

# TALASSEMIA $\beta$ HETEROZIGOTICA Com Triplicação do Gene $\alpha$ Globínico

M<sup>a</sup> Conceição CONSTANÇO, Paula ROCHA, Celeste BENTO, Helena M. SILVA

## RESUMO

Descreve-se um caso de  $\beta$ -Talassemia Intermédia como resultado da interacção de heterozigotia para mutação IVSI-110 G>A do gene  $\beta$ - globínico e o alelo  $\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$ .

A doente, uma mulher de 19 anos de idade, de etnia cigana, portuguesa apresentava anemia crónica ligeira, subicterícia e esplenomegalia apesar da análise inicial ter revelado apenas ter traço  $\beta$ -talassemico. O estudo posterior do gene  $\alpha$ -globínico revelou heterozigotia para a triplicação do gene com presença do alelo  $\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$ .

O presente caso traz de novo à discussão a complexidade das interacções genéticas que estão subjacentes a um fenótipo de talassemia intermédia e realça a importância de se procurar outra etiologia em indivíduos com  $\beta$ -Talassemia *Minor* de fenótipo pouco comum.

## SUMMARY

### HETEROZYGOUS $\beta$ THALASSEMIA With Triplication of the $\alpha$ Globin Gene

We describe a case in which the interaction of heterozygosis for the mutation Beta IVSI - 110 G> A and the  $\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$  allele was the likely cause of the clinical occurrence of thalassaemia intermedia. The proposita, a 19 years old, gypsy, Portuguese woman presented with chronic mild anemia, jaundice and splenomegaly in spite of having the  $\beta$ -thalassaemia trait. The analysis of the  $\alpha$ -globin gene revealed heterozygosis for  $\alpha$ -globin gene triplication with the presence of allele  $\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$ .

This case brings again to discussion the complexity of genetic interactions underlying a phenotype of thalassaemia intermedia and stresses the importance of looking for another cause in individuals with beta-Thalassaemia minor uncommon phenotype.

M.C.C., P.R., H.M.S.: Hospital de Dia Hemato-Oncologia. Hospital S. Teotónio. Viseu

C.B.: Departamento de Hematologia. Cento Hospitalar de Coimbra. Coimbra

© 2011 CELOM

## INTRODUÇÃO

Assiste-se durante a eritropoiese a um equilíbrio delicado entre a produção das cadeias de  $\alpha$  e  $\beta$  globina. A  $\beta$ -talassemia ocorre quando existe uma produção deficiente de cadeias  $\beta$  estruturalmente normais. A produção de cadeias  $\alpha$  mantém-se, contudo, dentro da normalidade resultando num excesso de cadeias livres que precipitam nos precursores eritroides danificando a membrana celular e provocando destruição celular prematura com eritropoiese ineficaz subjacente aos quadros de anemia.

A gravidade do quadro clínico correlaciona-se, assim, com o grau de desequilíbrio existente entre a produção de cadeias alfa e não-alfa e a presença de factores que aumentam o desequilíbrio entre as cadeias, como a coexistência da triplicação do gene  $\alpha$ -globínico, está associada ao agravamento do fenótipo em doentes com traço  $\beta$  talassemico ou  $\beta$ -talassemia intermédia<sup>1</sup>. Porém, nem sempre o efeito da triplicação do gene  $\alpha$  globínico sobre a expressão fenotípica é uniforme estando descritos casos de doentes que partilham as mesmas alterações genéticas e apresentam fenótipos distintos<sup>2,3</sup>. Neste contexto os estudo familiares, genéticos e moleculares têm-se tornado importantes por permitirem compreender melhor os factores associados à diversidade fenotípica das  $\beta$ -talassemias. Apesar da capacidade de se definirem precisamente as mutações da cadeia  $\beta$  e de se identificarem casos de gravidade intermédia, a previsão dos seus fenótipos, com interesse principalmente no diagnóstico pré-natal, permanece problemática. Dada a existência de factores moduladores genéticos e ambientais, por vezes raros ou desconhecidos, torna-se ocasionalmente difícil prever a clínica através do genótipo<sup>1,4</sup>.

