

# Algoritmos diagnósticos en Hemoglobinopatías, que estudios y cuando

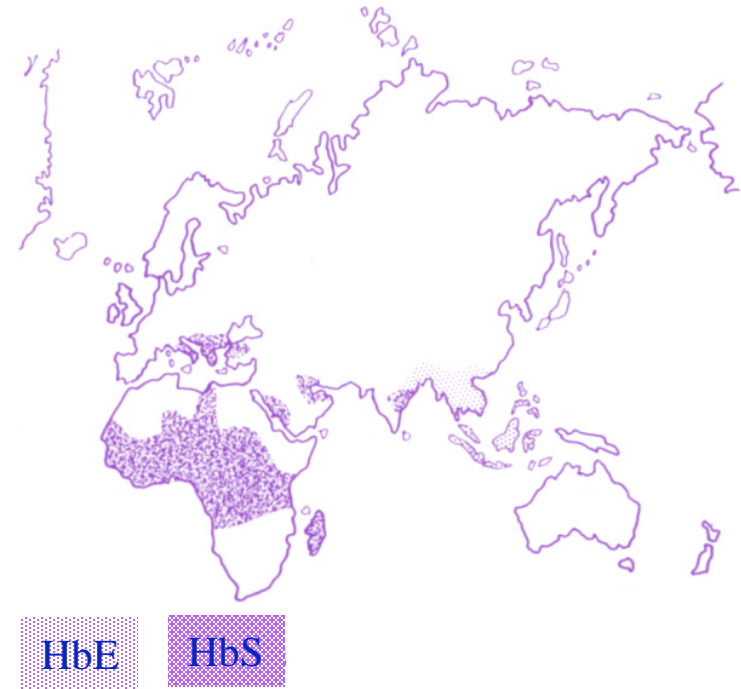
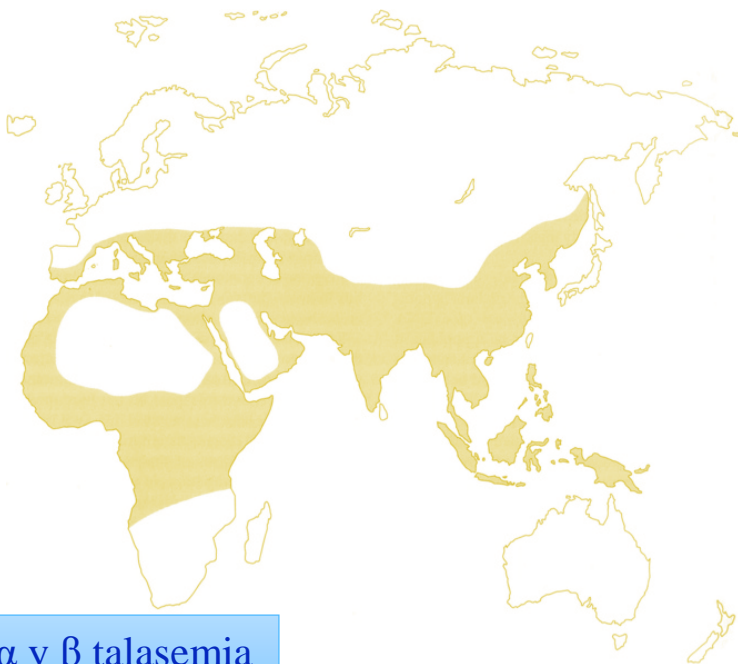
**Adoración Blanco Álvarez**

Unitat de Genètica Molecular Hematològica  
Hospital Universitari Vall d'Hebron  
adblanco@vhebron.net

