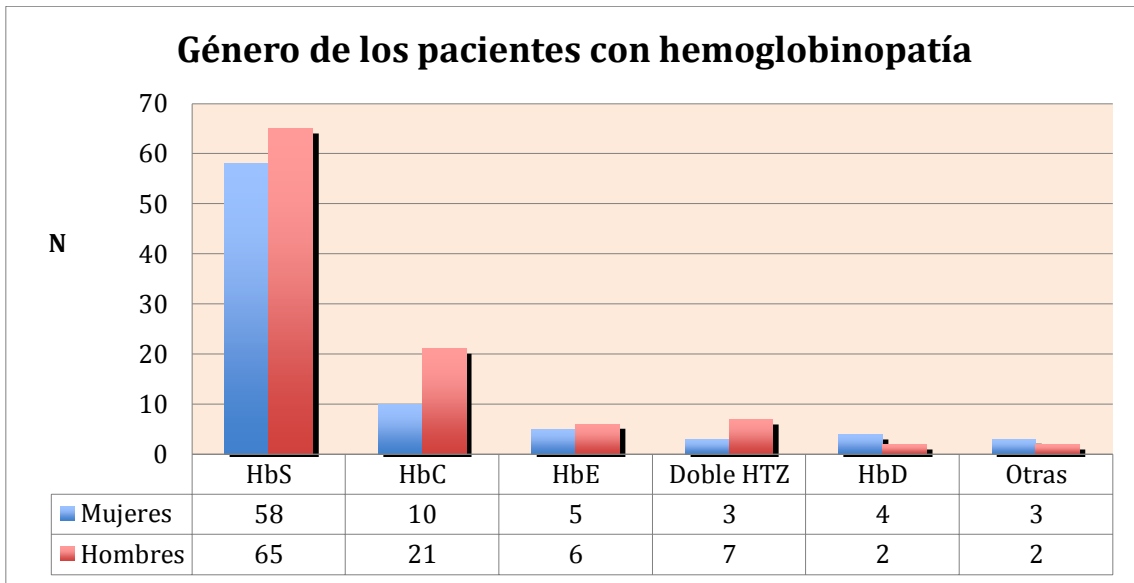


Gráfico 41. Distribución por género de las diversas hemoglobinopatías.

La mayoría de pacientes eran de raza no caucásica, predominando la raza negra sobre el resto. 83 pacientes diagnosticados eran de etnia negra, 44 magrebíes, 27 indígenas americanos y 20 de raza caucásica (gráfico 42).

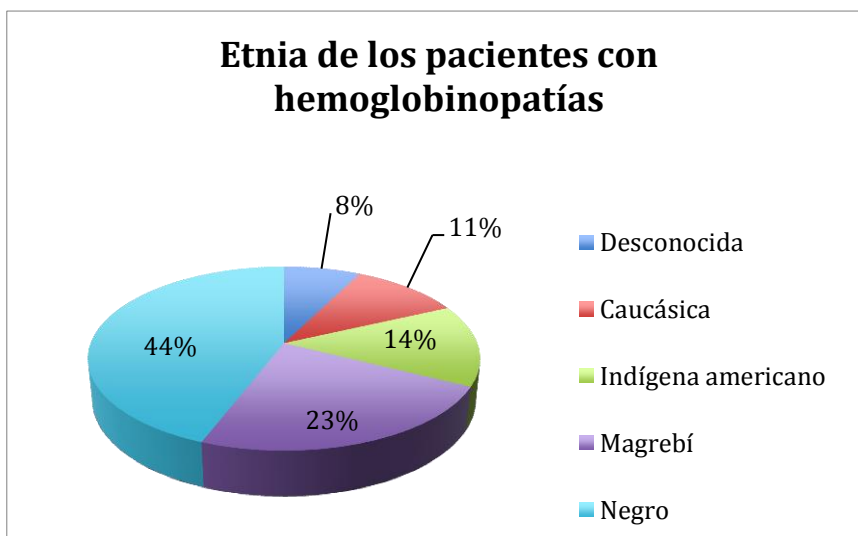
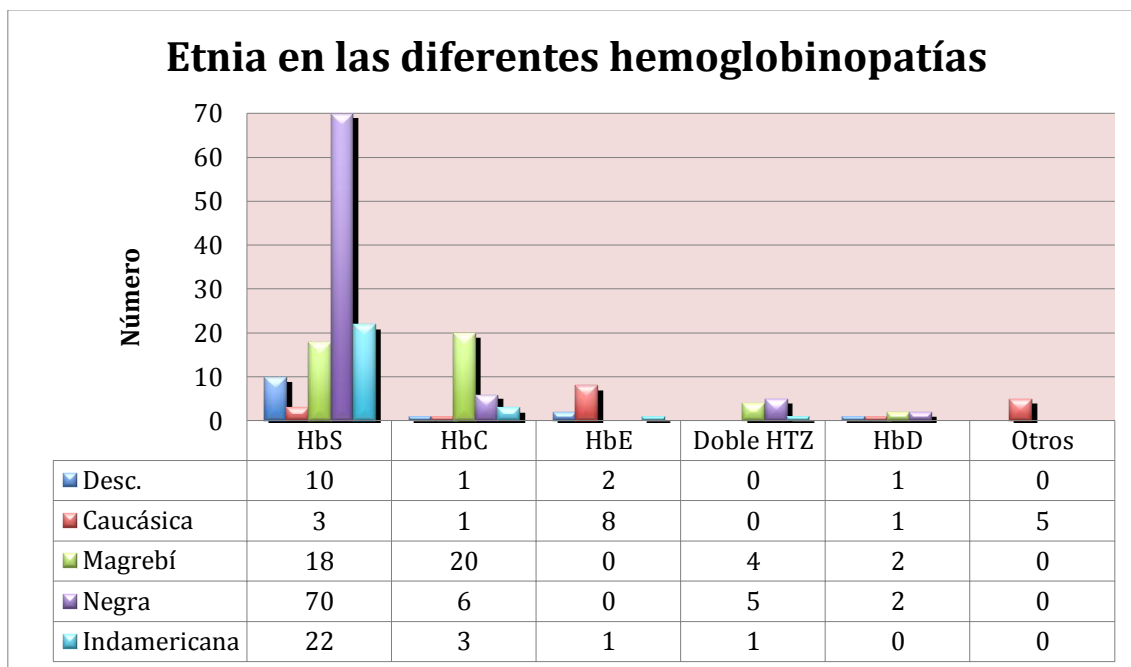


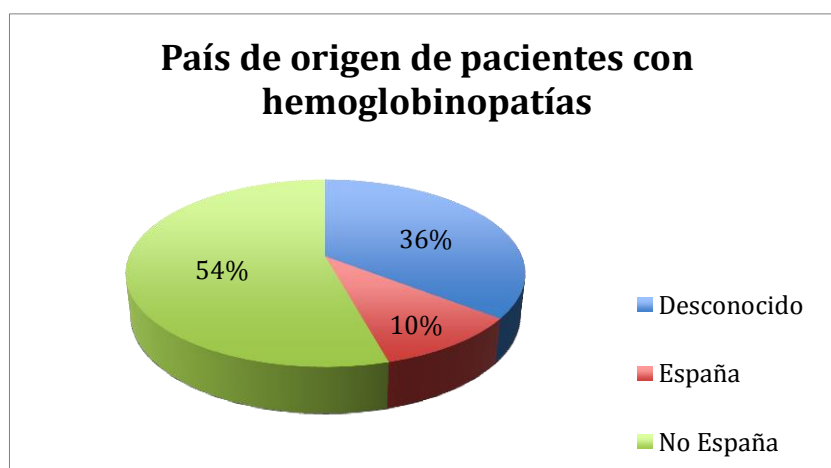
Gráfico 42. Distribución global por etnias de los pacientes diagnosticados de hemoglobinopatía.

Las etnias con mayor número de casos diagnosticados de HbS fueron la raza negra y la latinoamericana. En el caso de los pacientes de origen magrebí, existen más casos de HbC que de HbS. En el gráfico 43 se muestra la etnia en función del tipo de hemoglobinopatía.



**Gráfico 43. Etnia de los pacientes según las diferentes hemoglobinopatías. Debajo se indica el tipo de hemoglobinopatía junto con el número de pacientes. Doble HTZ: doble heterocigoto.**

En cuanto al país de origen, un total de 101 pacientes diagnosticados fueron extranjeros, 66 de país no conocido y tan sólo 19 eran nacidos en España (**gráfico 44**). Si comparamos con el grupo de talasemias, observamos que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en cuanto al país de origen.



**Gráfico 44. Origen de los pacientes diagnosticados de hemoglobinopatía.**

Desglosados por países, el país de donde procedían más pacientes fue Nigeria, seguido de Marruecos (**gráfico 45**). Al realizar el análisis del subgrupo de pacientes nacidos en España observamos que la hemoglobinopatía más frecuente es una hemoglobinopatía

talasémica, la HbE. La drepanocitosis en pacientes nacidos en España en nuestra Área de Salud es casi inexistente (1 caso)(gráfico 46).

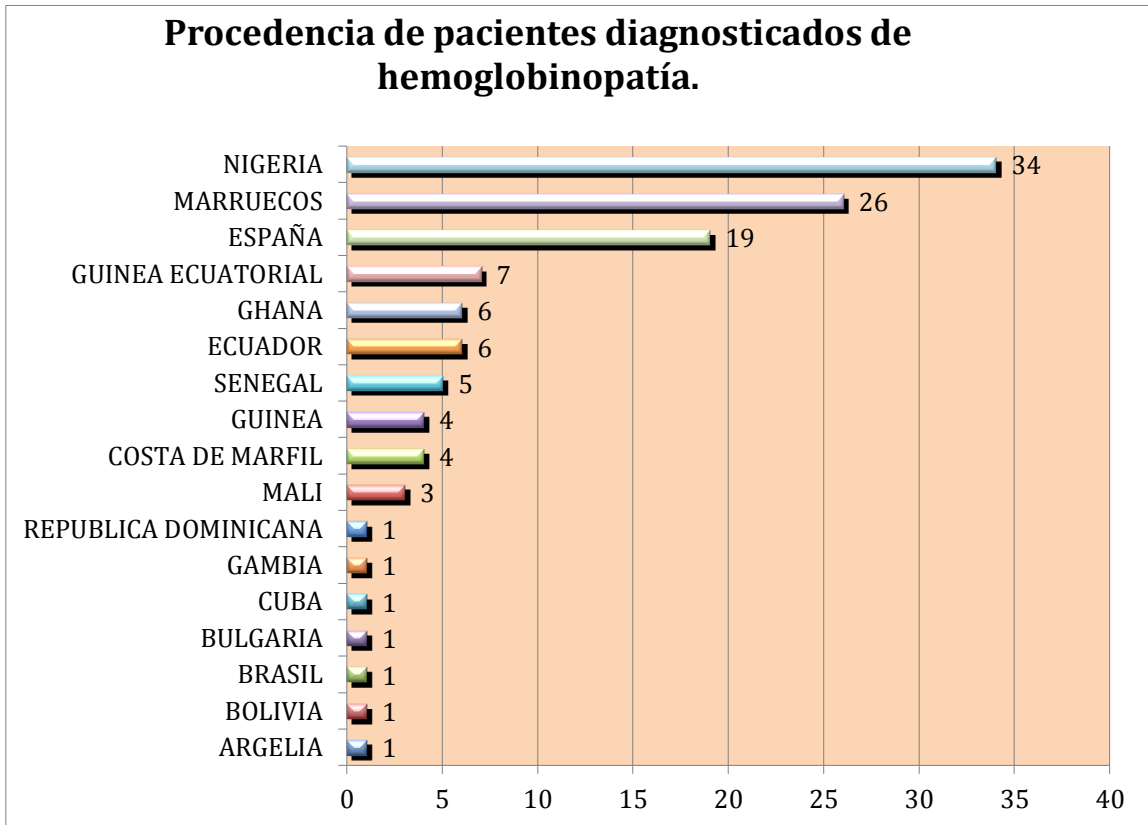


Gráfico 45. Países de procedencia de los pacientes diagnosticados de hemoglobinopatía.

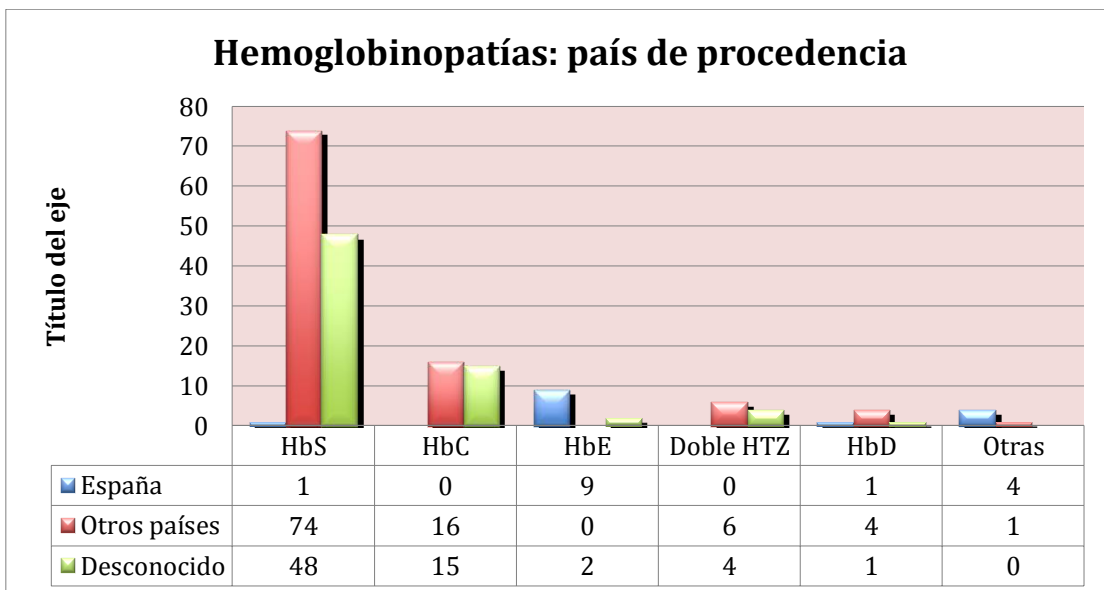
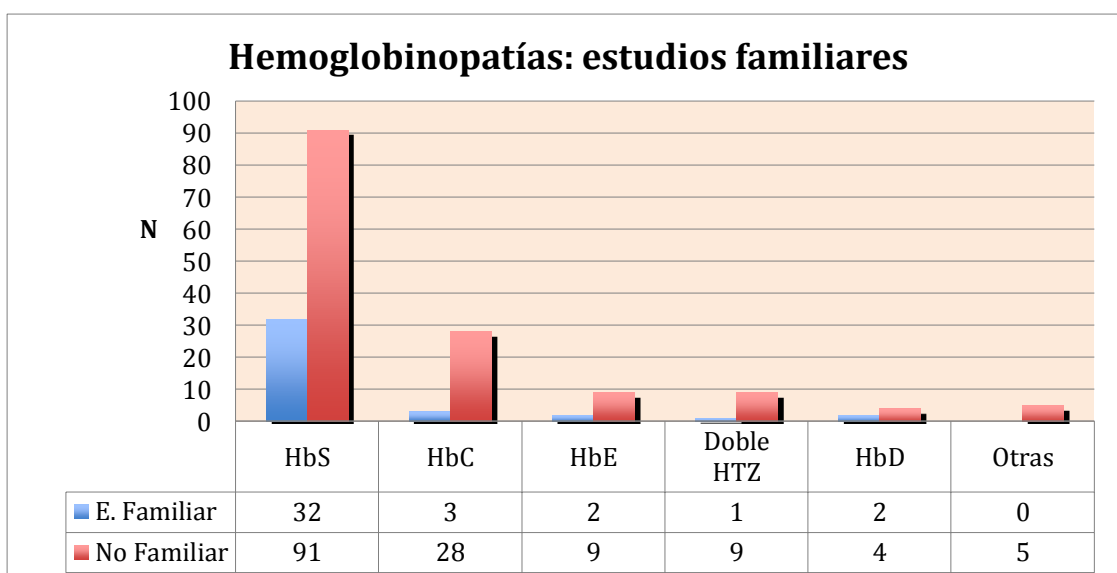


Gráfico 46. Tipo de hemoglobinopatía según el país de procedencia. La HbS (homo y heterocigota) es la más frecuente en los pacientes extranjeros.