## CASO CLÍNICO

Doente do sexo feminino, 19 anos de idade, de nacionalidade portuguesa e de etnia cigana, fruto de um casamento não consanguíneo, foi referenciada à Consulta de Hematologia pelo Médico Assistente por anemia crónica moderada, microcítica e hipocrómica sem resposta ao tratamento com ácido fólico e ferro. Não eram referidos antecedentes de relevo. Ao exame objectivo apresentava escleróticas subictéricas e esplenomegalia com 18 cm de diâmetro cefalo-caudal determinado por ecografia, sem hepatomegalia. Dos exames complementares efectuados destaca-se o hemograma com valores de hemoglobina de 10,2 gr/dl, VGM 64,1 fl, CHCM 30,3 gr/dl e ligeira reticulocitose. O esfregaço de sangue periférico mostrava hipocromia e microcitose com presença de ponteados basófilos, alguns eliptocitos, raros esferocitos e esquizocitos. Doseamentos de ferro, ferritina e ácido fólico normais e vitamina B12 diminuída na sequência de gastrite crónica com atrofia associada à infecção por *H. Pylori*. Foi efectuada erradicação com normalização dos doseamentos vitamínicos. Valores de

bilirrubina total ligeiramente aumentados com predomínio da fracção indirecta, LDH ligeiramente aumentada e Teste de Coombs directo negativo. O estudo de hemoglobinas, por HPLC, revelou níveis de Hb A de 92%, Hb A2 de 4,8% e HbF de 2,2%. Foi efectuada também Focagem Isoelectrica de Hemoglobinas tendo mostrado um perfil AA2.

Posteriormente foi também admitida para estudo na consulta uma irmã, 32 anos, com quadro clínico semelhante. Objectivamente sem outras alterações além da esplenomegalia, com 16 cm de diâmetro cefalo-caudal determinados ecograficamente. No estudo analítico com valores de Hemoglobina de 11,1 gr/dl, VGM 65,3 fl e CHCM 30,8 gr/dl. Sem défices de factores hemáticos, LDH 431 U/L e bilirrubina Total 1 mg/dl. O esfregaço de sangue periférico mostrava microcitose com hipocromia e ponteados basófilos. O estudo de hemoglobinas revelou níveis de HbA 95,3%, HbA2 de 4,2% e HbF de 0,5%.

Foi efectuada análise molecular por metodologia PCR do gene  $\beta$ -globínico de ambas as irmãs detectando-se a mutação IVSI-110 G>A em heterozigotia. Os procedimentos diagnósticos evidenciavam um quadro de  $\beta$  Talassemia *minor*, diagnóstico que apesar de tudo não justificava totalmente a apresentação clínica da doente avaliada inicialmente, com esplenomegalia e hiperbilirrubinemia indirecta, pelo que se prosseguiu o estudo.

Foi excluída patologia eritrocitária por defeitos de proteínas de membrana tendo-se efectuado o Crioteste e electroforese das proteínas de membrana em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) que não revelaram alterações. A sequenciação posterior do gene  $\alpha$ -globínico mostrou a existência de triplicação alfa<sup>anti3,7</sup> sendo definido o diagnóstico de talassemia intermédia por associação de  $\beta$ -Talassemia *Minor* com triplicação  $\alpha$ -globínica.

Foi também estudada a mãe de ambas as doentes não tendo sido detectada qualquer alteração. Dos três filhos da segunda irmã apenas um deles revelou a herança conjunta das duas mutações descritas comportando-se como um portador silencioso. Sem alterações ao exame objectivo e analiticamente com valores de hemograma de Hgb 11,5 gr/dl, VGM 59,3 fl, CHCM 31,7 gr/dl, estudo electroforético das hemoglobinas com Hgb A 94%, HbA2 5,1% e Hb F 0,9% e sem outras alterações. Os outros dois irmãos são portadores da triplicação  $\alpha$  e sem qualquer alteração clínica ou analítica. Todos os outros familiares recusaram estudo.

## DISCUSSÃO

A talassemia intermédia compreende um amplo espectro de fenótipos clínicos que variam na gravidade desde o estado de portador silencioso aos doentes com talassemia major. Embora a definição dos dois extremos seja fácil, caracterizar as formas intermédias pode ser problemático. Mesmo no presente caso o diagnóstico de talassemia intermédia é discutível atendendo a que o valor da hemoglobina não é

inferior a 10 g/dl em ambas as irmãs. Valorizaram-se, contudo, outros achados cardinais da doente observada inicialmente na consulta, designadamente o aumento dos níveis de bilirrubina não conjugada com subicterícia e a esplenomegalia não atribuíveis a outras causas e justificáveis pela combinação genética de que a doente é portadora. Os doentes com traço talassemico são, de um modo geral, assintomáticos apresentando apenas uma ligeira anemia, com hipocromia e microcitose, no contexto de outras alterações outras causas devem ser investigadas. O sobrinho também herdeiro das mesmas alterações genéticas, não evidenciou qualquer manifestação clínica sendo indistinguível de um doente com  $\beta$ -Talassemia *minor*. Parte da heterogeneidade fenotípica verificada nesta família, já descrita noutros casos publicados, encontra-se dependente de mecanismos moleculares, alguns já mencionados na literatura mas ainda não totalmente esclarecidos<sup>1,4,5</sup>.