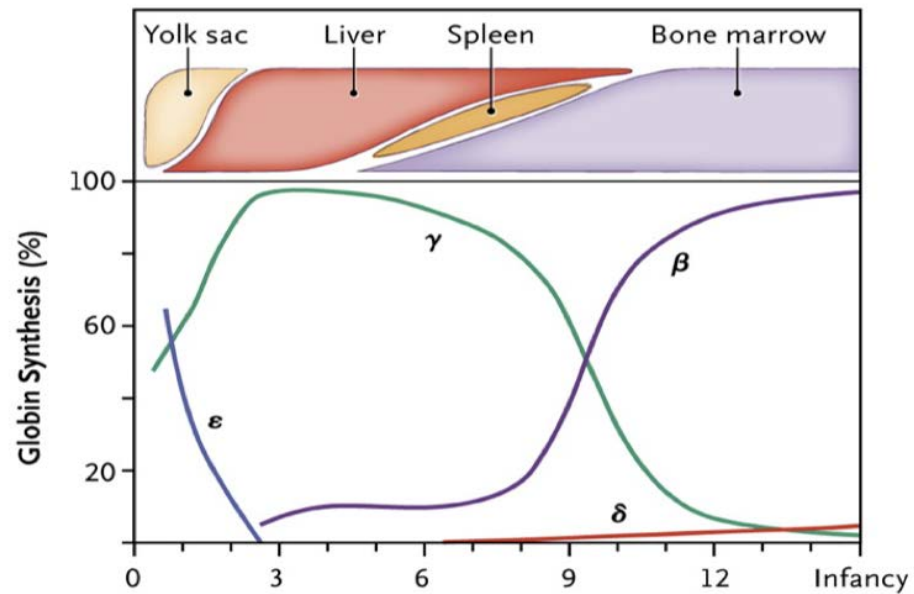
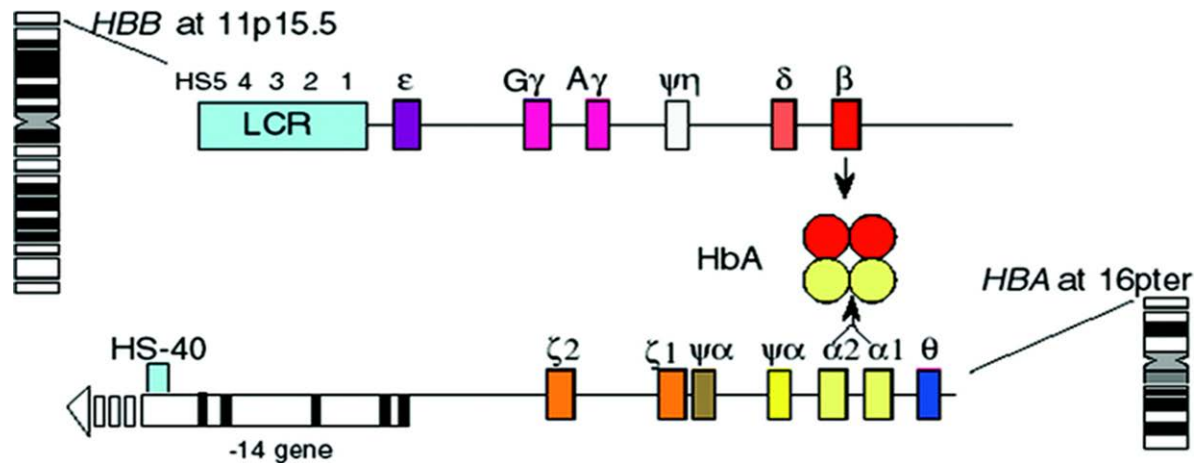
Noviembre de 2019



# EPIDEMIOLOGÍA DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS



# GENES DE LAS HEMOGLOBINAS



# DIAGNÓSTICO DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS: CUÁNDO

## SOSPECHA CLINICA Y/O HALLAZGO ANALÍTICO

- 1. Confirmar sospecha diagnóstica de:**
  - Enfermedad falciforme o  $\beta$ -talasemia (infartos oculares o óseos, osteomielitis,..)
  - Metahemoglobina (cianosis)
- 2. Exclusión de etiología poco frecuente (AHCD-)**
- 3. Explicar alteraciones hematológicas como :**
  - Anemia +/- microcitosis.
  - Poliglobulia
  - Hemoglobina en el límite bajo de la normalidad
- 4. Variantes de hemoglobina en estudio Hb A1c (Hb SC)**

# DIAGNÓSTICO DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS: CUÁNDO

## CRIBADO NEONATAL Y DE SANGRE DE CORDÓN

### CRIBADO NEONATAL EN CATALUÑA

Inicio : **01/01/2015**

Objetivo: **Enfermedad Falciforme** ( $\beta$ -talasemia mayor)

Metodología de cribado: Electroforésis Capilar (EC)

Metodología de confirmación: HPLC y molecular

Recién nacidos (RN) analizados : 319.472

**Cribados positivos: 102**

FS: 77 (4 S/beta<sup>0</sup>, 2 S/beta<sup>+</sup>)

FSC: 25



Fenotipo	Nº RN
FS	77
FSC	25
FAS	2165
FAC	549
FAD	87
FAE	103
FAX	285

- Otras hemoglobinopatía:
- Estudio de portadores



# DIAGNÓSTICO DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS: CUÁNDO

## ESTUDIO FAMILIAR Y CONSEJO GENÉTICO

### Hemoglobinopatías con indicación de consejo genético

Talasemia mayor/ intermedia severa

Síndromes falciformes

Talasemia Hb E

Síndrome de Hidropesía fetal por Hb Bart

- Hermanos
- Padres con deseo gestacional
- Diagnóstico preimplantacional
- Diagnóstico prenatal (Biopsia corial o amniocentésis)



# DIAGNÓSTICO DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS

HEMATIMETRIA

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

ESTUDIO MOLECULAR

ESTUDIO  
CONVENCIONAL DE Hb



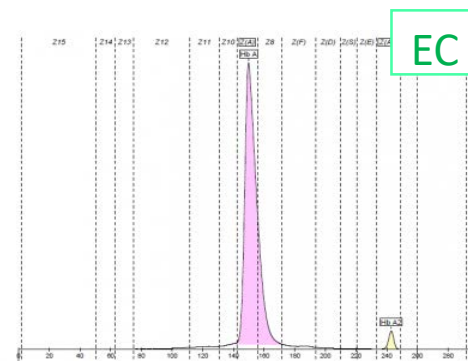
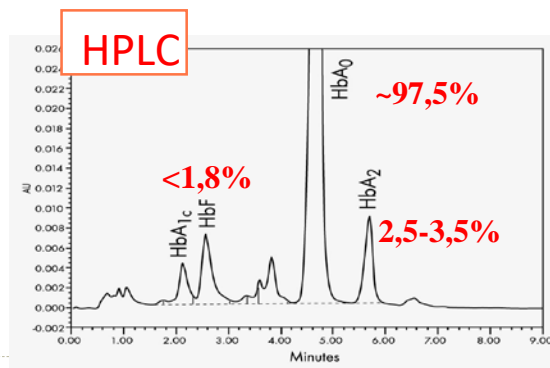
# DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS

## HEMATIMETRÍA

- Hb, VCM, ADE, MCH, Hematíes
- ADE discrimina entre portadores B-talasemia vs ferropenia
- RBC diferencia entre ferropenia vs talasemia
- ADE puede estar alterado en patologías cardíacas y hepática y puede alterar el potencial discriminatorio en casos que se combinan con ferropenia

## ESTUDIO CONVENCIONAL DE HEMOGLOBINAS

- Identificación de variantes y cuantificación por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforésis capilar (EC)
- Test de solubilidad, Cuerpos de Heinz , Estudio de afinidad por el oxígeno (P50), metabolismo del hierro



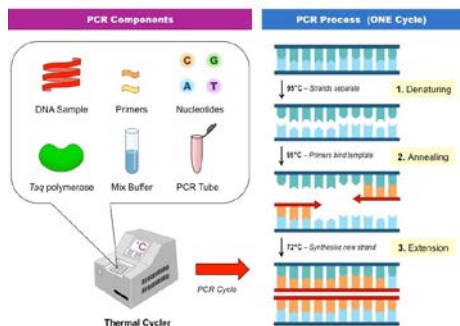


# ANÁLISIS DE PATRONES DE HEMOGLOBINAS

- **En los portadores de variantes de cadena  $\beta$  el porcentaje de la variante es proporcional al número de genes  $\alpha$** 
  - Hb S, Hb D-Punjab, HbC 35% , Hb E 25% sospecha  $\alpha$ -talasemia, confirmación molecular
- **Hb A<sub>2</sub> elevado es diagnóstico de  $\beta$ -talasemia, los valores borderline se deberían estudiar, y si fuese necesario realizar confirmación molecular.**
- **Valores bajos de Hb A<sub>2</sub> pueden indicar variantes de cadena  $\delta$ , confirmación molecular.**
- **Hb F por encima de 2% deberían ser estudiado.**
  - Portadores de  $\beta$ -talasemias o Hb S con valores elevados de Hb F indican la co-herencia de otras variantes de globinas (triplicación  $\alpha$ -globina con  $\beta$ -talasemia)
  - $\delta\beta$ -talasemia,  $\gamma\delta\beta$ -talasemia o Persistencia de hemoglobina fetal (HPFH), confirmación molecular

Variante HGVS nomenclatura	MCV fl	MCH pg	Hb A <sub>2</sub>
c.-151C>T	88,5 $\pm$ 7,8	30,1 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 1,0
c.-142C>T	83,0 $\pm$ 6,0	28,3 $\pm$ 2,0	3,5 $\pm$ 0,4
c.-18C>G	82,0 $\pm$ 9,2	27,1 $\pm$ 3,4	2,5 $\pm$ 1,4
c.316-7C>G	96,0 $\pm$ 4,0	30,3 $\pm$ 1,8	3,2 $\pm$ 0,2
c.*6C>G	88,3 $\pm$ 9,5	27,9 $\pm$ 2,2	2,7 $\pm$ 0,8

# ESTUDIO MOLECULAR HEMOGLOBINOPATÍAS



## Métodos de análisis de reordenamientos y variantes en número de copias de los genes de las globinas (Modificado de T Traeger-Synodinos et al. 2015)

MÉTODO	VENTAJAS	LIMITACIONES
<b>GAP-PCR</b>	Sencillo, rápido y económico	Detección dirigida <i>Alele drop-out</i> (no aconsejado para diagnóstico prenatal)
<b>MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)</b>	Sencillo y rápido Puede detectar varias variantes en número copias dentro del ensayo	SNPs pueden interferir Crítica la calidad y cantidad del DNA.
<b>Micro-arrays</b>	Alto rendimiento en número de muestras Detecta variantes en número de copias	Caracterización imprecisa de la delección/inserción
<b>Souther blotting</b>	Detecta variantes en número de copias	Procesamiento técnico largo y complicado.