**5.2.- MOTIVOS DE ESTUDIO.**

Un total de 40 estudios se realizaron como parte de estudios familiares, lo que supone el 21% de los pacientes diagnosticados. En el **gráfico 47** se muestra el número de estudios familiares y no familiares en cada una de las hemoglobinopatías. La mayor proporción de estudios familiares la encontramos en la HbD, que en proporción tiene un 33% de estudios familiares debido al escaso número de diagnósticos totales. El mayor número de estudios familiares en términos absolutos se halló en la HbS.



**Gráfico 47. Proporción de pacientes diagnosticado de hemoglobinopatía a partir de un estudio familiar.**

**5.3.- DISTRIBUCIÓN POR AÑO DE DIAGNÓSTICO.**

Al igual que en el caso de las talasemias, existe un incremento en el número de diagnósticos a partir de 2003 (**gráfico 48**).

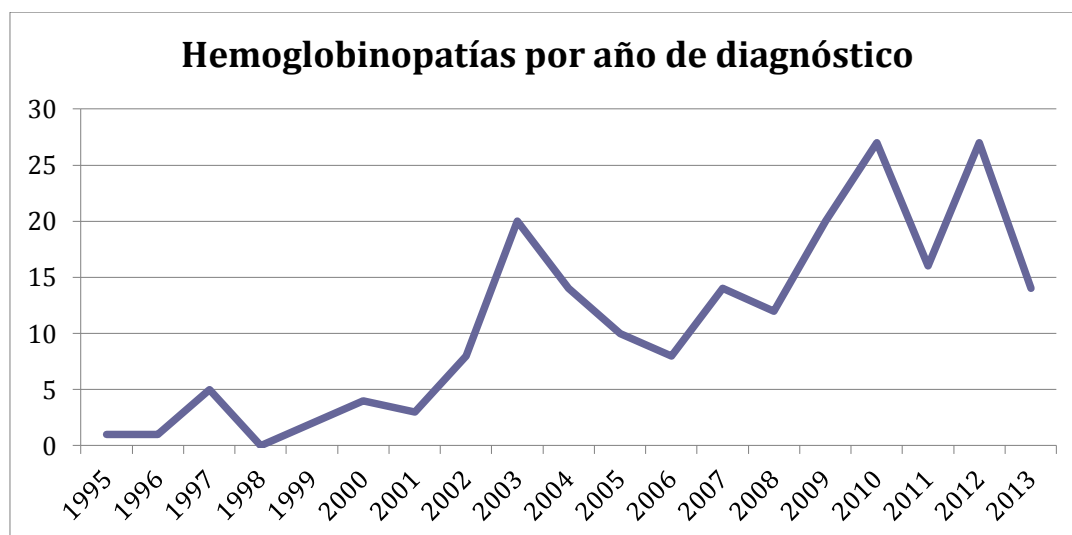


Gráfico 48. Distribución de las hemoglobinopatías por año de diagnóstico.

#### 5.4.- HEMOGLOBINOPATÍA S.

La Hemoglobinopatía S fue la hemoglobinopatía estructural más frecuentemente diagnosticada en nuestro centro. Se diagnosticaron un total de 123 pacientes, 106 heterocigotos (HbAS) y 17 homocigotos (HbSS) (gráfico 49).

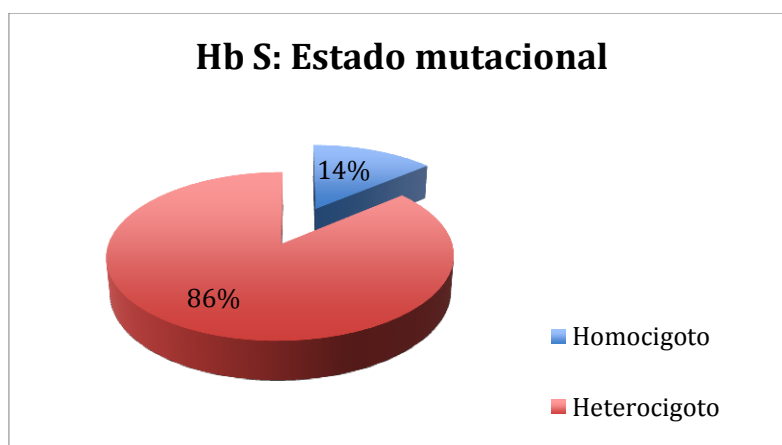
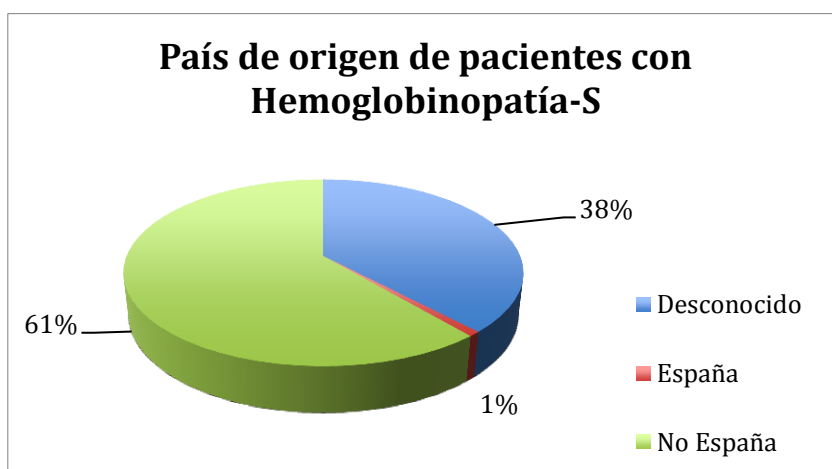


Gráfico 49. Proporción de pacientes homocigotos y heterocigotos en la Hemoglobinopatía S.

La mediana de edad de los pacientes con Hb S al diagnóstico fue de 27 años (0-57). Estratificando por edad la mediana de edad al diagnóstico de los pacientes con HbS homocigota fue de 2 años (rango 0-31), mientras que en el caso de los portadores heterocigotos la mediana de edad fue de 28,5 (rango 0-57).

En cuanto a la distribución por géneros, del total de las HbS, 58 fueron mujeres y 65 hombres. En un elevado porcentaje de pacientes (38%) se desconocía el país de origen (**gráfico 50**). Únicamente uno de los pacientes diagnosticados era de origen español, sin poder averiguar sus orígenes familiares por venir remitido de otro centro.



**Gráfico 50. Origen de los pacientes con Hemoglobinopatía S.**

De los pacientes de origen no español, los países de donde procedían más pacientes fueron Nigeria (29 pacientes), Marruecos (12) y Guinea Ecuatorial (6) (**gráfico 51**). La etnia mayoritaria fue la negra, seguida de la amerindia, mientras que la etnia caucásica tan sólo representó un 1% del total de los pacientes (**gráfico 52**).

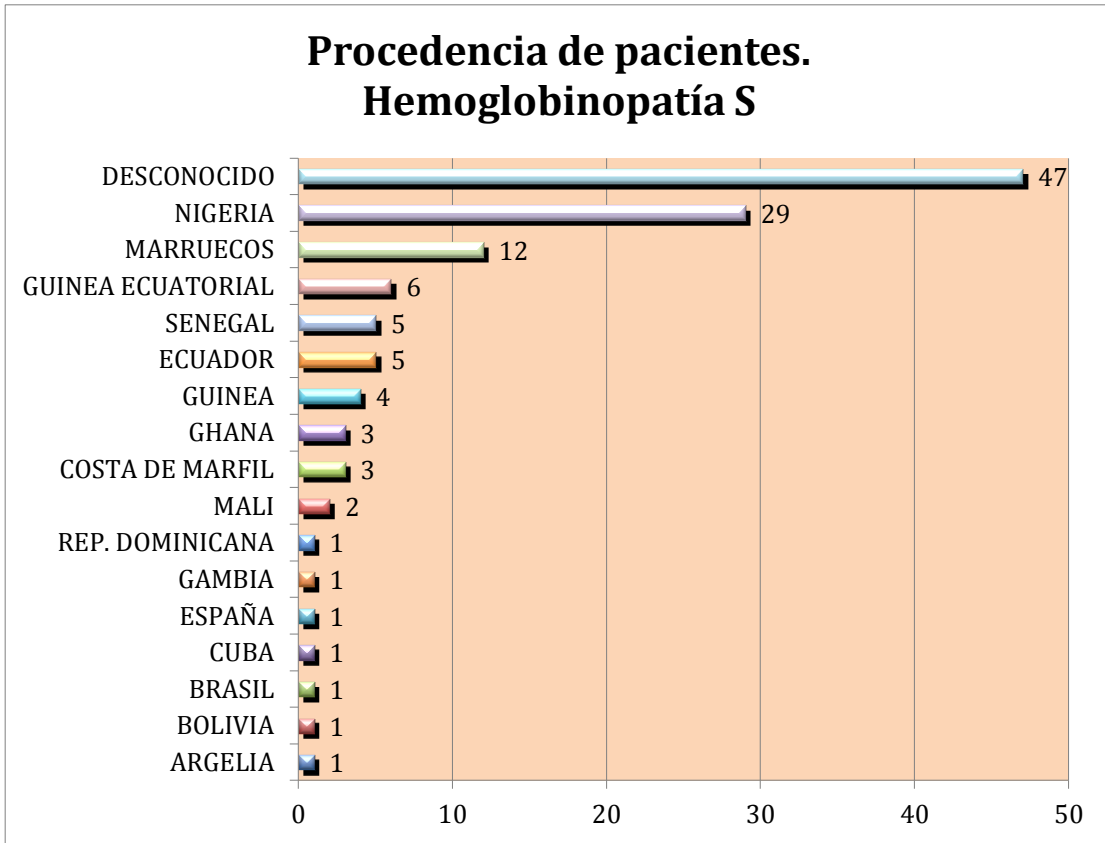


Gráfico 51. Países de procedencia de pacientes con HbS.

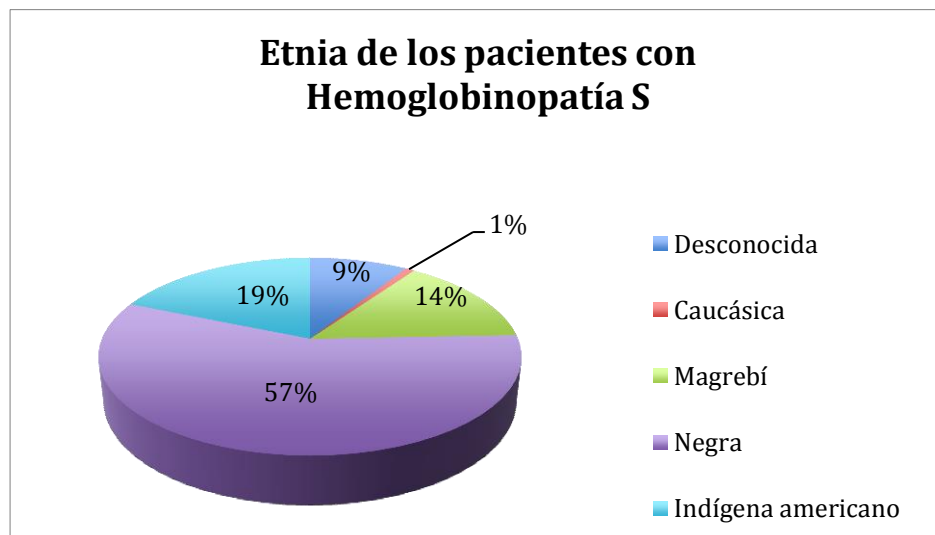
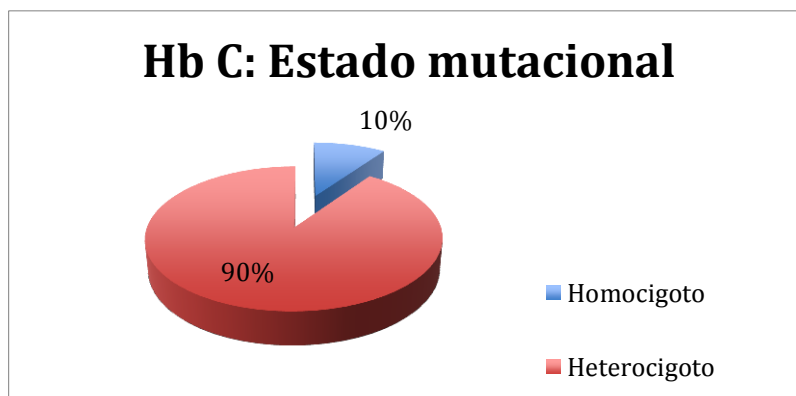


Gráfico 52. Etnia de pacientes con hemoglobinopatía S. Más de la mitad de pacientes era de etnia negra.

A la mayoría de pacientes con HbSS (58,82%) se les realizó estudio genético de las cadenas  $\beta$ -globina, y un 17,64% fueron diagnosticados a partir de un estudio familiar.

### **5.5.- HEMOGLOBINOPATÍA C.**

En el periodo 2003-2013, se diagnosticaron un total de 31 hemoglobinopatía C, de las cuales 28 fueron heterocigotos y 3 homocigotos (**gráfico 53**).



**Gráfico 53. Estado mutacional de los pacientes con hemoglobinopatía C.**

La mediana de edad al diagnóstico fue de 28,5 años (0-56). Dos pacientes homocigotos fueron diagnosticados a los 29 y 46 años; en el tercero no se dispone de este dato.

Como se ha expuesto anteriormente, ningún paciente con Hb C era procedente de España. En este caso, los orígenes geográficos más frecuentes fueron Marruecos, con un 32% de los casos, seguido de Ghana, de donde eran originarios un 6%

En cuanto a la etnia, también la mayoría de pacientes de los 31 diagnosticados eran de etnia magrebí (20 pacientes); 6 eran de etnia negra y 4 amerindia (**gráficos 54 y 55**).