Na talassemia, a síntese reduzida de cadeias é devida a mutações suaves, designadas  $\beta^+$  ou  $\alpha^+$ , sendo a ausência de síntese devida a mutações  $\beta^0$  ou  $\alpha^0$ . As mutações descritas nos genes globínico  $\beta$  são sobretudo mutações pontuais e nos genes  $\alpha$  são essencialmente grandes deleções. Estudos publicados sobre as mutações  $\beta$ -talassémicas na população portuguesa demonstram ser quatro as mutações mais frequentes, nomeadamente: codão 39 (C > T), IVSI-1 (G > A), IVSI-6 (T > C) e IVSI-110 (G > A)<sup>6,7</sup> (Figura 1).

O conhecimento da prevalência das diferentes mutações é crucial para direccionar o diagnóstico pré-natal, por análise de DNA, em cada população. Não é por isso surpreendente nem nova a mutação  $\beta$ -globínica que se apresenta. A associação com a triplicação do gene  $\alpha$ -globínico torna no entanto este caso incomum permitindo pensar, dada a diversidade de factores moduladores, que o fenótipo nem sempre é o que se conhece do genótipo possuindo nuances que conduzem por vezes à procura de outros diagnósticos<sup>1</sup>.

A  $\beta$ -talassemia intermédia surge normalmente devido a homozigotia ou heterozigotia composta para uma mutação  $\beta^+$ . A primeira descrição refere-se a um caso português com homozigotia para a mutação IVSI 6 T>C e fenótipo associado

de talassemia intermédia<sup>8</sup>. Em determinadas situações mesmo a associação de mutações que inactivam completamente ambos os genes  $\beta$  cursa com um fenótipo menos severo sendo exemplo disso os quadros em que coexistem a  $\beta$  e  $\alpha$ -talassemia<sup>9</sup>. Estão, no entanto, descritos outros genótipos, cuja frequência não é totalmente conhecida, de heterozigotos simples para o alelo  $\beta$ -tal, com fenótipo de talassemia intermédia. Subentende-se, portanto, a existência de outros factores que agravando o grau de desequilíbrio entre as cadeias globínicas ultrapassem o limiar de um estado clinicamente assintomático e atinjam o de talassemia intermédia<sup>4,9</sup>. Numa parte dos casos tal pode ser devido à presença de um gene  $\alpha$  adicional.

Este tipo de associação com genes  $\alpha$  adicionais encontra-se descrita desde 1983<sup>10</sup>. No estudo cuja população era constituída por indivíduos provenientes da Sardenha e da Índia, o fenótipo resultante da interacção entre as duas anomalias genéticas era clinicamente indistinguível de uma  $\beta$ -Talassemia *minor*. Posteriormente, Sampietro et al associam esta mesma combinação genética a um fenótipo de talassemia intermédia<sup>11</sup>. Mais recentemente num estudo de Sollaino et al<sup>5</sup> é descrito um grupo de doentes descendentes de quatro famílias originárias da Sardenha heterozigotos simples para o alelo  $\beta$ -tal e com fenótipo variável de talassemia intermedia. De facto, estes doentes, para além da heterozigotia para a  $\beta$ -talassemia têm uma duplicação do *locus* da globina  $\alpha$  e alguns deles apresentam também  $\alpha$  talassemia. O resultado final é a presença adicional de um ou mais genes  $\alpha$ -globínicos que provocam um desequilíbrio mais marcado entre a síntese das cadeias  $\alpha/\beta$  em comparação aos simples portadores de traço talassemico e explicam alguma da variabilidade fenotípica. A gravidade do fenótipo clínico parece assim estar parcialmente relacionada com o número de genes da globina  $\alpha$  e com o tipo de interacção com a  $\alpha$  talassemia.

Contudo, além de depender do excesso das cadeias  $\alpha$ -globínicas e do alelo B tal<sup>+</sup> herdado, esta diferente expressão fenotípica, observada mesmo em membros da mesma família com mutações idênticas, permanece muitas vezes por explicar<sup>2</sup>. Na realidade será de considerar que o equilíbrio delicado entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  possa estar dependente de outros mecanismos não totalmente esclarecidos como a eficácia da proteólise nos precursores eritroides, os níveis das chaperonas das  $\alpha$ -globinas, ou a existência de polimorfismos próprios de cada população que conferem uma capacidade de aumentar a síntese de globina  $\gamma$  em resposta ao stress hematopoiético, substituindo a globina  $\beta$  em falta e gerando assim hemoglobinas mais funcionais ao mesmo tempo que diminuem as inclusões da globina  $\alpha$ <sup>4</sup>.