## Métodos de análisis de variantes puntuales de los genes de las globinas (Modificado de T Traeger-Synodinos et al. 2015)

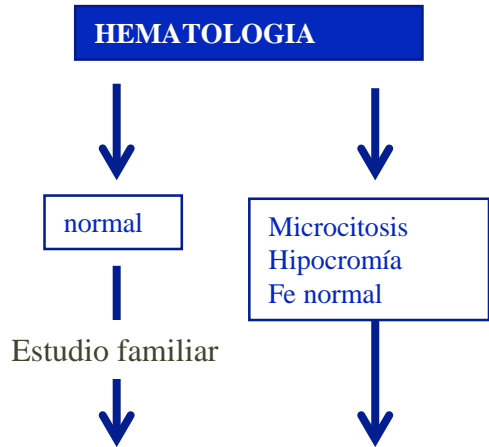
MÉTODO	VENTAJAS	LIMITACIONES
<b>PCR y hibridación inversa</b>	Detección de varias variantes en un ensayo Sencillo y rápido	Difícil de estandarizar y validar <i>in-house</i> Kits <i>comerciales</i>
<b>ARMS-PCR</b>	Sencillo, rápido y económico Puede detectar varias variantes en un ensayo	Detección dirigida
<b>RE-PCR</b>	Sencillo y rápido	Detección dirigida
<b>PCR a tiempo real</b>	Detección cualitativa y cuantitativa Rápida No post-PCR	Detección dirigida Caro
<b>DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)</b>	Cribado de muestras a escala media	Requiere caracterización definitiva con otro método
<b>HRMA (High resolution melting analysis)</b>	Sencillo (una vez estandarizado) Rápido	Requiere caracterización definitiva con otro método Caro
<b>Secuenciación Sanger</b>	Método genérico para variantes puntuales Económico	Técnicamente complejo (procesamiento y análisis)
<b>Pirosecuenciación</b>	Detección cuantitativa Rápido y sensible	Secuencias de DNA de 20-50 nucleótidos

# Estudio molecular Hemoglobinopatías: CUÁNDO

- ✘ Diagnóstico en  $\alpha$ -talasemia
- ✘ Hemoglobinopatías compuestas
- ✘ Fenotipos ambiguos
- ✘ Discrepancia genotipo-fenotipo
- ✘ Consejo genético
- ✘ Estudio prenatal