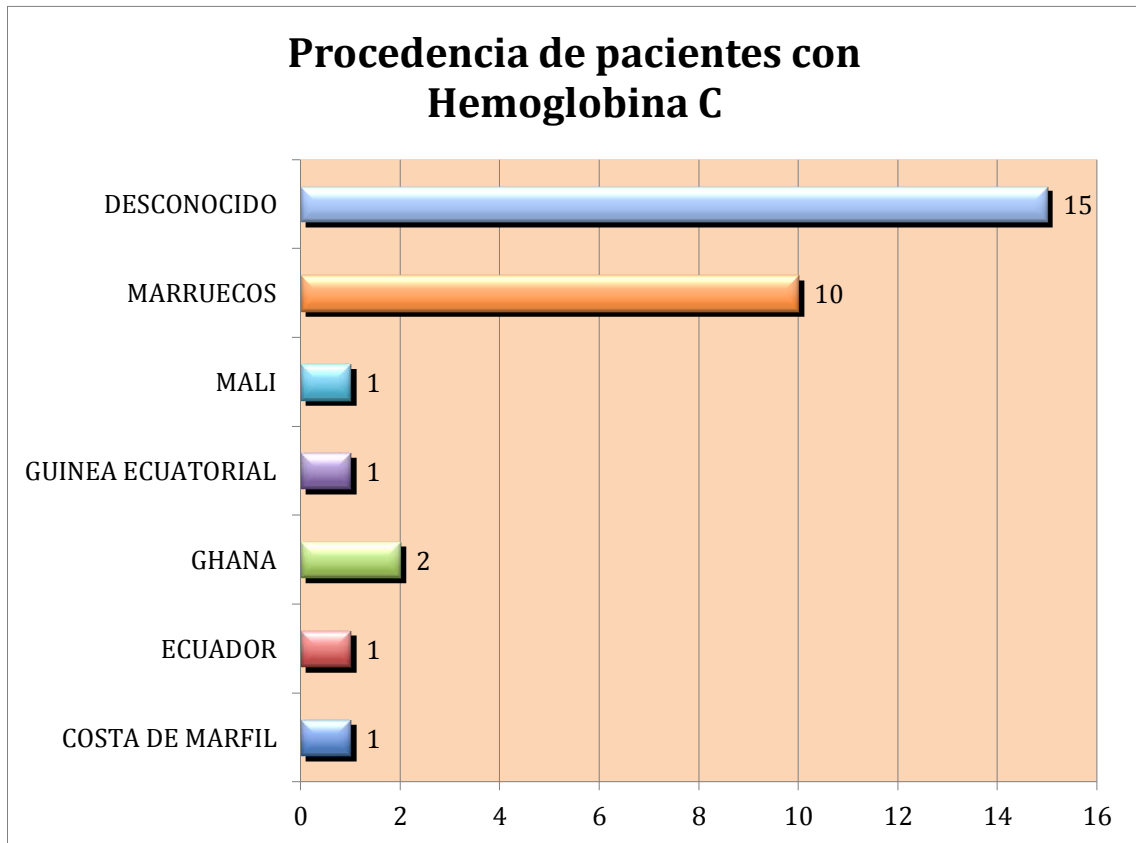


Gráfico 54. Procedencia de los pacientes con hemoglobinopatía C

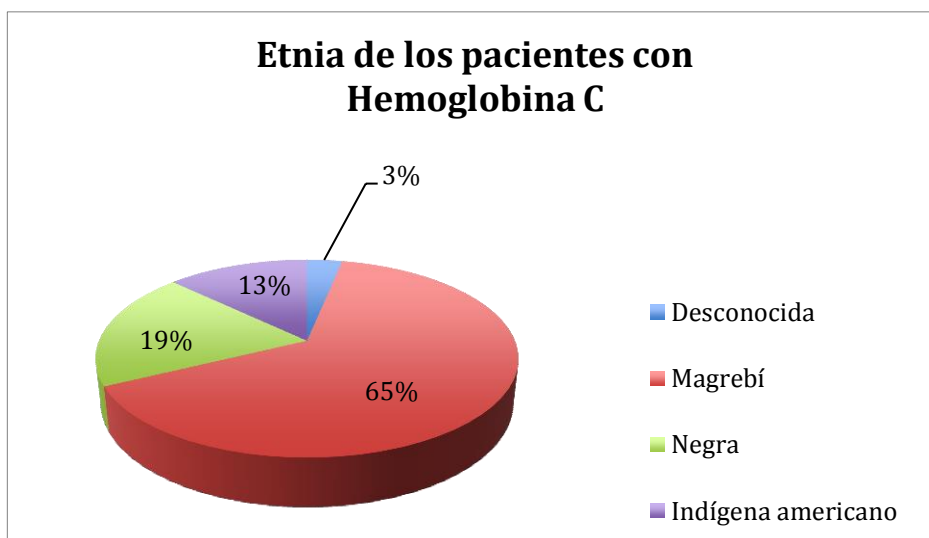


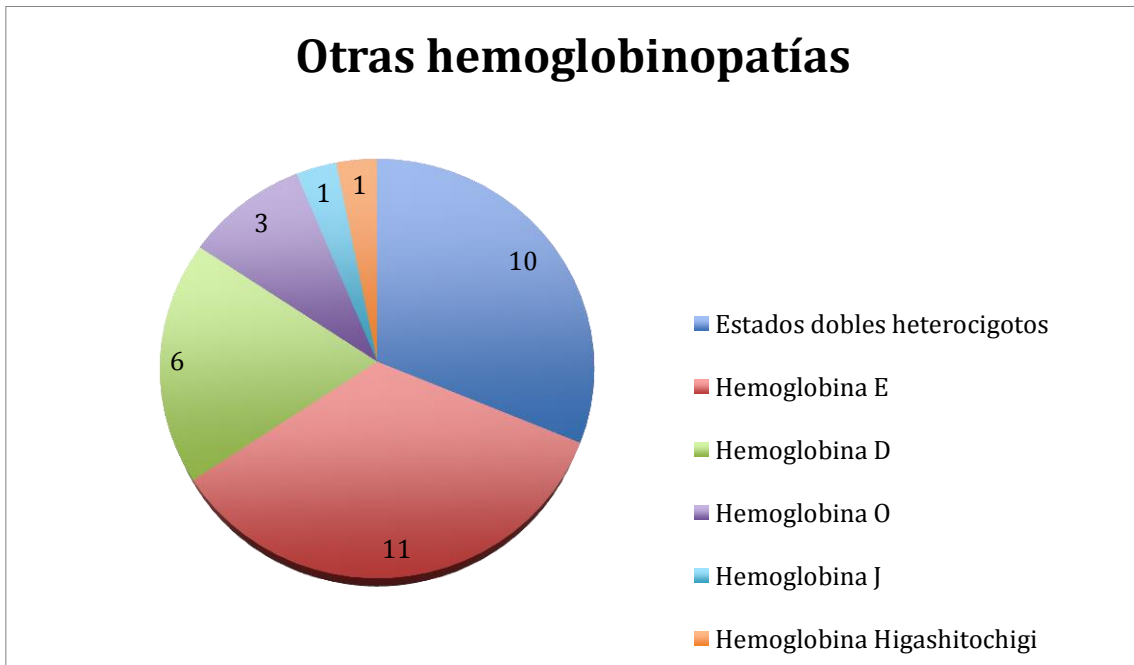
Gráfico 55. Etnia de pacientes con hemoglobinopatía C.

#### 5.6.- OTRAS HEMOGLOBINOPATÍAS MENOS FRECUENTES.

El resto de hemoglobinas diagnosticadas en el periodo 2003-2013 (**gráfico 56**) se exponen a continuación:

- Estados dobles heterocigotos: 10

- Hemoglobinopatía E: 11
- Hemoglobinopatía D: 6
- Hemoglobina O: 3
- Hemoglobina J: 1 caso
- Hemoglobina Higashitochigi: 1 caso



**Gráfico 56. Pacientes portadores de hemoglobinopatías menos frecuentes.**

Las medianas de edad al diagnóstico de estas hemoglobinopatías menos frecuentes se muestran en la **tabla 33**.

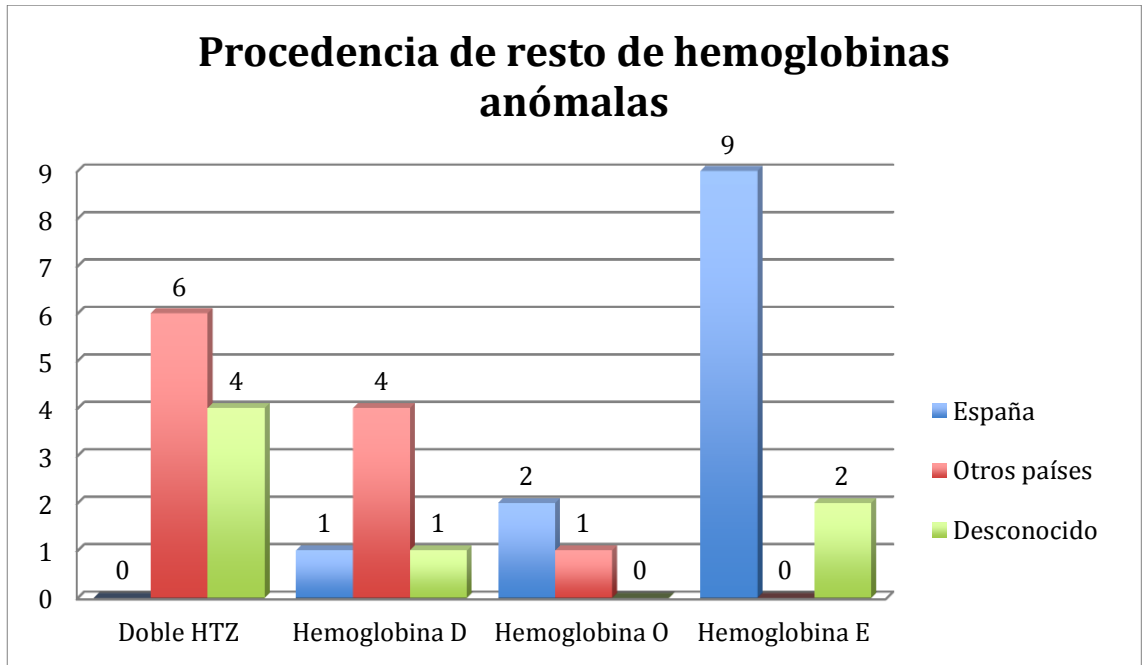
**Tabla 33. Medianas edad de hemoglobinopatías poco frecuentes.**

Patología	Mediana edad	Rango
Dobles HTZ	23	2-58
HbC	28,5	0-56
HbD	27	2-36
HbE	13,5	4-40
otras	34	17-66

En los **gráficos 57 y 58** se observan los países de procedencia y etnias del resto de hemoglobinas anómalas. En el caso de la Hb E, la mayoría (81,81%) fueron de origen español.

Todos los casos eran heterocigotos (HbAE) y sólo en uno de los sujetos se realizó el diagnóstico como parte de un estudio familiar.

En el caso de los dobles heterocigotos el 100% eran extranjeros, de etnia negra y árabe. Se identificaron diversas asociaciones: HbC asociada a  $\beta$ -talasemia (4 casos); HbC asociada a  $\alpha$ -talasemia (1 caso); HbC asociada a HbS (1 caso); HbS asociada a  $\alpha$ -talasemia (2 casos); HbS asociada a  $\beta$ -talasemia (2 casos).



**Gráfico 57. País de procedencia de las hemoglobinopatías menos frecuentes.**



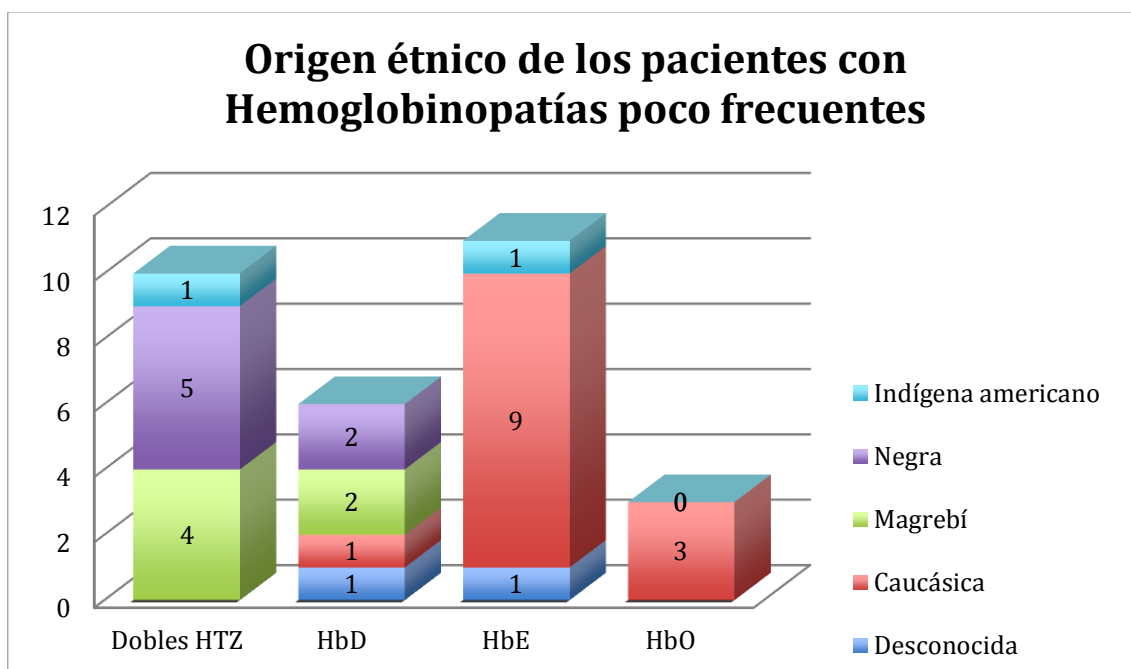


Gráfico 58. Etnia de los pacientes con hemoglobinopatías menos frecuentes.

En cuanto a la etnia, en el caso de dobles heterocigotos se trata de pacientes no caucásicos, mientras que en la HbE, la mayoría son caucásicos.

Se identificó un paciente con Hb J y otro con Hb Higashitochigi, este último diagnosticado mediante secuenciación del gen  $\beta$ . Ambos se trataban de pacientes de nacionalidad española y de etnia caucásica.

## 6.- ESTUDIOS DE INCIDENCIA.

A continuación pasamos a describir la distribución de las diferentes patologías por Áreas de Salud. En las **tablas 34 a 43** se muestran, junto con la población media por área de salud, la incidencia acumulada en 10 años, la incidencia por cada 100.000 habitantes y año, y la prevalencia.

En todas las patologías se observa un predominio de diagnósticos dentro del Área I, lo cual es más acentuado en el caso de las hemoglobinopatías (un 43% de las mismas proceden del área I) y sobre todo en las talasemias. De estas últimas, un 61% fueron diagnosticadas en el área I, dado que se realizó un cribado mediante la validación analítica de los hemogramas de rutina.