## CONCLUSÃO

O presente caso traz de novo à discussão a complexidade das interacções genéticas subjacentes

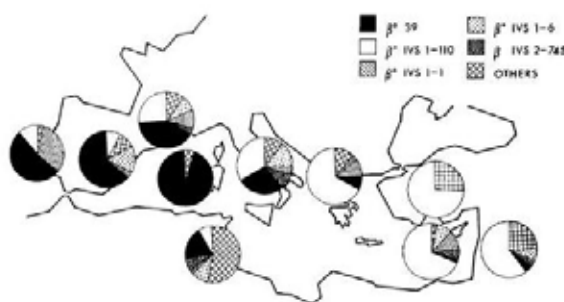


Fig. 1 - Mutações da  $\beta$ -talassemia em populações mediterrânicas. In Cao A, M Gossenes, M Pirastu:  $\beta$ -thalassemia mutations in Mediterranean populations. Brit J Hematol 1989;71

Quadro 1 - Combinações genotípicas na talassemia Intermédia

1. Homozigotia ou Heterozigotia composta para mutações ligeiras
2. Homozigotia ou Heterozigotia para mutações severas com:  
 $\alpha$ -Talassemia  
HPFH Heterocelular
3. Heterozigotia composta para  $\beta$ -talassemia e:  
 $\delta\beta$  Talassemia  
HPFH delectiva ou não
4. Heterozigotia para  $\beta$ -Talassemia e Triplicação do locus  $\alpha$ -globinico
5. Heterozigotia para uma forma dominante de  $\beta$ -Talassemia

In Camaschela C, Cappellini MD, *Thalassemia Intermedia, Haematologica*, 1995, 80

ao fenótipo de talassemia intermédia e apesar de ser aparentemente baixa a frequência da associação da triplicação  $\alpha$  com  $\beta$ -Talassemia heterozigótica, foi estimado que a sua presença justificava cerca de 40% dos casos de talassemia intermédia nos quais apenas se havia detectado previamente uma única mutação  $\beta$ <sup>12</sup>. Por isso, apesar da presença da triplicação  $\alpha$  sem associação a  $\beta$  tal<sup>+</sup> não ter significado clínico realça-se a necessidade de ser considerada a sua existência em doentes com  $\beta$ -talassemia heterozigotos simples cujo fenótipo não é o esperado dado o seu potencial negativo de virem a desenvolver necessidades transfusionais ou esplenomegalia de relevância clínica<sup>2,3,5</sup>. Os indivíduos com  $\beta$ -Talassemia *minor* são saudáveis e assintomáticos, quando é referida alguma sintomatologia outra etiologia deve ser procurada.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

**BIBLIOGRAFIA**

1. TAHER A et al: Thalassemia intermedia: Revisited, *Blood Cells. Molecules Dis* 2006;37:12-20
2. CAMASCHELAC, Kattamis AC, Petroni D et al: Different Hematological phenotypes caused by the interaction of triplicated  $\alpha$ -globin genes and heterozygous  $\beta$ -thalassemia. *Am J Hematol* 1997;55:83-88
3. KIMURA EM, GRIGNOLI CR, PINHEIRO VR, COSTA FF, SONATI MF: Thalassemia intermedia as a result of heterozygosity for beta 0 -thalassemia and alpha alpha anti-3,7 genotype in a Brazilian patient. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(6):699-701. Epub 2003 Jun 3 [Acedido em 20 de Dezembro de 2009]
4. THEIN SL: Genetic insights into the clinical diversity of B thalassaemia. *Br J Haematol* 2004;124:264-274
5. SOLLAINO MC et al: Association of alpha globin gene quadruplication and heterozygous beta thalassaemia in patients with thalassaemia intermedia. *Haematologica* 2009;94(10):1445-8
6. FAUSTINO P et al: The Geographic Pattern of b-thalassaemia mutations in the portuguese population. *Br J Haematol* 1999;107:903-904
7. CAO A, GOSSENE M, PIRASTU M:  $\beta$ -thalassaemia mutations in Mediterranean populations. *Br J Hematol* 1989;71:309-312
8. TAMAGNINI GP, LOPES MC, CASTANHEIRAME, WAINSCOAT JS: B thalassaemia Portuguese Type: Clinical haematological and molecular studies of a newly defined form of  $\beta$ -Talassemia. *Br J Haematol* 1983;54:189-200
9. CAMASCHELA C, Cappellini MD: Thalassemia Intermedia. *Haematologica* 1995;80:58-68
10. KANAVAKIS et al: The triplicated alpha gene locus and  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 1983;54:201-207
11. SAMPIETRO M, CAZZOLA M, CAPPELLINI MD, FIORELLI G: The triplicated alpha-gene locus and heterozygous  $\beta$ -thalassaemia: a case of thalassaemia intermedia, *Br J Hematol* 1983;55(4):709-710
12. CAMASCHELLA C, Mazza U, Roetto A et al: Genetic Interactions in thalassaemia intermedia. *Am J Hematol* 1995;48:82-87