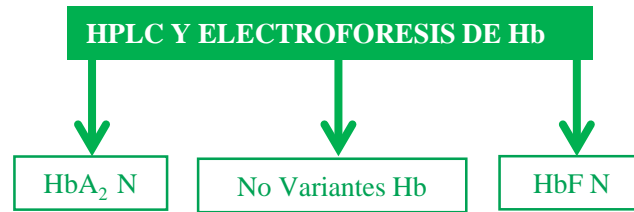


# ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LAS $\alpha$ -TALASEMIAS

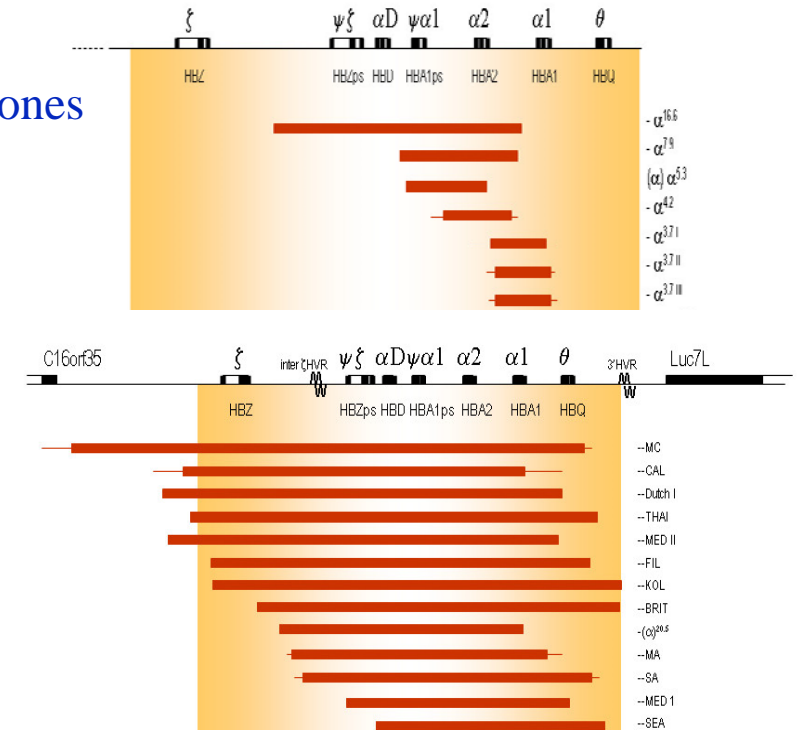


**PCR E HIBRIDACIÓN INVERSA:**  
 7 mutaciones deletacionales  
 13 mutaciones puntuales  
 1 triplicación alfa

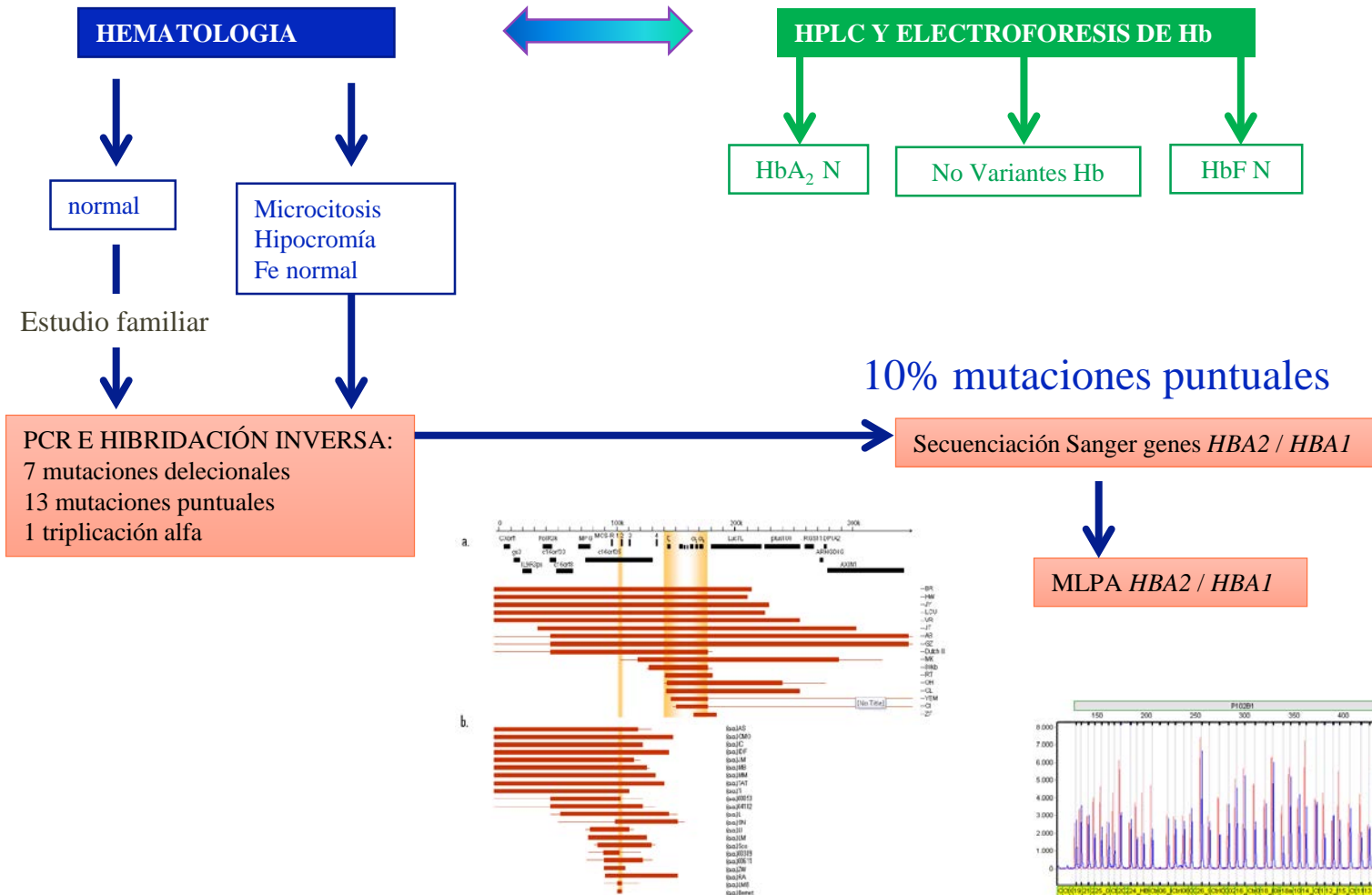
Position	Mutation
- 3.7	Single gene deletion
- 4.2	Single gene deletion
- 20.5 kb	Double gene deletion
— MED	Double gene deletion
— SEA	Double gene deletion
— THAI	Double gene deletion
— FIL	Double gene deletion
$\alpha 1$ cd 14	G>A
$\alpha 1$ cd 59	G>A Hb Adana
anti-3.7	Gene triplication
$\alpha 2$ Init cd	[T>C]
$\alpha 2$ cd 19	[-G]
$\alpha$ IVS 1	5nt
$\alpha 2$ cd 59	[G>A]
$\alpha 2$ cd 125	[T>C] (Hb Quong Sze)
$\alpha 2$ cd 142	[T>C] (Hb Constant Spring)
$\alpha 2$ cd 142	[T>A] (Hb Icaria)
$\alpha 2$ cd 142	[A>T] (Hb Pakse)
$\alpha 2$ cd 142	[A>C] (Hb Koya Dora)
$\alpha 2$ poly A-1	[AATAAA>AATAAG]
$\alpha 2$ poly A-1	[AATAAA>AATGAA]