**Tabla 34. Incidencia de Esferocitosis hereditaria.**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	20	0,80	1/12500
II	282948	1	0,04	1/330000
III	170308	7	0,41	1/25000
IV	73410	2	0,27	1/37000
V	59985	3	0,50	1/20000
VI	252569	7	0,28	1/37000
VII	195869	5	0,26	1/40000
VIII	98659	4	0,41	1/25000
IX	54523	2	0,37	1/28000
Desconocido		6		
<b>TOTAL REGIÓN</b>	<b>1439187</b>	<b>57</b>	<b>0,40</b>	<b>1/25000</b>

**Tabla 35. Incidencia del déficit de G6PDH**

Área salud	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.000hab y año)	Prevalencia
I	250913	14	0,56	1/18000
II	282949	4	0,14	1/7000
III	170309	8	0,47	1/21000
IV	73411	1	0,14	1/100000
V	59986	0	0,00	0
VI	252569	4	0,16	1/62500
VII	195869	4	0,20	1/50000
VIII	98660	5	0,51	1/20000
IX	54523	2	0,37	1/28000
<b>TOTAL REGIÓN</b>	<b>1439187</b>	<b>43</b>	<b>0,30</b>	<b>1/33000</b>

**Tabla 36. Incidencia del déficit de PK**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	4	0,16	1/62500
II	282948	1	0,04	1/282000
III	170308	0	0,00	0
IV	73410	0	0,00	0
V	59985	0	0,00	0
VI	252569	0	0,00	0
VII	195869	0	0,00	0
VIII	98659	0	0,00	0
IX	54523	0	0,00	0
Total región	1439187	5	0,03	1/288000

**Tabla 37. Incidencia de  $\alpha$ -talasemia en la Región de Murcia**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	32	1,28	1/7800
II	282948	9	0,32	1/30000
III	170308	15	0,88	1/11300
IV	73410	2	0,27	1/36700
V	59985	3	0,50	1/20000
VI	252569	25	0,99	1/10100
VII	195869	6	0,31	1/32600
VIII	98659	10	1,01	1/9800
IX	54523	1	0,18	1/54500
Total región	1439187	103	0,72	1/14000

**Tabla 38. Incidencia de  $\beta$ -talasemia en la Región de Murcia**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	642	25,59	1/390
II	282948	13	0,46	1/21800
III	170308	16	0,94	1/10600
IV	73410	5	0,68	1/14600
V	59985	1	0,17	1/60000
VI	252569	169	6,69	1/1500
VII	195869	106	5,41	1/1800
VIII	98659	39	3,95	1/2500
IX	54523	5	0,92	1/10000
Desconocido		11		
<b>Total región</b>	<b>1439187</b>	<b>1007</b>	<b>0,72</b>	<b>1/1400</b>

**Tabla 39. Incidencia de  $\delta\beta$ -talasemia en la Región de Murcia**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	91	3,63	1/2750
II	282948	3	0,11	1/9400
III	170308	11	0,65	1/15000
IV	73410	0	0,00	0
V	59985	0	0,00	0
VI	252569	22	0,87	1/11500
VII	195869	10	0,51	1/19500
VIII	98659	6	0,61	1/16500
IX	54523	0	0,00	0
<b>Total región</b>	<b>1439187</b>	<b>143</b>	<b>0,99</b>	<b>1/10000</b>

**Tabla 40. Incidencia de hemoglobinopatías en total en la Región de Murcia**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	78	3,11	1/3200
II	282948	8	0,28	1/35000
III	170308	6	0,35	1/28300
IV	73410	16	2,18	1/4500
V	59985	12	2,00	1/5000
VI	252569	16	0,63	1/15000
VII	195869	15	0,77	1/13000
VIII	98659	11	1,11	1/9000
IX	54523	1	0,18	1/54500
Desconocido		17		
<b>Total región</b>	<b>1439187</b>	<b>180</b>	<b>1,25</b>	<b>1/8000</b>

**Tabla 41. Incidencia de Hemoglobina S heterocigota en la Región de Murcia.**

Área Salud	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	43	1,71	1/5800
II	282949	4	0,14	1/70000
III	170309	5	0,29	1/34000
IV	73411	8	1,01	1/9000
V	59986	11	1,83	1/5500
VI	252569	11	0,44	1/23000
II	195869	8	0,4	1/25000
VIII	98660	3	0,3	1/32000
IX	54523	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1439187</b>	<b>93</b>	<b>0,67</b>	<b>1/15500</b>

**Tabla 42. Incidencia de Hemoglobina SS en la Región de Murcia.**

Área Salud	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	9	0,41	1/28000
II	282949	0	0	0
III	170309	0	0	0
IV	73411	3	0,10	1/25000
V	59986	0	0	0
VI	252569	0	0	0
II	195869	2	0,10	1/98000
VIII	98660	1	0,10	1/98000
IX	54523	1	0,18	1/54500
Total	1439187	16	0,11	1/90000

**Tabla 43. Incidencia de Hemoglobina C heterocigota en la Región de Murcia.**

Área Salud	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia
I	250913	13	0,52	1/19000
II	282949	1	0,04	1/282000
III	170309	1	0,06	1/170000
IV	73411	1	0,14	1/73000
V	59986	1	0,17	1/60000
VI	252569	3	0,12	1/84000
II	195869	4	0,20	1/49000
VIII	98660	5	0,51	1/20000
IX	54523	0	0,00	1/54500
Total	1439187	29	0,20	1/50000

## DISCUSIÓN





## 1.- OBJETIVO PRINCIPAL: ANÁLISIS DEL PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ANEMIA HEMOLÍTICA HEREDITARIA EN LA REGIÓN DE MURCIA.

Nuestro objetivo principal consistía en conocer el perfil epidemiológico y biológico de los pacientes con anemia hemolítica hereditaria de la Región.

Los resultados muestran que existe mayor número de pacientes diagnosticados en el segundo periodo estudiado, es decir, a partir de la implantación del SIL. En cuanto a la distribución, se observa que la proporción de talasemias con respecto al resto de patologías no varió en el tiempo; sin embargo, sí existió un incremento proporcional de diagnósticos de hemoglobinopatías, mientras que en las esferocitosis y en el déficit de G6PDH hubo un descenso proporcional, debido al importante aumento en el número de talasemias diagnosticadas. De estos datos se puede extraer la conclusión de que la implantación del SIL ha favorecido la detección de pacientes con talasemia, no siendo así en el resto de patologías.

En la distribución global por patologías, la más frecuentemente diagnosticada fue la  $\beta$ -talasemia; en el grupo de los pacientes extranjeros sin embargo, la entidad más frecuente fueron las hemoglobinopatías, como se ilustra en la **tabla 44**.

**Tabla 44. Anemias hereditarias en pacientes extranjeros.**

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje
DÉFICIT G6PDH	7	3,6
$\alpha$ -TAL	8	4,1
BETA TAL	68	35,1
DELTABETA	4	2,1
DOBLE HTZ	10	5,2
HEMOGLOBINOPATIA	90	46,4
ESFEROCITOSIS	3	1,5
PHHF	1	0,5
TRIPLICACIÓN $\alpha$	3	1,5
Total	194	100

En cuanto a los datos demográficos generales, la distribución por género fue balanceada. En el motivo de estudio, del total de los pacientes estudiados se identificaron menos de un 5% de estudios familiares. Este dato se obtuvo de los informes de estudios de anemia, en los que en muchas ocasiones, el campo aparecía vacío o no informado. En la revisión de los datos, se constató que existían numerosos pacientes que fueron estudiados de manera consecutiva y con apellidos iguales, lo cual nos induce a pensar que probablemente fuesen estudios familiares no registrados como tal. Por lo tanto, es posible que haya habido un sesgo en la recepción de datos de los estudios de anemia.

La etnia predominante aparte de la caucásica fue la magrebí, seguida de la negra. Si atendemos a los movimientos migratorios en nuestra Región por países de procedencia agrupados (**tabla 45**) también existe mayor flujo migratorio desde África que desde Centro y Sudamérica, que sería la siguiente en frecuencia en cuanto a etnias. La etnia asiática es la menos representada, correspondiéndose con la procedencia menos frecuente de las reflejadas en nuestro estudio.

**Tabla 45. Flujo de inmigración procedente los del extranjero (países con etnias árabe, negra, latinoamericana y asiática) a la Región de Murcia.**

PAÍS/AÑO	2008	2009	2010	2011	2012	2013
África	7097	4680	2719	2647	2144	2072
Asia	635	402	362	395	322	301
Centro América y Caribe	557	391	458	403	456	502
España	516	461	446	566	506	605
Resto de la Unión Europea	4119	3134	3035	2863	2348	2150
Sudamérica	5380	2310	1330	1429	1114	1100
<b>TOTAL</b>	<b>19098</b>	<b>12029</b>	<b>8912</b>	<b>8941</b>	<b>7405</b>	<b>7162</b>
TIPO DE AHH/AÑO	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Número de hemoglobinopatías	14	19	24	16	27	14
Número de talasemias	133	106	151	146	106	83
Enzimopatías	6	6	9	8	7	6
Membranopatías	3	6	6	10	5	7
<b>TOTAL</b>	<b>156</b>	<b>47</b>	<b>190</b>	<b>180</b>	<b>145</b>	<b>110</b>

### 1.1.- ERITROENZIMOPATÍAS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO.

#### 1.1.1.- DÉFICIT DE PIRUVATOKINASA ERITROCITARIA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO.

En nuestro estudio, el déficit de PK fue la anemia hemolítica hereditaria con menor número de diagnósticos, tan solo 5 en los 18 años. En algunas publicaciones se describe una prevalencia de 51 casos por millón de habitantes [105], aunque Grace et al [106] estiman que los casos publicados pueden ser inferiores a los reales. Este infradiagnóstico sería debido a varios factores. Por una parte a las muertes intraútero que se producen en los casos de extrema gravedad, por otro lado el ser una patología genéticamente compleja y que a veces precisa de técnicas muy específicas moleculares de diagnóstico y a que en muchas ocasiones los pacientes con formas leves de la enfermedad no son estudiados, como probablemente haya ocurrido en nuestro centro.

La mediana de edad fue de 43 años, lo cual concuerda con el hecho de que la hemólisis neonatal en estos pacientes es infrecuente; por el contrario lo normal es que se presente en las primeras décadas de la vida o en la edad adulta [105,107]. Esto mismo también encaja con los datos analíticos observados, es decir, el cursar con una anemia leve-moderada que en ocasiones no permite realizar un diagnóstico adecuado [106]. La distribución por género no presentó diferencias significativas entre hombre y mujeres, ya que su herencia no está ligada al sexo.

Todos los pacientes diagnosticados en nuestro centro eran españoles y de etnia caucásica, aunque según lo publicado, no parece haber predominio de esta patología en la raza blanca, al contrario, es más prevalente entre la población de descendencia africana (el 1% de la población blanca americana, mientras que en los americanos descendientes de africanos llegaría hasta un 2,4%). No obstante, sí se ha descrito en las áreas endémicas de paludismo como es el área mediterránea[108].

Atendiendo a los valores analíticos, no se observó anemia severa ni formas microcíticas (son anemias normocíticas) y el nivel de reticulocitos fue elevado en todos los casos; estos datos se muestran en la **tabla 19**. Por otra parte, la actividad enzimática fue muy baja lo que en nuestros casos permitió el diagnóstico. Todo esto es concordante con los datos reportados por Zanella et al[109], que mostraron que el nivel de actividad enzimática no se correlaciona con el grado de anemia o de hemólisis.

En cuanto al año de diagnóstico, llama la atención que antes del año 2008 no se hubiera diagnosticado ningún déficit de PK. Hay que destacar que las muestras con reticulocitos elevados pueden obtener resultados falsos negativos debido a que la actividad PK aumenta con la juventud eritrocitaria [107]. Nos planteamos por tanto que estemos infradiagnosticando esta entidad, o bien que este tipo de pacientes no fuesen derivados al hematólogo en periodos previos, con menos recursos tanto económicos como humanos.

En nuestra Área de Salud se ha identificado 1 caso por cada 62.700 habitantes. En España se estima que 1 de cada 20.000 habitantes (0,005%) serían portadores del déficit de PK [72]. En toda la region se evidencia una incidencia 0,03 casos/100.000 habitantes y año. Atendiendo a esta frecuencia, en nuestro medio se observa una prevalencia inferior, aunque no alcanza una diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos concluir que el

déficit de PK tiene una prevalencia en nuestra Región dentro de lo esperable para nuestro medio (tabla 46).

**Tabla 46. Incidencia del déficit de PK en nuestro medio y comparación con literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

ÁREAS	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	4	0,16	1/62500	0,318
II	282948	1	0,04	1/282000	0,1277
III	170308	0	0,00	0	0,1051
IV	73410	0	0,00	0	0,2141
V	59985	0	0,00	0	0,25
VI	252569	0	0,00	0	0,0734
VII	195869	0	0,00	0	0,0926
VIII	98659	0	0,00	0	0,1686
IX	54523	0	0,00	0	0,2684
TOTAL REGIÓN	1439187	5	0,03	1/288000	0,0795

### 1.1.2.- DÉFICIT DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO.

La mediana de edad fue de 22 años. Presentó mayor proporción de hombres que de mujeres sin llegar a la significación estadística ( $p=0,050$  en el límite de significación), lo cual es esperable ya que se trata de una patología ligada al cromosoma X y afecta preferentemente a varones hemiciotos [103].

Las etnias predominantes fueron la caucásica seguida de la magrebí, con un 30% del total de los pacientes diagnosticados. Menos frecuente fue la etnia asiática y amerindia, y no se identificó en ningún paciente de raza negra. Esto último no concuerda con la literatura consultada a este respecto, que describe esta patología especialmente frecuente en la raza negra [14]. De hecho, en los estudios de cribado neonatal de Mañú-Pereira et al [35] en Cataluña en el que se realiza el cribado sólo sobre población de riesgo (recién nacidos con uno o ambos progenitores nacidos en África, Asia o América Central o Sudamérica), la mayoría de pacientes diagnosticados (un total de 14) procedían de África subsahariana, siendo menor el número de pacientes procedentes del norte de África, tan sólo 2 pacientes, al contrario de los resultados obtenidos en nuestro centro.

A este respecto, hay que destacar que el presente estudio se ha realizado de manera retrospectiva, a diferencia de los trabajos consultados [35,106] y en un contexto de estudios de anemias hemolíticas general en el que la mayoría de pacientes vienen remitidos con escasa información clínica, por lo que es muy posible que en nuestro caso esta patología esté infradiagnosticada, más aún en pacientes de raza negra en los que se sospecha principalmente una hemoglobinopatía como primera causa de crisis hemolítica.

Los países de los que procedían los pacientes de nuestro centro fueron Marruecos y China, aunque en más del 20% de los pacientes no se pudo identificar el país de procedencia. Los datos analíticos más relevantes consistieron en una anemia normocítica con un elevado porcentaje de reticulocitos, lo cual nos indica que en nuestros pacientes el diagnóstico se realizó en el contexto de un episodio hemolítico, lo que vuelve a poner de relieve que probablemente estemos infradiagnosticando esta patología que, fuera de las crisis hemolíticas es asintomática como bien describe Vives-Corróns [14]. Por otra parte, también Vives-Corróns apunta que el estudio de los pacientes en el momento de las crisis hemolíticas puede obtener resultados falsamente normales debido a la mayor cantidad de enzima presente en los reticulocitos [103]; por este motivo, también es posible que hayamos tenido resultados falsos negativos; para evitar este sesgo, cuando hay alta sospecha clínica se repite la determinación enzimática una vez pasado el episodio hemolítico. Un 21% de los estudios fueron realizados en el marco de un estudio familiar.

