

Frecuencia de mutaciones de β -Talasemia, en una población con pseudopoliglobulia y microcitosis de La Rioja

Maricel Lozdan¹, Sergio N. Rearte², Antonella Milanesio³ y Ana M. Cabanillas⁴

^{1,2,3} Dpto. Cs. Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de La Rioja, Argentina.

⁴Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Resumen

La hemoglobina es la proteína casi exclusivamente presente en los glóbulos rojos que permite el transporte de oxígeno desde los pulmones a todas los tejidos del organismo. Las mutaciones en la hemoglobina pueden llevar a una disminución de la síntesis de la cadena de globina conocido con el nombre genérico de talasemias. Aún es muy escasa la información sobre la frecuencia de talasémicos en la población argentina, según las regiones geográficas y aún más escasa es la información en relación a la proporción de talasémicos mal o subdiagnosticados.

Este estudio se diseñó para obtener información acerca de las mutaciones de β -talasemia más frecuentes en una población con características talasémicas, con o sin diagnóstico previo de la misma, en la ciudad de La Rioja, Argentina. Seleccionada entre julio y diciembre de 2012 entre los pacientes que asistieron al laboratorio privado Cortes Viñes. Se estudiaron las seis mutaciones más frecuentes de acuerdo al origen étnico de la población: CD39, IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, IVSII-1 e IVSII-745, utilizando PCR-ARMS múltiple. En 60 individuos estudiados identificamos 14 portadores de alguna mutación (23,3%). 7 pacientes con CD39 (11,7%), seis con IVSI-1(10%) y uno con IVSI-6 (1,7%). La frecuencia encontrada difiere ligeramente a las reportadas en las ciudades del centro del país, revelando un espectro diferente de migración en las provincias del noroeste.

La información obtenida permite aproximarse al conocimiento de las β -talasemias en La Rioja, para contribuir a su diagnóstico, al asesoramiento o consejo genético para parejas en riesgo y al diagnóstico prenatal.

Palabras claves: β -talasemia, PCR-ARMS, La Rioja, anemias.

Abstract

Hemoglobin is the protein highly expressed (more than 90%) in blood red cells which is in charge of transporting oxygen from the lungs to the body tissues.

Mutations in hemoglobin can result in a lower synthesis in globin chains, also known as thalassemia. There still is a lack of information about the frequency of thalassemic patients in argentine population as well as the proportion of underdiagnosed patients.

This study was designed to obtain biochemical and medical information about the more frequent mutations found in a sample of inhabitants of La Rioja, Argentina. The main inclusion feature was that the patients show some biochemical parameters (such as microcytosis) compatible with thalassemia, independently of an already performed diagnostic. Patients were selected among those concurring to the private laboratory Cortes Viñes in La Rioja, between July and December 2012.

The six most often mutations, in regard to the ethnic group of population, were studied by multiplex PCR-ARMS: CD39, IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, IVSII-1 and IVSII-745. We were able to identify 14 carriers of any mutations (23,3%), 7 patients with CD39 (11,7%), six patients with IVSI-1(10%) and only one with IVSI-6 (1,7%) over a total of 60 patients. The frequency of mutations in our study differs lightly to those reported in cities located at the center of Argentina, suggesting a different spectrum of migration in northwest states.

This study allows to increase the knowledge of β -thalassemia in La Rioja, to contribute to a better and more precise diagnostic that includes genetic counseling to risk couples.

Keywords— β -thalassemia, PCR-ARMS, La Rioja, anemias.

INTRODUCCION

Las hemoglobinas son el mayor pigmento transportador de oxígeno del organismo y se encuentran empaquetadas en el hematíe o glóbulo rojo. El tetrámero hemoglobina consiste de dos pares de cadenas polipeptídicas de globinas diferentes, cada una asociada a un grupo hemo. La α globina, junto a la β -globina, constituyen la Hb A1 que es la forma más común de Hb en los adultos (96-98%). Las mutaciones en la hemoglobina pueden llevar no solo a la síntesis de una Hb estructuralmente anormal, conocido como hemoglobinopatías sino también a una disminución de la síntesis de la cadena de globina y por lo tanto de la especie de hemoglobina de la que forma parte. El término 'talasemia' es usado para describir este último tipo de desórdenes.

Los síndromes β -talasémicos son desórdenes genéticos caracterizados por la ausencia o disminución en la síntesis de las β -globinas, que producen una alteración en la relación globina/ β -globina responsable del desarrollo de la patología. La cadena de β -globina tiene 146 aminoácidos de longitud y un peso molecular de 15.867 Da. Es producida por el gen de β -globina, que se encuentra en el cromosoma 11, p15.5 y cuenta con tres exones y dos intrones. La expresión de β -globina es controlada por una región de control único (LCR), situado aguas arriba de los genes de globina.

Desde el punto de vista molecular las β -talasemias son muy heterogéneas (1). Las formas de β -talasemia se originan a partir de mutaciones que afectan cada etapa de la expresión del gen de globina tales como transcripción, procesamiento del precursor RNA mensajero, traducción del mRNA maduro y la integridad post traduccional de la cadena beta globina.

Como grupo, las talasemias representan el desorden genético más común conocido. Se estima que un 5% de la población mundial es portadora de un gen mutado para la hemoglobina, siendo más frecuente el ser portador de una talasemia que cualquier otra hemoglobinopatía. Unos 300.000 niños nacen cada año con síndromes talasémicos en todo el mundo. La β -talasemias es la hemoglobinopatía más frecuente en la cuenca mediterránea, el Oriente Medio y Asia. La α -talasemia grave es frecuente en Asia sudoriental (2). Los trastornos de la hemoglobina representan aproximadamente el 3,4% de las muertes en niños menores de cinco años. A nivel mundial, cerca de un 7% de las mujeres embarazadas son portadoras de una mutación en el gen de la hemoglobina y más del 1% de las parejas tienen riesgo de homocigosis en la concepción.