90% deletiones

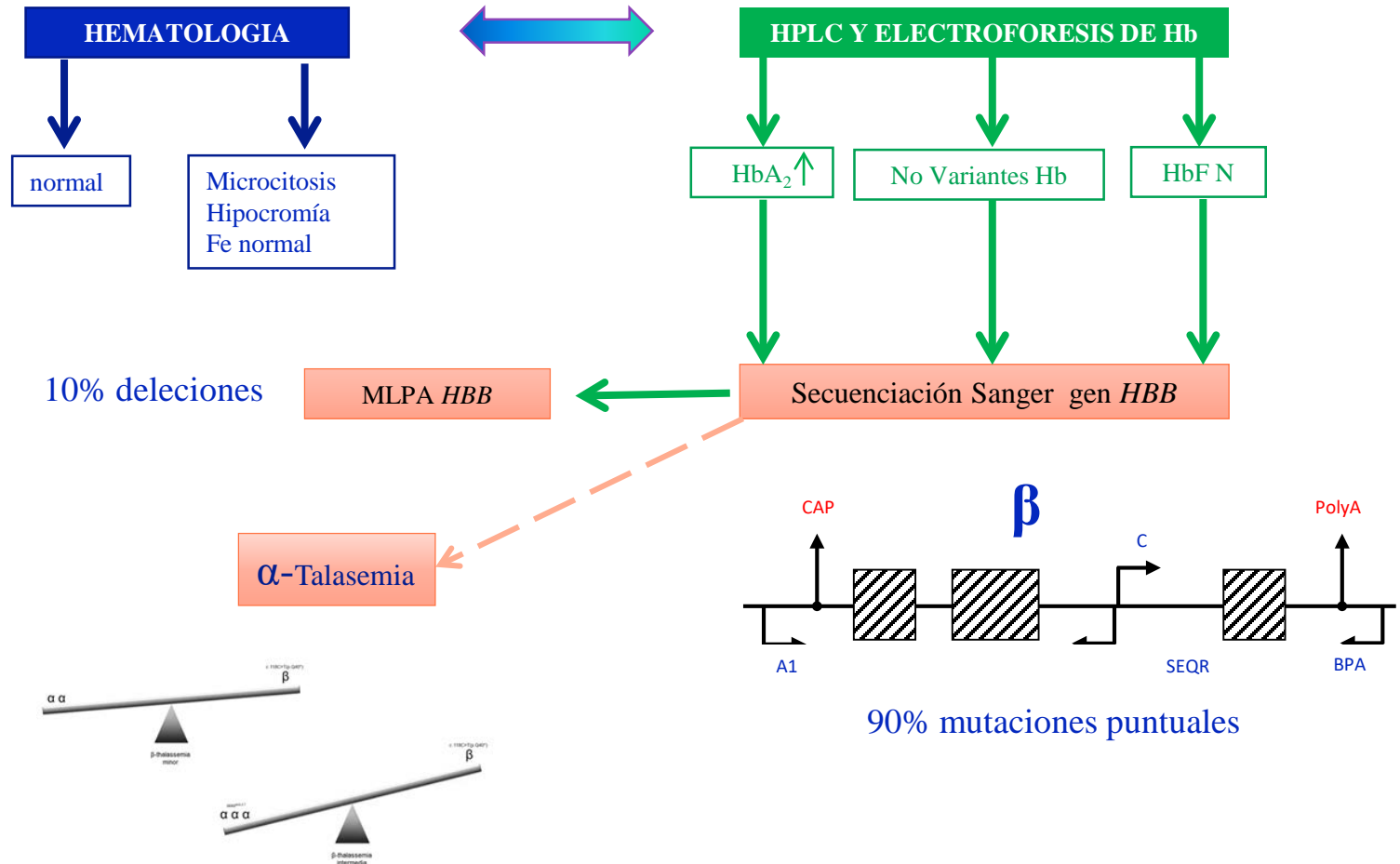


# ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LAS $\alpha$ -TALASEMIAS

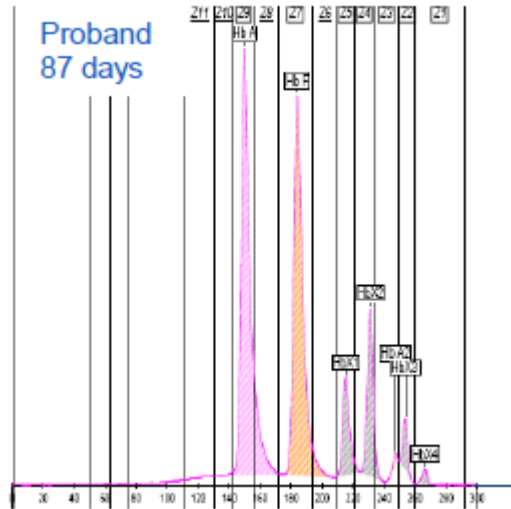


Harteveld an Higgs Orphanet Journal of rare diseases 2010, 5:13

# ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LAS $\beta$ -TALASEMIAS



# CASO 1: HEMOGLOBINOPATIA COMPLEJA



Fraction	%	Hb type
Hb A	41,4	HbA ( $\alpha_2\beta_2$ )
Hb F	37,9	HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ )+HbA Q-Thailand
HbX1	7,1	HbF Q-Thailand ( $\alpha^2\gamma_2$ )
HbX2	10,0	HbE ( $\alpha_2\beta^E_2$ )
Hb A2	0,5	HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ )
HbX3	2,3	HbE Q-Thailand ( $\alpha^2\beta^E_2$ )
HbX4	0,8	HbA2 Q-Thailand ( $\alpha^2\delta_2$ )

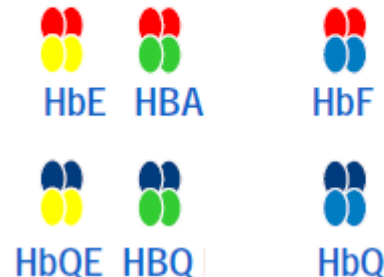
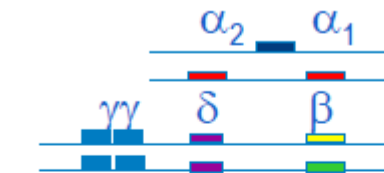
**Niño detectado en el cribado neonatal**