En el presente estudio, se diagnosticaron una media de 4,36 casos por año. Curiosamente, en los años 2004 y 2005 no se reportó ningún caso de enzimopatía en nuestra Región, hecho para el cual no hemos encontrado explicación. La incidencia estimada con nuestros datos en el área I es de 0,56 casos por cada 100.000 habitantes y año. Si valoramos todas las áreas, resulta una incidencia acumulada de 0,30/100000 hab/año. Los diferentes estudios de prevalencia de déficit de G6PD en España ofrecen una prevalencia entre el 0,32 y el 1,10% en las diferentes zonas de España y del 0,48% en la Región de Murcia [113].

Por otra parte, en poblaciones de alto riesgo arrojan unas tasas de prevalencia en torno a 1/400 individuos [35,106]. Al comparar esta prevalencia con la obtenida en nuestro medio, en este caso sí que observamos diferencias significativas (tabla 46) en todas las Áreas de Salud (**tabla 47**).

**Tabla 47. Incidencia del déficit de G6PDH en nuestro medio y comparación con literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

ÁREA	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.000hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	14	0,56	1/18000	0,0237
II	282949	4	0,14	1/7000	0,0071
III	170309	8	0,47	1/21000	0,0209
IV	73411	1	0,14	1/100000	0,0108
V	59986	0	0,00	0	0,0066
VI	252569	4	0,16	1/62500	0,0079
VII	195869	4	0,20	1/50000	0,0102
VIII	98660	5	0,51	1/20000	0,024
IX	54523	2	0,37	1/28000	0,0217
TOTAL REGIÓN	1439187	43	0,30	1/33000	0,0122

Podemos concluir que la prevalencia es estadísticamente inferior a la esperada en relación a otras regiones de nuestro entorno. Este hecho se puede deber a que la prevalencia se realmente inferior o bien, es más probable, de acuerdo a lo comunicado en otros casos [35, 103], que sea una patología infradiagnosticada en nuestro medio, unido al carácter retrospectivo de nuestro estudio. Este hecho se puede deber a que sólo diagnosticamos los casos que nos remiten y que han desarrollado un cuadro de anemia hemolítica mientras que los casos que no desarrollan hemólisis o ésta es leve no se diagnostican.

## **1.2.- MEMBRANOPATÍAS.**

### **1.2.1.- ESFEROCITOSIS HEREDITARIA.**

En este grupo de patologías, la única detectada en nuestro centro fue la esferocitosis hereditaria. La distribución por géneros fue balanceada.

Según la bibliografía consultada [6,14] esta entidad es muy frecuente en la raza blanca. En nuestros resultados un 84% de los pacientes estudiados eran caucásicos; la siguiente etnia en frecuencia fue la latinoamericana, con un 11% del total de los pacientes con esferocitosis. Sólo un 3% eran árabes y no se identificó ningún paciente de raza negra ni asiática; todo esto está en consonancia con lo descrito por Gallagher [8] en cuanto a que parece que la frecuencia de esta entidad es baja en africanos y en países del sudeste asiático.

## DISCUSIÓN

Los países de origen no se pudieron identificar salvo en 2 pacientes, que procedían de Marruecos y uno de Ecuador.

En cuanto a los parámetros hematimétricos, los pacientes diagnosticados presentaban una CHCM aumentada y un porcentaje de Reticulocitos elevado, aunque con una desviación típica muy alta; ambos datos coinciden con lo referido por Da Costa et al [110] en que los valores de CHCM en estos pacientes son superiores a 36 g/dL, y por King et al [111] en cuanto a que la presencia de reticulocitosis no es preceptivo para el diagnóstico puesto que depende del grado de severidad, además de que algunos pacientes presentan hemólisis intermitente.

Es llamativo que sólo se realizase un estudio familiar, cuando es una patología con tan elevada prevalencia en nuestra área geográfica y además en el 80% de los casos se hereda de forma autosómica dominante.

La incidencia en nuestro centro fue de 0,80 casos por cada 100.000 habitantes y año. Esto supone 1 caso por cada 12500 habitantes en el Área I. Atendiendo a los datos publicados de prevalencia de la EH de 1 caso cada 2000 habitantes [14], no hemos encontrado diferencias significativas salvo en el caso del Área II, lo cual hemos atribuido a que en dicha Área no se derivan los estudios que no tengan repercusión clínica (**tabla 48**).

**Tabla 48. Incidencia de la EH en nuestro medio y comparación con literatura literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P *
I	250913	20	0,80	1/12500	0,1536
II	282948	1	0,04	1/330000	0,014
III	170308	7	0,41	1/25000	0,0892
IV	73410	2	0,27	1/37000	0,0775
V	59985	3	0,50	1/20000	0,123
VI	252569	7	0,28	1/37000	0,0612
VII	195869	5	0,26	1/40000	0,0591
VIII	98659	4	0,41	1/25000	0,0955
IX	54523	2	0,37	1/28000	0,1024
Desconocido		6			
TOTAL REGIÓN	1439187	57	0,40	1/25000	0,0774



Según estos resultados, podemos concluir que no hallamos diferencias entre las frecuencias obtenidas en nuestra población y las esperadas [14].

### **1.3.- TALASEMIAS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO.**

Las talasemias fueron el grupo con mayor número de diagnósticos de nuestro estudio, representando el 81% del total de los pacientes. Esto es congruente con los estudios publicados por Weatherall et al [16, 36] acerca de la distribución mundial de las talasemias, que son más prevalentes en las zonas endémicas para la malaria como es el área mediterránea. A pesar de esto, dentro de España hay una distribución muy irregular [25, 27] variando de unas Comunidades o Regiones a otras aunque los estudios realizados son muy heterogéneos.

#### **1.3.1.- $\alpha$ -TALASEMIA.**

El número de diagnósticos efectuados de  $\alpha$ -talasemia fue inferior al de  $\beta$  y  $\delta\beta$ -talasemias y, a pesar de que en la literatura se describe mayor prevalencia de  $\alpha$  que de  $\beta$ -talasemias cuando se realizan estudios moleculares [24], en nuestro caso la cifra es inferior a la de los mencionados estudios ya que sólo se realizaron a los pacientes con alteraciones analíticas, siguiendo lo establecido en nuestro protocolo.

La mediana de edad del diagnóstico es notablemente inferior al resto de talasemias, debido a que el programa de cribado mediante la validación de hemogramas de rutina se inició en 2003, cuando todavía no se disponía en nuestro centro de técnicas moleculares para el diagnóstico de  $\alpha$ -talasemias y el estudio de  $\alpha$ -talasemia se realizaba sólo a demanda del clínico, en la mayoría de ocasiones pacientes pediátricos.

En la distribución por etnias y países de procedencia se observó un número similar en pacientes árabes, negros y asiáticos, lo que concuerda con los datos publicados por Weatherall et al [36] con respecto a la distribución global de las  $\alpha$ -talasemias, distribuidas en las áreas de África, Oriente Medio y sudeste asiático, además de la cuenca del mediterráneo.

A partir del año 2007, coincidiendo con el inicio de los estudios moleculares, se experimentó un incremento en el número de diagnósticos debido a la implantación en el protocolo de estudio de anemias hereditarias los crietos para la realización de las técnicas moleculares. El número de diagnósticos se ha estabilizado en los últimos años.

En cuanto a la prevalencia detectada en nuestro medio, podemos observar que ésta resulta estadísticamente inferior a la descrita para otras zonas de nuestro entorno [18-20] (**tabla 49**) en la que aproximadamente la prevalencia media es de 1 caso cada 67 (1,5 %). Este hallazgo lo podemos explicar, más que aduciendo a una prevalencia inferior en nuestro medio, a que resulta una entidad que ha sido infradiagnosticada durante el periodo de tiempo de nuestro estudio. Este hecho no ha supuesto grandes problemas o complicaciones salvo por 3 casos de pacientes con hemoglobinopatía H que se diagnosticaron sin dificultad. Hay que tener en cuenta que la prevalencia referenciada en la literatura se ha realizado a través de estudios poblacionales realizados mediante análisis moleculares, mientras que nuestro estudio no es ha sido realizado con estos fines sino con fines diagnósticos en estudios dirigidos. Además en nuestra Región disponemos de los análisis moleculares desde el año 2007, como se ha expuesto en la sección de pacientes y métodos, por lo que el periodo anterior no es valorable en este respecto.

**Tabla 49. Incidencia de  $\alpha$ -talasemia en la Región de Murcia y comparación con literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	p*
I	250913	32	1,28	1/7800	0,0088
II	282948	9	0,32	1/30000	0,0024
III	170308	15	0,88	1/11300	0,0004
IV	73410	2	0,27	1/36700	0,0009
V	59985	3	0,50	1/20000	0,0011
VI	252569	25	0,99	1/10100	0,0003
VII	195869	6	0,31	1/32600	0,0003
VIII	98659	10	1,01	1/9800	0,0007
IX	54523	1	0,18	1/54500	0,0012
Desconocido					
Total región	1439187	103	0,72	1/14000	0,0048

En cuanto a los parámetros hematimétricos, hemos observado que existen diferencias significativas entre los pacientes con  $\alpha^0$  frente a los  $\alpha^+$  talasemia en el grado de microcitosis y cantidad de HCM así como la CHCM. Datos similares fueron observados por Villegas et al [112].

### 1.3.2.- BETA-TALASEMIA Y DELTA-BETA TALASEMIA.

Los casos de  $\beta$ -talasemia y  $\delta\beta$ -talasemia se diagnosticaron con un rango de edad muy amplio (de 0 a 92 años) debido a que en el programa de detección durante la validación de los hemogramas de rutina no se tuvo en cuenta la edad.

La etnia más frecuentemente detectada, aparte de la caucásica, fue la árabe (7%) seguida de la indígena americana (3%) mientras que la raza negra fue tan solo resultó ser del 1%. En el estudio realizado por Calvo-Villas en Lanzarote [34] no se hallaron  $\beta$ -talasemias en los pacientes de etnia indígena americana; tan solo se identificaron en las razas caucásica y magrebí. Esta discrepancia probablemente sea debido a que el periodo de estudio fue menor que en nuestro caso, en el que tuvimos tan solo 5 pacientes negros en los 10 años analizados.

Al desglosar por países, el país de donde procedían más pacientes con  $\beta$ -talasemia después de España fue Marruecos, en concordancia con el análisis por etnias.

Por otra parte, en el caso de las  $\delta\beta$ -talasemias el 96% eran de etnia caucásica y tan solo el 3% de etnia indígena americana. Esto viene a corroborar lo que ya se ha publicado en diversos estudios sobre la mayor prevalencia en el área mediterránea que en el resto del mundo, aunque sin poder estimar muy bien la frecuencia [36].

Las  $\beta$ -talasemias y  $\delta\beta$ -talasemias han sido las patologías con mayor número de diagnósticos en nuestro hospital, además de ser las que mayor incremento en número de pacientes diagnosticados han experimentado tras la implantación del SIL, triplicando su número en el segundo periodo con respecto al primero. Se observa un aumento en la incidencia de casos diagnosticados en el período 2003-2004 durante los primeros años de informatización de los sistemas, debido al inicio del programa de detección de talasemia durante el proceso de validación facultativa. En los años posteriores existe mayor número de diagnósticos que en los previos a la instauración del SIL (**gráfico 27**). No hemos encontrado, revisando la literatura, un estudio que relacione la implantación de un sistema informatizado de laboratorio con el incremento en el número de detecciones de anemias hereditarias.

Dado que en los años posteriores existe mayor número de diagnósticos que en los previos a la instauración del SIL, se puede concluir que la implantación del SIL favoreció el diagnóstico de los pacientes con  $\beta$ -talasemia de nuestra área de salud.

La mediana de edad de las  $\delta\beta$  y las  $\beta$ -talasemias fue de 32 años. Este aumento de la edad con respecto a los pacientes con  $\alpha$ -talasemia se justifica por varios motivos: por una parte, desde el año 2003 se realizan EFHB a pacientes con microcitosis añosos, ya que el protocolo de despistaje de AHH no tiene edad de corte. Por otra parte, también tiene relación con que el número de pacientes diagnosticados de  $\alpha$ -talasemia lo son a partir de estudios familiares, por tanto son dirigidos, y muchos de ellos por pediatría.

En lo referente a los datos analíticos, al comparar los parámetros hematimétricos de las  $\delta\beta$  con las  $\beta$ -talasemias, vemos que nuestros datos son equiparables a los de Velasco-Rodríguez[113] y existen diferencias significativas en cuanto al ADE que permiten diferenciar las  $\delta\beta$ -talasemias de las  $\beta$ -talasemias.

En nuestra base de datos de pacientes con  $\beta$  y  $\delta\beta$ -talasemia existe un número muy bajo de estudios familiares. Posiblemente haya sesgo en la reseña de datos en la recepción del estudio de anemia.

Como ya apuntaba De Las Heras Flórez [32], la baja cantidad de estudios familiares nos lleva a plantear la importancia de ampliar el estudio familiar teniendo en cuenta la elevada incidencia que se observa de portadores de rasgo talasémico en nuestra región.

En cuanto a la prevalencia de las  $\beta$ -talasemias en nuestra Región (**tabla 50**), no encontramos diferencias significativas respecto a la literatura consultada que establece una prevalencia media de 1/250 (0,4 %) [25] en las Áreas I, VI, VII y VIII. En el resto de Áreas sí detectamos diferencias significativas, con un número de casos inferior diagnosticados, así como en la población total de la Región.

**Tabla 50. Incidencia de  $\beta$ -talasemia en la Región de Murcia y comparación con literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	642	25,59	1/390	0,63
II	282948	13	0,46	1/21800	0,02
III	170308	16	0,94	1/10600	0,04
IV	73410	5	0,68	1/14600	0,032
V	59985	1	0,17	1/60000	0,0132
VI	252569	169	6,69	1/1500	0,2359
VII	195869	106	5,41	1/1800	0,1962
VIII	98659	39	3,95	1/2500	0,15
IX	54523	5	0,92	1/10000	0,042
Desconocido		11			
Total región	1439187	1007	0,72	1/1400	0,0244

En el caso de las  $\delta\beta$ -talasemias (**tabla 51**), no se observan diferencias respecto a la literatura consultada que establece una prevalencia media de 1/1111 (0,09%) [24] en las áreas I, III, VI, VII y VIII, ni tampoco en la población total de la Región.

**Tabla 51. Incidencia de  $\delta\beta$ -talasemia en la Región de Murcia y comparación con literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	91	3,63	1/2750	0,334
II	282948	3	0,11	1/9400	0,015
III	170308	11	0,65	1/15000	0,075
IV	73410	0	0,00	0	0,015
V	59985	0	0,00	0	0,0182
VI	252569	22	0,87	1/11500	0,096
VII	195869	10	0,51	1/19500	0,06
VIII	98659	6	0,61	1/16500	0,075
IX	54523	0	0,00	0	0,02
Total región	1439187	143	0,99	1/10000	0,105

Podemos concluir con estos datos que el despistaje de talasemias durante la validación analítica ha sido útil para detectar las talasemias en nuestra Área de Salud, y que no todos los centros realizan un diagnóstico de certeza en este grupo de patologías. Este hecho es muy relevante no por las consecuencias clínicas para el paciente con una talasemia menor, sino por

el consejo familiar y genético que podemos ofrecer a este grupo de población de tan elevada prevalencia en nuestra región y para minimizar la aparición de  $\beta$ -talasemias mayor.

### 1.3.3.- PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL.

En esta condición, la distribución por género mostró mayor proporción de varones que no se explica por el tipo de herencia, ya que es similar a la del resto de talasemias; tampoco hemos encontrado publicaciones que hagan referencia a este dato.