El estudio molecular revela 3 mutaciones:

Hb Q-Thailand ( $\alpha$ -cd74 Asp>His)

Delección  $-\alpha^{4.2}$

Hb E ( $\beta$ cd26Glu>Lys)



# CASO 2: ESTUDIO FAMILIAR DE $\alpha$ -TALASEMIA

Solicitan estudio familia de un padre y dos hijos con sospecha de  $\alpha$ -talasemia:

- El padre (35 a) Hb 15,7g/dL , VCM 81fL, HCM 27pg, Hb F y Hb A2 normal. El estudio del metabolismo era normal.
- Ambos hermanos (6 a y 3 a) presentaban anemia con microcitosis, sin ferropenia y Hb F y Hb A2 normales (Hb 12,8g/dL y 12,6g/dL, VCM 69 fLy 68fL, HCM 23pg ambos).

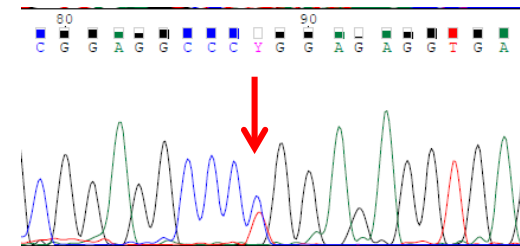


**PADRE:** Triplicación  $\alpha$

**HIJOS:** No presentan alteraciones



Sospecha de mutaciones puntuales *HBA2/HBA1*



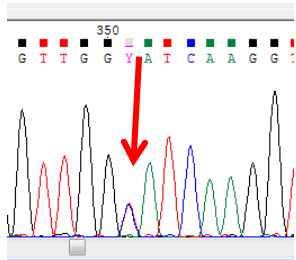
**HEMOGLOBINA AGRINIO**  
Hemoglobina hiperinestable

**PADRE:** Triplicación  $\alpha$  htz + Hb Agrinio htz  
**HIJOS:** Hb Agrinio htz (*HBA2:C92C>T*)

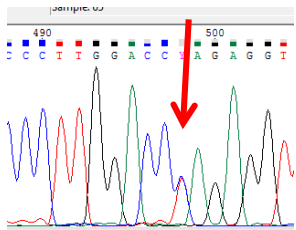


# CASO 3: ESTUDIO PRENATAL

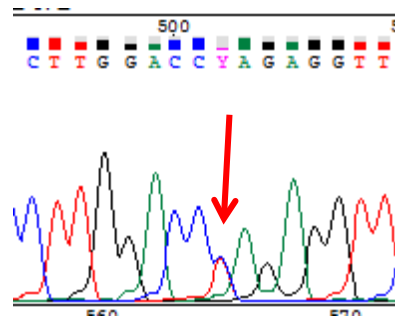
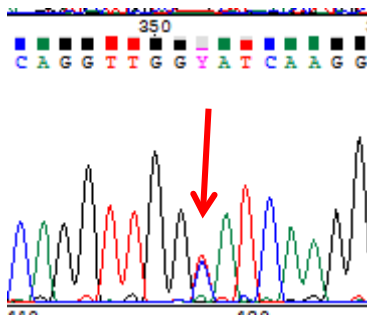
**Estudio prenatal de beta-talasemia de pareja de origen español referido de otro centro.**



Madre afectada de beta-talasemia, portadora de la mutación NM\_000518.4: **c.92+6T>C**.  
IVS-I-6 (T->C); the Portuguese, beta<sup>+</sup> talasemia

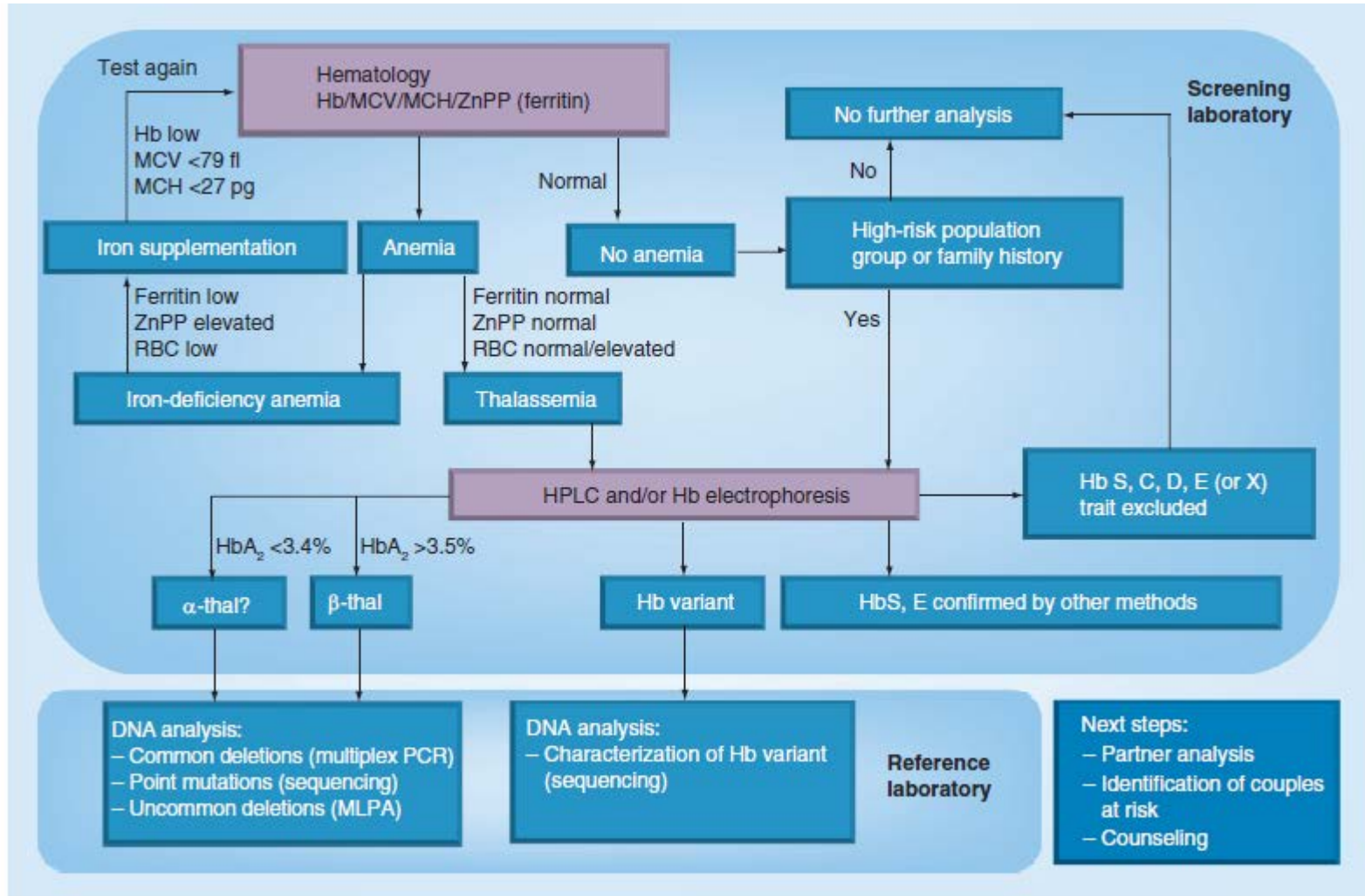


Padre afecto de beta-talasemia, portador de la mutación NM\_000518.4: **c.118C>T**.  
Codon 39, beta<sup>0</sup> talasemia



**El estudio de la vellosidad corial presenta  
ambas mutaciones parentales**  
NM\_000518.4: c.92+6T>C, NM\_000518.4: c.118C>T

Talasemia intermedia: beta<sup>0</sup> / beta<sup>+</sup>

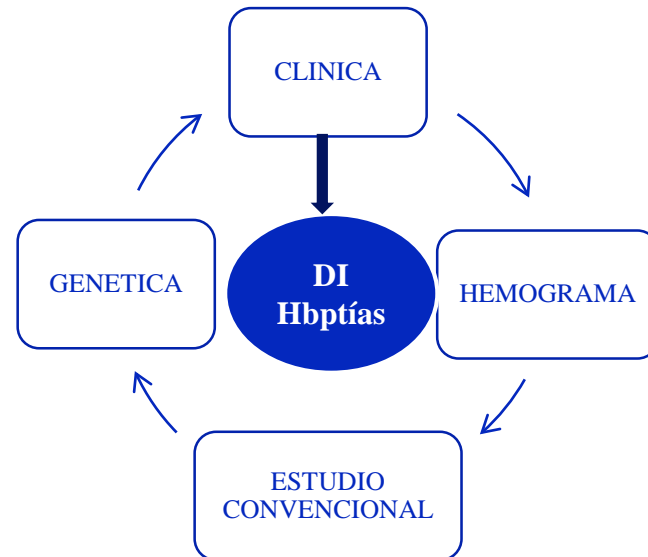


Jan Traeger-Synodinos & Cornelis L Hartevelde. *Biomarkers Med.* (2014) 8(1), 119–131

# CONCLUSIONES

- El diagnóstico de una variante de hemoglobina debe confirmarse por una técnica alternativa apropiada.
- Los pacientes con resultados ambiguos en el estudio de hemoglobinas o fenotipos inusuales son candidatos para el estudio del ADN.
- El estudio familiar y consejo genético debe realizarse en las hemoglobinopatías graves (Enfermedad falciforme, talasemia mayor e Hidropsía fetal por Hb Bart)

**El estudio molecular debe de ser consistente con los resultados hematológicos, y el fenotipo clínico.**



Unitat de Genètica Molecular Hematològica

Adoración Blanco

Bárbara Tazón

Unitat de Eritropatologia

David Beneitez

Ana Ortuño

Unitat de Hematimetria

Mayda Navarrete

Isabel Montserrat

**GRACIAS!!**