La etnia fue caucásica para todos los pacientes salvo uno, que era negro y de origen senegalés. Aunque la PHHF pancelular es predominante en la raza negra [87], la PHHF también se observa en individuos de dicha etnia, y de hecho este sujeto fue diagnosticado de PHHF heterocelular, al igual que el resto de pacientes. Llama la atención que durante los años de implantación del SIL no se realizó ningún diagnóstico de PHHF, para lo cual no hemos encontrado una explicación.

### 1.4.- HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO.

#### 1.4.1.- HEMOGLOBINOPATÍA S Y HEMOGLOBINOPATÍA C.

Al igual que hemos descrito que ocurría con las  $\beta$ -talasemias, en el segundo periodo estudiado (2003-2013) se han diagnosticado unas 9 veces más hemoglobinopatías que en el primer periodo. La hemoglobinopatía más frecuente diagnosticada fue la HbS seguida de la HbC.

La mediana de edad fue menor que en el caso de las talasemias; este hecho se ha atribuido a que en el caso de las  $\beta$ -talasemias la mediana de edad aumentó con el cribado durante la validación analítica.

Cabe destacar que este grupo de patologías, como es lógico dada su epidemiología, es el único de todos en el que la mayoría de pacientes eran extranjeros, y en consecuencia las etnias también fueron diferentes a la caucásica: la mayoría de pacientes eran de raza negra, seguida de la árabe y la latinoamericana. Esto concuerda con la distribución geográfica de la HbS y la HbC descrita en la bibliografía consultada [73], ya que estas 2 entidades fueron las más frecuentes en nuestro estudio.

Sólo hemos encontrado un estudio de De las Heras-Flórez [32] en el que, al contrario que en el nuestro, las HbAS halladas fueron en su mayoría de pacientes españoles. Ellos ya apuntaban que no es lo detectado en el resto de España y lo atribuyeron al origen de los habitantes del archipiélago y su relación con África, por la gran cantidad de individuos africanos que llegaron a las Islas como esclavos en los siglos XVI y XVII.

Resulta interesante que en el desglose por etnias de nuevo se objetiva lo ya descrito en la literatura [114] y la HbS se observa con más frecuencia en sujetos de raza negra mientras que la HbC predomina entre la raza árabe.

Es llamativo que exista un número tan elevado de diagnósticos de HbS heterocigota cuando clínicamente se trata de pacientes asintomáticos, y que tan solo un 26% de los pacientes fueran diagnosticados a partir de un estudio familiar. Probablemente esto se deba a que en la recogida de datos, en muchos de los estudios no se reflejaba si el motivo del estudio era por un estudio familiar y se trate por tanto de un sesgo de información en nuestro estudio. Lo mismo se puede decir de la HbC.

En el caso de la HbC, la mediana de edad al diagnóstico fue de 28,5 años con un rango de 0-56 y se identificaron 3 pacientes homocigotos. En este caso, al contrario que con la HbS, el estado homocigoto no supone un adelanto en la edad del diagnóstico dado que estos pacientes no presentan apenas manifestaciones clínicas ni analíticas relacionadas con la hemoglobinopatía. Nuestros datos coinciden con la literatura al respecto en cuanto a que esta entidad predomina en sujetos del norte de África [114].

En cuanto a la incidencia de hemoglobinopatías estructurales en nuestra Región, existe una clara diferencia estadísticamente significativa respecto a la frecuencia observada en diversos programas de cribado, cuya prevalencia es de 5,57-7,7 casos cada 1000 individuos [18-20].

**Tabla 52. Incidencia de hemoglobinopatías en total en la Región de Murcia y comparación con literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	78	3,11	1/3200	<0,0001
II	282948	8	0,28	1/35000	<0,0001
III	170308	6	0,35	1/28300	<0,0001
IV	73410	16	2,18	1/4500	<0,0001
V	59985	12	2,00	1/5000	<0,0001
VI	252569	16	0,63	1/15000	<0,0001
VII	195869	15	0,77	1/13000	<0,0001
VIII	98659	11	1,11	1/9000	<0,0001
IX	54523	1	0,18	1/54500	<0,0001
Desconocido		17			
Total región	1439187	180	1,25	1/8000	<0,0001

Respecto a la incidencia de portadores de rasgo drepanocítico en nuestra Región (**tabla 53**), comprobamos un prevalencia inferior a la referenciada en diversos programas de cribado, cuya prevalencia es de 1/259 [18] y 1/198 [20].

Cuando analizamos los casos de drepanocitosis diagnosticados (**tabla 54**), la tendencia es a tener un menor número de casos, aunque en nuestra Área y en el global de la Región, no llegan a observarse diferencias estadísticamente significativas respecto a la frecuencia esperada descrita en la literatura: 1/7316 [18] y 1/3365 [20].



**Tabla 53. Incidencia de hemoglobinopatía S heterocigota en la Región de Murcia y comparación con la literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	43	1,71	1/5800	0,04
II	282949	4	0,14	1/70000	0,039
III	170309	5	0,29	1/34000	0,009
IV	73411	8	1,01	1/9000	0,031
V	59986	11	1,83	1/5500	0,05
VI	252569	11	0,44	1/23000	0,012
VII	195869	8	0,4	1/25000	0,012
VIII	98660	3	0,3	1/32000	0,01
IX	54523	0	0	0	0,004
Total región	1439187	93	0,67	1/15500	0,016

**Tabla 54. Incidencia de hemoglobinopatía S homocigota en la Región de Murcia y comparación con la literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	9	0,41	1/28000	0,25
II	282949	0	0	0	0,025
III	170309	0	0	0	0,04
IV	73411	3	0,10	1/25000	0,31
V	59986	0	0	0	0,108
VI	252569	0	0	0	0,028
VII	195869	2	0,10	1/98000	0,104
VIII	98660	1	0,10	1/98000	0,13
IX	54523	1	0,18	1/54500	0,22
Total región	1439187	16	0,11	1/90000	0,082

Finalmente, para los casos de hemoglobinopatía C heterocigota (tabla 55), se observa un número inferior de casos estadísticamente significativo respecto a la frecuencia esperada descrita en la literatura: 1/1430 [18] y 1/3365 [20].

**Tabla 55. Incidencia de hemoglobinopatía C heterocigota en la Región de Murcia y comparación con la literatura (\*Prueba exacta de Fischer).**

	Población media por área	Incidencia acumulada (10 años)	Incidencia (/100.00 hab y año)	Prevalencia	P*
I	250913	13	0,52	1/19000	0,075
II	282949	1	0,04	1/282000	0,01
III	170309	1	0,06	1/170000	0,016
IV	73411	1	0,14	1/73000	0,04
V	59986	1	0,17	1/60000	0,04
VI	252569	3	0,12	1/84000	0,022
VII	195869	4	0,20	1/49000	0,035
VIII	98660	5	0,51	1/20000	0,082
IX	54523	0	0,00	1/54500	0,025
Total región	1439187	29	0,20	1/50000	0,03

#### 1.4.2.- OTRAS HEMOGLOBINOPATÍAS MENOS FRECUENTES

La Hb E se diagnosticó en 11 pacientes , la mayoría (81,8%) de origen español. Todos los casos eran heterocigotos (HbAE) y sólo en uno de los sujetos se realizó el diagnóstico como parte de un estudio familiar. Llama la atención que no existe ningún paciente de etnia asiática entre la Hb E, ya que es endémica en los países asiáticos [80].

En cuanto a los estados dobles heterocigotos, la asociación más frecuente observada fue la HbC/ $\beta$ -talasemia (4 casos). No hemos encontrado datos en la literatura acerca de la frecuencia de esta asociación. También se identificó un caso de HbC/ $\alpha$ -talasemia. Este dato es inferior al publicado por Velasco et al [115].

Sólo se han identificado 2 pacientes con HbS/ $\alpha$ -talasemia y 2 con HbS/ $\beta$ -talasemia. El total de pacientes con HbS en los que se estudió el perfil molecular de la cadena  $\alpha$ -globina fue de 18, por lo que la frecuencia de la asociación en nuestra serie fue de un 11,11%. Otros autores han hallado unas frecuencias de hasta el 54,2% [116]. Las diferencias en las frecuencias de asociación en los pacientes dobles heterocigotos se deben a la metodología empleada, ya que en nuestro caso la gran mayoría de pacientes con hemoglobinopatía no se

les realizó estudio de cadenas  $\alpha$ -globina, con lo que puede estar infradiagnosticadas en nuestro centro.

Por último, en el periodo del estudio se identificó un paciente con Hb Higashitochigi (Hb HT), un tipo de Hb inestable. Esta Hb fue descrita por primera vez por Fujisawa en un paciente de origen japonés [117] nacido en noviembre de 1990. El paciente de nuestro centro era de origen español y etnia caucásica, y curiosamente nació antes que el caso índice, en Enero de 1990.

## 2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS

### 2.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN LAS TALASEMIAS EN LA REGIÓN DE MURCIA.

Como objetivo secundario nos planteamos describir el perfil molecular de las talasemias en nuestra Región, algo no descrito hasta el momento. El estudio molecular no se realizó de rutina a nuestros pacientes sino que se realizó a aquellos que cumplían los criterios establecidos en nuestro protocolo.

#### 2.1.1.- ALTERACIONES MOLECULARES EN LAS $\alpha$ -TALASEMIAS

El perfil molecular de nuestros pacientes fue el siguiente:

La mutación más frecuentemente detectada fue la delección  $\alpha$ -3,7 que representó el 85% de los casos en nuestra serie. La siguiente en frecuencia fueron delecciones de los 2 genes de  $\alpha$ -globina (en nuestro caso la delección -SEA), con una frecuencia del 3,88%. Una minoría de pacientes resultaron portadores de  $\alpha$ -talasemia no delección. Con respecto a los estudios publicados, nuestros datos se asemejan a los publicados por Villegas et al de 1998 [63], que identificó un 86% de pacientes con delección  $\alpha$ -3,7, y un 1,7% de  $\alpha$ -talasemia no delección. En el estudio de Villegas et al [63] se identificó un mayor número de delecciones amplias, probablemente debido a que se trata de un centro de referencia para trastornos de la

hemoglobina y reciben mayor número de casos. En cuanto al resto de publicaciones [60,62], los datos de la deleción  $\alpha$ -3,7 son similares, y el porcentaje de mutaciones diferentes a la  $\alpha$ -3,7 fue menor que en nuestro centro, así como las formas no delecionales. Este dato puede ser debido al menor número de casos estudiados en ambos, 30 en el caso de la Comunidad Valenciana [60] y 32 en Barcelona [62] (**tabla 56**).

En un estudio publicado en 2011 por Briceño et al [68], realizado en el Hospital Clínico San Carlos, que actúa como centro de referencia nacional para este tipo de estudios, las frecuencias de las formas no delecionales son superiores a las observadas por nosotros, representando más del 6,9% de las  $\alpha$ -talasemias.

**Tabla 56. Comparación de las alteraciones moleculares en  $\alpha$  talasemia en diferentes provincias.**

Alteración molecular	Pérez-Sirvent et al. C. Valenciana [60]	Remacha et al Barcelona [62]	Villegas et al Madrid [63]	HCUVA Murcia
<b><math>\alpha</math>-tal deleción</b>				
Deleción $\alpha$ -3,7	19 (64%)	28 (84,84%)	910 (86,09%)	88 (85,43%)
Deleción $\alpha$ -4,2	0		16 (1,51%)	0
Deleciones amplias	0		113 (10,69%)	6 (5,82%)
<b><math>\alpha</math>-tal no deleción</b>				
IVS1(-5nt)	0		18 (1,70%)	3 (2,91%)
POLYA	-			1 (0,97%)
No identificada	11 (36%)	4	0	-

En cuanto a la relación entre alteraciones moleculares y grupos étnicos, la bibliografía consultada concuerda con nuestros resultados en cuanto a que, a nivel mundial, las mutaciones más frecuentes en el área del mediterráneo son la  $\alpha$ -3,7 y de las no deleción, la IVS1(-5nt) mientras que la deleción –SEA es la más común en los pacientes de raza asiática [118]. En nuestro centro, la deleción –SEA fue hallada en 3 pacientes de origen asiático, de acuerdo a lo descrito por Hartevelde a nivel global y por Villegas en la población española [112,118] y que se realizaron como parte de un estudio familiar; del cuarto paciente no pudo identificarse el país de procedencia ni la etnia.

En el caso de las  $\alpha$ -talasemia no delección, las frecuencias oscilan entre el 0 y el 7,7% en los diferentes estudios (de diferentes regiones) [60,62,68,112]. Según las fuentes consultadas, la prevalencia de  $\alpha$ -talasemia puede llegar a ser superior a la de  $\beta$ -talasemia cuando se aplican técnicas moleculares [24,39,119].

### 2.1.2.- ALTERACIONES MOLECULARES EN LAS $\beta$ -TALASEMIAS

De los 139 estudios moleculares de las cadenas  $\beta$  de globina, en el 82% se identificó alguna alteración. El 54% de las mutaciones correspondían a hemoglobinopatías (HbS y HbC).

En un 46% de los estudios se identificaron mutaciones causantes de  $\beta$ -talasemia (64 pacientes). La más frecuente en nuestro centro fue la del CD39 [C>T], que se detectó en el 32,7% de los pacientes estudiados, seguida a gran distancia por IVS-2nt745 [C>G] y CD6 [-A] con un 14,5% de casos cada una. Las siguientes en frecuencia fueron la IVS1.6 [T>C] hallada en un 12,7% de los pacientes, el CD8/9 [+G] e IVS-1nt1, que se identificaron en un 9,1% y un 7,3% respectivamente. Menos frecuentes resultaron las mutaciones IVS 2.1 (5,5% de casos) y el CD5 [-CT] (3,6%), que fue descrito por Roperó et al [58] por primera vez en España con posterioridad a estas publicaciones.

Como puede observarse en la **tabla 57**, al comparar con el resto de estudios realizados en las diferentes regiones de España, se observa heterogeneidad en cuanto a las frecuencias según la zona estudiada: en el área del litoral mediterráneo (Barcelona, Valencia, Granada y Baleares), la mutación hallada con más frecuencia fue la del CD39 [31,49,52,60], lo cual está en consonancia con los datos que aportamos acerca de la Región de Murcia.

En las zonas del centro de la península la mutación más frecuente fue la IVS1.1, aunque seguida de cerca por el CD39[54]. Por el contrario, en las zonas del litoral la incidencia de IVS1.1 fue de las menos detectadas, al igual que en nuestra serie.

Tabla 57. Comparación de las alteraciones moleculares en beta talasemia en diferentes provincias.

MUTACIONES	FENOTIPO	Murcia	C. Valenciana [60]	Centro España [54]	Baleares [49]	Granada [52]	Barcelona [31]
<b>Procesamiento ARNm</b>							
IVS -2nt745 [C>G]	$\beta^+$	14,5%		1,7%	-	2,1%	
IVS -1nt6 [T>C]	$\beta^+$	12,7%	16,3%	8,4%	0	8,9%	16%
IVS -1nt1 [G>A o T]	$\beta^0$	7,3%	9,3%	29,5%	3,1%	22,3%	3%
IVS -2nt1	$\beta^0$	5,5%			-	0	
IVS-1nt110	$\beta^+$				24,4%	26,7%	8,5%
<b>TRADUCCIÓN</b>							
CD 39 [C>T]	$\beta^0$	32,7%	44,2%	31,2%	45,9%	31,1%	64%
CD 6 [-A]	$\beta^0$	14,5%	18,6%	0,3%	20,4%	-	
CD 8/9 [+G]	$\beta^0$	9,1%		8,1%	-		
CD 5 [-CT]	$\beta^0$	3,6%			-		
<b>OTRAS/DESC.</b>			11,6%	20,8%		8,9%	8,5%
<b>Total</b>		53	43	308		45	

La mutación IVS1.110 presenta una marcada heterogeneidad en su distribución geográfica, con una alta incidencia en Baleares y en Granada, donde se encontraron frecuencias de alrededor del 25% y sin embargo apenas presente en la Comunidad Valenciana y en Barcelona. En el caso de Murcia llama la atención que no se haya identificado a ningún paciente portador de esta mutación, cuando en el resto de publicaciones sí está representada aunque sea con baja frecuencia.

Nuestros datos también reflejan frecuencias semejantes a las de la Comunidad Valenciana en las mutaciones del CD6 y de IVS 1.6. La única mutación en la que hemos observado una incidencia mucho mayor que en el resto de publicaciones es en la mutación IVS2.745, que se identificó tan solo en dos de los trabajos publicados, y con una frecuencia del 2 y del 3%, muy inferior a la encontrada en nuestra Región, donde alcanza un 14,5% del total de los casos.

## 2.2.- ESTABLECER LA NECESIDAD DE UN PROGRAMA DE CRIBADO DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS EN NUESTRA REGIÓN. INFLUENCIA DE LOS MOVIMIENTOS MIGRATORIOS.

Los programas de cribado neonatal de hemoglobinopatías estructurales se están implantando en diferentes Comunidades Autónomas de nuestro país desde el año 2003 [35,120-122], con motivo del incremento de la inmigración de población de riesgo y los costes en salud y sanitarios que esto conlleva. Esto permite disminuir la morbimortalidad de los niños diagnosticados de anemia drepanocítica mediante la instauración de un tratamiento profiláctico con penicilina, vacunación contra gérmenes encapsulados y la instauración de un manejo precoz de las complicaciones.

Aún no siendo un estudio de prevalencia puro sino retrospectivo basado en nuestros registros hospitalarios de 19 años, en nuestro estudio hemos detectado, al igual que en el caso de las talasemias, un incremento a partir de 2003 en el número de diagnósticos de hemoglobinopatías, tanto de hemoglobinopatías estructurales en global, como de S y C de forma individual (**gráfico 48**). Además, y como se describió en el apartado anterior, el número de casos diagnosticados respecto al esperado a tenor de lo referenciado en la literatura consultada en distintos programas de cribado es claramente inferior. Siendo una Comunidad Autónoma en la que claramente ha aumentado la población de riesgo, cabe deducir que estamos ante una patología infradiagnosticada mediante la sistemática de trabajo convencional del sistema sanitario del Servicio Murciano de Salud.

En cuanto al déficit de G6PDH la prevalencia detectada en nuestro medio es inferior a la esperada en relación a otras regiones de nuestro entorno. Este hecho, como ya se comentó en el apartado anterior probablemente sea debido a que también es una entidad infradiagnosticada. Según los datos publicados [35] es muy probable que aproximadamente 1 de cada 400 individuos presenten alguna crisis hemolítica aguda en algún momento de su vida si entra en contacto con un agente oxidante (habas o fármacos). Por ello, con el fin de prevenir el desarrollo de crisis hemolíticas en el curso de la vida evitando el contacto con los agentes desencadenantes citados, y establecer si en nuestro medio la frecuencia es la descrita en otras zonas de nuestro entorno (35), sería recomendable establecer en el contexto de los programas de cribado neonatal el déficit de G6PDH para el diagnóstico precoz de portadores hemocigóticos, atendiendo además al bajo coste y sencillez de la técnica empleada (mancha fluorescente) [123].

Dentro de los requisitos generales de la Organización Mundial de la Salud para la incorporación de una patología a un programa de cribado neonatal figuran:

1. Existencia de un marcador bioquímico adecuado (barato, sensible, específico) que no origine falsos negativos y la menor proporción de falsos positivos posibles.
2. Que para la enfermedad que se pretende detectar existan posibilidades de iniciar un tratamiento eficaz que evite su desarrollo clínico.

En nuestra Comunidad Autónoma consideramos justificado establecer un programa de cribado de hemoglobinopatías y del déficit de G6PDH por las siguientes razones:

1. Nuestros datos reflejan claramente un aumento de la población de riesgo en nuestra Región, aunque se ha estabilizado en los últimos años, y de casos diagnosticados en esta población.
2. Nuestros datos indican que estamos ante entidades con prevalencia en aumento y que probablemente estamos infradiagnosticando con la metodología de trabajo habitual de nuestro sistema sanitario.
3. Estamos ante enfermedades que se benefician de una actitud preventiva y de terapia clínica precoz, lo que evitaría muy probablemente un alto coste sanitario.
4. Las técnicas actuales de HPLC o electroforesis capilar presentan una alta sensibilidad para la identificación de Hb S y C, las más frecuentes y las de más trascendencia clínica, así como la técnica de la mancha fluorescente como prueba de cribado inicial para el déficit de G6PDH.
5. El resto de AHH no se beneficiarían de programa de cribado.

Consideramos que nuestros datos son originales y relevantes debido a la falta de registros epidemiológicos de AHH en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia y nos pueden ayudar a establecer estudios epidemiológicos adicionales o programas pilotos de cribado para estudiar la frecuencia real de estas patologías y la demanda real de atención sociosanitaria en la población general o en determinados grupos poblacionales de riesgo.



## CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

---

1. El perfil epidemiológico y biológico de las anemias hemolíticas hereditarias en nuestra Área es similar al descrito en otras regiones de España, en especial de las áreas del litoral mediterráneo. Las talasemias representan las anemias hemolíticas hereditarias más prevalentes en el Área I. Sin embargo, en el subanálisis se objetivó que la Hemoglobinopatía S es la más frecuente en la población inmigrante.
2. El perfil molecular de la  $\beta$ -talasemia en nuestra Región es similar al descrito en otras regiones de España, siendo la alteración más frecuente la mutación [C>T] que afecta al codon CD39.
3. El perfil molecular de la  $\alpha$ -talasemia en nuestra Región es similar al descrito en otras regiones de España con un 85% de frecuencia de la delección  $\alpha$ -3,7 y un 4% de  $\alpha$ -talasemias no delección.
4. Nuestros datos justifican la implantación de un programa de cribado neonatal de hemoglobinopatías y déficit de G6PDH, al menos en la población de riesgo, para poder establecer acciones preventivas eficaces para la salud de estos pacientes.
5. Actualmente nuestros datos constituyen los únicos registros epidemiológicos de anemias hemolíticas hereditarias existentes en la Región de Murcia. Esto puede ayudar a establecer estudios epidemiológicos prospectivos adicionales que definan la frecuencia real de estas patologías y su impacto en la atención sociosanitaria tanto en la población general como en la población de riesgo.



## REFERENCIAS

**Referencias:**

1. Hardisty RM, Weatherall DJ. Blood and Its Disorders. Wiley-Blackwell; 1982.
2. Dacie J. Hereditary Spherocytosis. The hereditary Haemolytic Anaemias. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985. pp. 134–6.
3. Cooley TB, Lee P. Cooley. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. Trans Am Paediatr Soc. 1925; 37(29).
4. Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science. 1956; 124(3220):484-485.
5. Gallagher PG. Red cell membrane disorders. ASH Education Program Book. 2005(1),13-18.
6. Morton NE, Mackinney AA, Kosower N, Schilling RF, Gray MP. Genetics of spherocytosis. Am. J. Hum. Genet. 1962 Jun;14:170-84.
7. Gallagher PG. Red Blood Cell Membrane Disorders. En: Hoffman R, Benz EJJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J, editores. Hematology- Basic principles and practice. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. pp. 592–613.
8. Gallagher PG. Disorders of erythrocyte metabolism and shape. In: Christensen RD, editor. Hematologic Problems of the Neonate. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. pp. 209-38
9. Vives Corrons JL. Introducción al estudio de la patología eritrocitaria. In: Sans-Sabrafen J, Beses Raebel C, Vives Corrons JL, editores. Hematología clínica. 5 ed. Madrid: Elsevier; 2006. pp. 81–106.
10. Godal HC, Heistø H. High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian blood donors. Scand J Haematol. 1981 Jul;27(1):30–4.
11. Eber SW, Pekrun A, Neufeldt A, Schröter W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: screening using a modified glycerol lysis test. Ann. Hematol. 1992 Feb;64(2):88–92.
12. Dacie J, Lewis SM, Luzzatto L. Investigation of the hereditary hemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: J D V, Lewis SM, editors. Practical Hematology. Churchill Livingstone; 1991. pp. 195–225.
13. Saada V, Cynober T, Brossard Y, Schischmanoff PO, Sender A, Cohen H, et al. Incidence of hereditary spherocytosis in a population of

- jaundiced neonates. *Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Jul;23(5):387–97.
14. Vives Corrons JL. Anemias hemolíticas. Aspectos generales. Anemias hemolíticas hereditarias. In: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, editors. *Hematología Clínica*. 5 ed. Madrid: Elsevier; 2006. pp. 187–221.
  15. Gulbis B, Eleftheriou A, Angastiniotis M, Ball S, Surrallés J, Castella M, et al. Epidemiology of rare anaemias in Europe. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;686:375–96.
  16. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The hemoglobinopathies. In: Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York: Mc Graw-Hill; 2001. p. 4571.
  17. Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P, Giordano PC, et al. Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2007;67(1):39–69.
  18. Cela de Julián E, Dulín-Iñiguez E, Guerrero Soler M, Arranz Leirado M, Galarón García P, Beléndez Bieler C, et al. [Evaluation of systematic neonatal screening for sickle cell diseases in Madrid three years after its introduction]. *An Pediatr (Barc)*. 2007 Apr;66(4):382–6.
  19. Mañu Pereira MDM, Vives Corrons J-L. Neonatal haemoglobinopathy screening in Spain. *J. Clin. Pathol.* 2009;62(1):22–5.
  20. Joyanes B, Moro M, Ropero P, Briceño O, Dulín E, Villegas A. [Screening of hemoglobinopathies in a cohort of newborns in Madrid]. *Med Clin (Barc)*. 2006 Mar 4;126(8):290–2.
  21. Gulbis B, Cotton F, Ferster A, Ketelslegers O, Dresse MF, Rongé-Collard E, et al. Neonatal haemoglobinopathy screening in Belgium. *J. Clin. Pathol.* 2009 Jan;62(1):49–52.
  22. Streetly A, Latinovic R, Hall K, Henthorn J. Implementation of universal newborn bloodspot screening for sickle cell disease and other clinically significant haemoglobinopathies in England: screening results for 2005-7. *J. Clin. Pathol.* 2009 Jan;62(1):26–30.
  23. Bardakdjian-Michau J, Bahuau M, Hurtrel D, Godart C, Riou J, Mathis M, et al. Neonatal screening for sickle cell disease in France. *J. Clin. Pathol.* 2009 Jan;62(1):31–3.
  24. Moreno Miralles I, Bolufer Gilabert P, Pérez Sirvent M. Alteraciones moleculares de las talasemias en España. Revisión de los estudios existentes. *Med Clin (Barc)*. 1999 Dec 11;113(20):789–94.
  25. Baiget M. Los síndromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. *Sangre (Barc)*. 1986;(31):609–13.

26. Cao A, Gossens M, Pirastu M. Beta thalassaemia mutations in Mediterranean populations. *British journal of Haematology*. 1989 Mar;71(3):309–12.
27. Oliva Berini E, Cladera Serra A. Campaña para la detección de betatalasemia minor y prevención de la mayor en la isla de Menorca: experiencia de 10 años. *Med Clin (Barc)*. 1998;110(10):361–4.
28. Calero F, Villegas A, Porres A, Valverde F, del Potro E, Sánchez P, et al. Hematologic data in 825 cases of beta-thalassaemia trait in Spain. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1990 Jan 1;32(4):265–70.
29. Malcorra JJ, Balda MI, Campo C, Mataix R, Molero T, Castro E. [Hemoglobinopathies and thalassemsias in the Hindu settlement established in the Canary Islands]. *Sangre (Barc)*. 1993 Aug;38(4):342.
30. Martín Núñez G, Ramos Fernández de Soria R, Fernández Galán MA, Sánchez Gil F, Cuesta P, Martín Borregón J, et al. [Detection campaign for hemoglobinopathies and thalassemsias among school children in northern Extremadura]. *Sangre (Barc)*. 1995 Dec;40(6):459–64.
31. Benito A, Villegas A, Perez-Cano R, Bernal R. Beta-thalassaemia in south-western Spain: high frequency of G-->A (IVS I-1) mutation. *British journal of Haematology*. 1996 Feb;92(2):336–8.
32. las Heras Flórez de S, Pérez Hernández LM. Hemoglobinopatías diagnosticadas en el área sanitaria del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria de Santa Cruz de Tenerife durante un año. *An. Med. Interna (Madrid)*. 2008;25(2):61–6.
33. Dulín IE, Cantalejo L, Cela J. Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid. Estudio piloto. *Anales de Pediatría*. 2003;58(2) pp 146-155
34. Calvo-Villas JM, Zapata Ramos MF, Cuesta Tovar J, Iglesia Íñigo S de L, Ropero Gradilla P, Carreter de Granda E, et al. Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *An. Med. Interna (Madrid)*. Arán Ediciones, S. L; 2006;23(5):206–12.
35. Mañú Pereira MM, Cabot A, Martínez González A, Sitjà Navarro E, Cararach V, Sabrià J, et al. Cribado neonatal de hemoglobinopatías y déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Cataluña. Estudio molecular de la anemia falciforme asociada a alfatalasemia y déficit de G6PD. *Med Clin (Barc)*. 2007 Jun;129(5):161–4.
36. Weatherall DJ. The Thalassemsias: Disorders of Globin Synthesis. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT, editors. *Williams Hematology*. 8 ed. Mc Graw-Hill; 2010. pp. 675–707.
37. Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -thalassemsias. *N. Engl. J. Med*. 2014 Nov



- 13;371(20):1908–16.
38. Calero F. Caracterización clínica y analítica de la alfa talasemia. Estudio en la población española. [Madrid]: Universidad Complutense Madrid; 1985.
  39. Villegas A, Sanchez J, Sal del Rio E. Alpha-globin genotypes in a Spanish population. *Hemoglobin*. 1992;16(5):427–9.
  40. Fei YJ, Kutlar F, Harris HF, Wilson MM, Milana A, Sciacca P, et al. A search for anomalies in the zeta, alpha, beta, and gamma globin gene arrangements in normal black, Italian, Turkish, and Spanish newborns. *Hemoglobin*. 1989;13(1):45–65.
  41. Aristizabal A, Merino S, Catediano E, Sasieta M, Aragües P, Navajas A. [Clinical consequences of alpha-thalassemia in the basque country, Spain. Impact of neonatal screening]. *An Pediatr (Barc)*. 2015 Aug;83(2):85–8.
  42. de-la-Iglesia-Inigo S, Carranza-Rodriguez C, Ropero-Gradilla P, Gonzalez-Fernandez F-A, Molero-Labarta T, Hemmersbach-Miller M, et al. Red blood cell disorders in recently arrived African immigrants to Gran Canaria, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Feb;107(2):91–7.
  43. Molina-Arrebola MA, Avivar-Oyonarte C, Salas-Coronas J, Pérez-Moyano R, Giménez-López MJ, García-Bautista JA, et al. Practical diagnosis of red cell disorders in southern Spain. *Acta Haematol*. 2012;127(1):50–5.
  44. Kazazian HH, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of beta-thalassemia. *Blood*. 1988 Oct;72(4):1107–16.
  45. Thein SL. beta-Thalassaemia. *Baillieres Clin. Haematol*. 1993 Mar;6(1):151–75.
  46. Kattamis C, Kattamis AC. Genotypes and phenotypes of beta-thalassemia in Mediterranean populations. *Pediatr Hematol Oncol*. 1997 May;14(3):7-9.
  47. Amselem S, Nunes V, Vidaud M, Estivill X, Wong C, d'Auriol L, et al. Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *Am. J. Hum. Genet*. 1988 Jul;43(1):95–100.
  48. Bolufer Gilabert P, Pérez Sirvent M, Moreno Miralles I. Molecular differences in beta-thalassemia between the Spanish Mediterranean area and inland populations. *Hemoglobin*. 1998 Sep;22(5-6):529–33.
  49. De Luna G, Balaguer H, Cabrer B, Baiget M, Del Río E, Alvarez F. Caracterización molecular de las mutaciones de la b y db-talasemia en la isla de Mallorca. XXXIX Reunión Nacional de la AEHH. XIII Congreso

de la SETH.

50. Ribeiro ML, Gonçalves P, Cunha E, Bento C, Almeida H, Pereira J, et al. Genetic heterogeneity of beta-thalassemia in populations of the Iberian Peninsula. *Hemoglobin*. 1997 May;21(3):261–9.
51. Ropero P, Sanchez J, González FA, Armada B, Benito A, Caldeira A, et al. [Molecular heterogeneity of beta thalassaemia]. *Sangre (Barc)*. 1994 Oct 1;39(5):365–8.
52. Molina MA, Romero MJ, Abril E, Delgado I, Cano RM, Garrido F, et al. [Frequency of molecular alterations in heterozygous beta-thalassemia in southern Spain and their relation to the hematologic phenotype]. *Sangre (Barc)*. 1994 Aug;39(4):253–6.
53. Font Ferré LI. Estudio de las hemoglobinopatías en la zona del delta del río Ebro. *Biol Clin Hematol*. 1993 Oct 5;15:87–96.
54. Villegas A, Ropero P, González FA, Armada B, Martí E, Carreño MD, et al. Molecular heterogeneity of beta-thalassaemia in a Spanish population from the area centre of Spain. *Eur. J. Haematol*. 1996 Nov;57(5):389–91.
55. Villegas A, Ropero P, González FA, Martí E, Anguita E, de Blas JM. High incidence of the CD8/9 (+G) beta 0-thalassaemia mutation in Spain. *Haematologica*. 1998 Dec;83(12):1066–8.
56. Villegas A, Ropero P, González FA, Anguita E, Espinós D. The thalassaemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin*. 2001 Aug;25(3):273–83.
57. Mañu Pereira MDM, Cabot Dalmau A, Vives Corrons J-L. Molecular heterogeneity of  $\beta$ -thalassaemia alleles in Spain and its importance in the diagnosis and prevention of  $\beta$ -thalassaemia major and sickle cell disorders. *Hemoglobin*. 2009;33(3-4):226–34.
58. Ropero P, Villegas A, Martí E, González FA. [The first case of beta-thalassaemia by frameshift CD5 (-CT) mutation in Spain]. *Med Clin (Barc)*. 1999 Apr 24;112(14):556–7.
59. Babameto-Laku A, Mitre A, Berisha S, Mokini V, Roko D. Molecular Genetic Characterization of  $\beta$ -Thalassaemia and Sickle Cell Syndrome in the Albanian Population. *Balkan J. Med. Genet*. 2011 Jun;14(1):45–50.
60. Pérez Sirvent M, Moreno Miralles I, Boluferx Gilabert P, Lerma Alejos E, Gómez Rejas MA, Vayá Montaña A, et al. [Molecular characterization of thalassaemias in the Valencia community and its relationship with the hematological phenotype]. *Sangre (Barc)*. 1998 Oct;43(5):392–8.
61. Sanchez J, González FA, Armada B, Carreño DL, Arrizabalaga B, Ropero P. Molecular pathology of  $\alpha$  thalassaemia in Spain. *British journal of Haematology*. 1996 Oct 4;93(Supl 2):27.

62. Remacha AF, Del Río E, Baiget M. [Atypical familial microcytosis: a familial and genetic study]. *Med Clin (Barc)*. 1998 Feb 14;110(5):183–5.
63. Villegas A, González FA, Sanchez J, Anguita E. Alfa-talasemia. *Haematologica/Ed. Española*. 1998 Oct 4;1(83):423–6.
64. Ayala S, Colomer D, Aymerich M, Pujades A, Vives Corrons JL. Nondeletional alpha-thalassemia: first description of alpha Hph alpha and alpha Nco alpha mutations in a Spanish population. *Am. J. Hematol*. 1996 Jul;52(3):144–9.
65. Villegas A. [Analysis of a program for atypical familial microcytosis. Molecular basis of alpha-thalassemia]. *Sangre (Barc)*. 1990 Aug 1;35(4):277–88.
66. Cunha E, Bento C, Oliveira A, Relvas L, Neves J, Gameiro M, et al. Hb Plasencia [ $\alpha$ 125(H8)Leu $\rightarrow$ Arg ( $\alpha$ 2)] is a frequent cause of  $\alpha$ + thalassemia in the Portuguese population. *Hemoglobin*. 2013;37(2):183–7.
67. Ayala S, Colomer D, Pujades A, Aymerich M, Vives Corrons JL. Haemoglobin Lleida: a new alpha 2-globin variant (12 bp deletion) with mild thalassaemic phenotype. *British journal of Haematology*. 1996 Sep;94(4):639–44.
68. Briceno Polacre OM, Gonzalez-Fernandez F-A, Ropero-Gradilla P, Ruiz A, Gonzalez M, Briceno J, et al. [No deletion alpha thalassaemia in Spain. Abnormal hematological index and molecular study]. *Invest Clin*. 2011 Jun;52(2):111–20.
69. Vives Corrons JL, Pujades MA, Miguel-García A, Miguel-Sosa A, Cambiasso S. Rapid detection of Spanish (delta beta)zero-thalassemia deletion by polymerase chain reaction. *Blood*. 1992 Sep 15;80(6):1582–5.
70. Fernández Valle MC, Risueño CE, Muñoz JA. Distribución de la delta-beta-talasemia en la Bahía de Cádiz. *Sangre (Barc)*. 1991 Oct;36(5):438.
71. Dacie J. Hereditary enzyme-deficiency haemolytic anaemias III. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985. pp. 369–72.
72. Dacie J. Hereditary enzyme-deficiency haemolytic anaemias I. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985. pp. 284–5.
73. Vives Corrons JL. Hemoglobinopatías estructurales. In: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, editors. *Hematología Clínica*. 5 ed. Madrid: Elsevier; 2005. pp. 223–45.
74. Natarajan K, Townes TM, Kutlar A. Disorders of Hemoglobin Structure: Sick Cell Anemia and Related Abnormalities. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT, editors.

- Williams Hematology. 8 ed. Mc Graw-Hill; 2010.
75. De Pablos JM. Hemoglobinopatías estructurales en España. *Biol Clin Hematol.* 1988 May 10;(10):5–15.
  76. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 1997 Sep 11;337(11):762–9.
  77. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 1999 Apr 1;340(13):1021–30.
  78. Falletta JM, Woods GM, Verter JI, Buchanan GR, Pegelow CH, Iyer RV, et al. Discontinuing penicillin prophylaxis in children with sickle cell anemia. Prophylactic Penicillin Study II. *J. Pediatr.* 1995 Nov;127(5):685–90.
  79. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *British journal of Haematology.* 2010. pp. 35–49.
  80. Villegas A, Corral M, Moraleda JM. Hemoglobinopatías. Talasemias. In: Moraleda JM, editor. *Pregrado de Hematología.* 3rd ed. Madrid: Luzan 5; 2011. pp. 111–34.
  81. Bain BJ, Amos RJ, Bareford D, Chapman C, Davies SC, Old JM, et al. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *British Committee for Standards in Haematology, editor. British journal of Haematology.* Blackwell Science Ltd; 1998. pp. 783–92.
  82. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol.* 2004 Jun;26(3):159–76.
  83. Siniscalco M, Bernini L, Filippi G, Latte B, Meera Khan P, Piomelli S, et al. Population genetics of haemoglobin variants, thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, with particular reference to the malaria hypothesis. *Bull. World Health Organ.* 1966;34(3):379–93.
  84. Flint J, Hill AV, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW, et al. High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature.* 1986 Jun;321(6072):744–50.
  85. Williams TN. Red blood cell defects and malaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006 Oct;149(2):121–7.
  86. Villegas A, Ropero P. Talasemias. Eds A, editor. *Hematología, citocinas, inmunoterapia y terapia celular.* Madrid; 2000 May 3;3(5):272–85.
  87. Vives Corrons JL. Talasemias y síndromes talasémicos. In: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, editors. *Hematología Clínica.* 5 ed. Madrid: Elsevier; 2005. pp. 247–72.

88. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N. Engl. J. Med.* 1999 Jul 8;341(2):99–109.
89. Pearson HA, O'Brien RT, McIntosh S. Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. *N. Engl. J. Med.* 1973 Feb 15;288(7):351–3.
90. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet.* 2008 Oct 18;372(9647):1411–26.
91. Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Ozcan R, Eber SW. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int. J. Hematol.* 2000 Feb;71(2):118–35.
92. Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J. Pediatr.* 1990 Sep;117(3):409–16.
93. Gallagher PG. Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin. Hematol.* 2004 Apr;41(2):142–64.
94. Christensen RD, Yaish HM, Gallagher PG. A pediatrician's practical guide to diagnosing and treating hereditary spherocytosis in neonates. *Pediatrics.* 2015 Jun;135(6):1107–14.
95. Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, Gomes C, Texier P, Lemos C, et al. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. *Blood.* 2000 Aug 15;96(4):1602–4.
96. Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell M, et al. Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat. Genet.* 1996 Jun;13(2):214–8.
97. Michaels LA, Cohen AR, Zhao H, Raphael RI, Manno CS. Screening for hereditary spherocytosis by use of automated erythrocyte indexes. *J. Pediatr.* 1997 Jun;130(6):957–60.
98. Young LE, Izzo MJ, Platzer RF. Hereditary spherocytosis. I. Clinical, hematologic and genetic features in 28 cases, with particular reference to the osmotic and mechanical fragility of incubated erythrocytes. *Blood.* 1951 Nov;6(11):1073–98.
99. INE: Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Madrid. INE. c2014. Disponible en: <http://www.ine.es/apellidos/inicio.do>. INE.
100. INE: Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Madrid. INE. c2014. Disponible en: <http://www.ine.es/tnombres/inicio.do>.
101. Gottfried EL, Robertson NA. Glycerol lysis time as a screening test for

- erythrocyte disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 1974 Feb;83(2):323–33.
102. Gerbstadt H. [The significance of the curve of osmotic resistance in erythrocytes]. *Z Biol.* 1952;105(4):301–12.
103. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red- Cell Enzyme Analysis. *British journal of haematology.* 1977;35(2), 331-340.
104. Iavorkovskii LI. [A micromethod of qualitative determination of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (a modification of the “methemoglobin reduction test” for detection of erythrocytes sensitive to drug action)]. *Lab Delo.* 1968;4:203–4.
105. Beutler E, Gelbart T. Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3585–8.
106. Grace RF, Zanella A, Neufeld EJ, Morton DH, Eber S, Yaish H, et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. *Am. J. Hematol.* 2015 Sep;90(9):825–30.
107. Vives Corrons JL. Anemias por alteraciones bioquímicas del eritrocito. Membranopatías y defectos del metabolismo. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* 2001;8(51), 2694-2702.
108. van Solinge WW, van Wijk R. Disorders of red cells resulting from enzyme abnormalities. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT, editors. *Williams Hematology.* Eighth. McGraw-Hill Medical Publishing; 2010. pp. 647–74.
109. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Valentini G. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *British journal of Haematology.* 2005 Jul;130(1):11–25.
110. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013 Jul;27(4):167–78.
111. King M-J, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol.* 2013 Jun;35(3):237–43.
112. Villegas A, Porres A, Sanchez J, González FA, Pérez-Clausell C, Martínez M, et al. Red blood cell phenotypes in alpha-thalassemias in the Spanish population. *Haematologica.* 1998 Feb;83(2):99–103.
113. Velasco Rodriguez D, Alonso-Dominguez J-M, Gonzalez-Fernandez F-A, Villarrubia J, Ropero P, Martinez-Nieto J, et al. delta-beta-Thalassemia trait: how can we discriminate it from beta-thalassemia trait and iron deficiency anemia? *Am J Clin Pathol.* 2014 Oct;142(4):567–73.
114. Villegas A. Patología de la hemoglobina en la población española y en

- la población emigrante. *An. Med. Interna (Madrid)*. 2006 May;23(5):203–5.
115. Velasco Rodriguez D, Alonso-Dominguez J-M, Sopeña-Corvinos M, Acedo N, Álvarez B, Guillen R, et al. Asociación entre hemoglobinopatía C heterocigota y alfa talasemia: frecuencia y expresión fenotípica. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.
116. González FA, Blázquez C, Ropero P, Briceño O, Alaez C, Polo M, et al. Asociación de hemoglobinopatía S y alfa-talasemia. Análisis de 45 casos. *Med Clin (Barc)*. 2005 May 21;124(19):726–9.
117. Fujisawa K, Yamashiro Y, Hattori Y, Ohha Y, Kajita T, Kageyama S, et al. Hb Higashitochigi (Hb Ht) [beta 24(B6) or beta 25(B7) glycine deleted]: a new unstable variant expressing cyanosis. *Hemoglobin*. 1993 Oct;17(5):467–73.
118. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:13.
119. de las Nieves MA, De Pablos JM, Garrido F. Alpha thalassaemia in a southern Spanish population. *British journal of Haematology*. 1989 Oct;73(2):282–3.
120. López-Escribano H, Vila Vidal M, Barceló Bennassar A, Riesco Prieto M, Ayllón Gatnau O. Cribado neonatal de anemia falciforme en la Comunidad Autónoma Balear. Estudio piloto anónimo no relacionado. *Anales de Pediatría*. 2009 May;70(5):429–33.
121. Ruano Raviña A, Jato Díaz M. Cribado neonatal de hemoglobinopatías. Servicio Galego de Saúde, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, avalia-t. Santiago de Compostela; 2004 May 11.
122. de Julián EC, Íñiguez ED, Soler MG, Leirado MA. Evaluación en el tercer año de implantación del cribado neonatal universal de anemia falciforme en la Comunidad de Madrid. *Anales de pediatría*. 2007;66(4):382-386.
123. Beutler E, Mitchell M. Special modifications of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood*. 1968 Nov;32(5):816–8.