Los portadores y parejas en riesgo deben estar informados de sus riesgos y las posibilidades de reducir los mismos.

Indicadores anuales de β -talasemia en América.

OMS	Concepciones afectadas anualmente	Nacimientos totales anuales (1000s)	Embarazadas portadoras anuales (1000s)	Nacimientos anuales	
				Ambos padres portadores	En riesgo
América del Norte	268	4.435	122	15.780	13.337
América Central	2	3.627	20	724	705
América del Sur	248	7.643	278	13.895	12.651
Caribe	16	778	4.505	14.369	13.394

Los análisis de screening de la hemoglobina deberían formar parte de los servicios básicos de salud en la mayoría de los países (3).

Actualmente, son cada vez más numerosos los países que aún sin tener grandes problemas sanitarios por estas patologías, se dedican a conocer su prevalencia y planifican amplias campañas para su detección (4). La metodología más utilizada en los estudios de screening es la PCR-ARMS (Amplificación refractaria de sistema de mutaciones) desarrollada por John Old en 1990. Otros métodos utilizados son amplificación seguida de hibridación con sondas marcadas alelos específicas (ASO's) y la amplificación de sitios de restricción creados (ACRS).

Al presente, existe muy poca información publicada acerca de la distribución de β -talasemia en la Argentina; solo se realizaron estudios para determinar frecuencia de la patología y de las principales mutaciones presentes en Buenos Aires, Córdoba, Rosario, Tucumán y Misiones (1, 5, 6, 7). En la siguiente tabla se muestran los resultados publicados, en frecuencia de mutaciones encontradas.

Tabla 1: Frecuencias de las mutaciones de β -talasemia reportadas en Argentina.

Mutaciones	Buenos Aires	Rosario	Córdoba	Tucumán	Misiones
CD 39	48,8 %	57,4 %	30,8 %	45%	6%
IVSI-1	9,4 %	4,9 %	3,8%	22,5%	--
IVSI-6	5,7 %	2,5 %	--	2,0%	--
IVSI-110	24,4 %	22,1 %	53,8 %	16,3%	0%
IVS II-1	2,0 %	1,6 %	--	4,1%	--
IVSII-745	6,9 %	4,1 %	--	2,0%	--

Desde el punto de vista clínico la talasemia tiene un amplio espectro de manifestaciones, con cuadros que van desde anomalías hematológicas difícilmente detectables hasta anemia severa y cuadros de enfermedad terminal.

Debido a que las formas clínicas más leves incluyen una ligera pseudopoliglobulia con anemia microcítica, es común que la β -talasemia sea subdiagnosticada y por ello se ignore la frecuencia de esta patología en una determinada población.

Las mutaciones descritas en β -talasemia son en su mayoría sustituciones puntuales. Actualmente se conocen alrededor de 298 mutaciones responsables del desarrollo de la β -talasemia según la base de datos de ithanet (www.ithanet.eu, último acceso 25/07/2016 18:33 hs). Están descritas las mutaciones más frecuentes características de cada área geográfica (8), es decir, cada población tiene un espectro único de mutaciones talasémicas que sirven como marcadores genéticos de dichas poblaciones (9). Así por ejemplo, se resumen en el siguiente cuadro la frecuencia de cada mutación encontrada por país.

	CD 39	IVSI-1	IVSI-6	IVSI-110	IVSI-1	IVSI-745
Italia	39,5 %	10,2 %	10,6 %	23,0 %	3,9 %	5,0 %
España	39,0 %	29,5 %	8,4 %	13,0 %	--	1,7 %
Fran	42	--	--	25	--	--

cia	,0 %			,0 %		
Turquía	5,1 %	5,7 %	11,3 %	38,1 %	6,3 %	3,8 %
Israel	10,5 %	5,0 %	11,0 %	21,5 %	7,0 %	2,3 %
Grecia	14,0 %	12,8 %	8,1 %	42,0 %	3,3 %	6,3 %
Arabia	--	26,7 %	--	40,0 %	6 %	--
Brasil	64,3 %	7,1 %	7,5 %	20,0 %	--	--
Alemania	27,0 %	5,9 %	5,2 %	25,0 %	4,5 %	4,3 %

La mayoría son mutaciones puntuales que alteran los procesos de transcripción, procesamiento o traducción del ARN mensajero. Sólo un pequeño porcentaje es consecuencia de la delección de fragmentos del gen beta o de la adición de nucleótidos. Aunque de forma teórica el mecanismo molecular de la β -talasemia sea tan amplio, sólo 25 mutaciones representan la gran mayoría de los alelos β -talasémicos en las poblaciones de todo el mundo (10).

Considerando que nuestra población está compuesta por diferentes grupos étnicos, principalmente por inmigraciones desde Italia, España, Turquía, Arabia e Israel y de acuerdo a los datos existentes a través de publicaciones referentes a nuestro país (1, 5, 11), se seleccionaron las siguientes mutaciones más frecuentes para ser estudiadas: CD 39(C-T), IVS I-6(T-C), IVS I-110 (G-A), IVS II-1(G-A) e IVS II-745(C-G).

Tabla 2: Descripción de las mutaciones seleccionadas

Mutación	Descripción
CD 39	Sustitución puntual 118 C>T, genera codón sin sentido. Impide la traducción. Herencia recesiva. Fenotipo: ° (ausencia de síntesis). Localización: exón 2. Frecuencia reportada en Argentina: 45,7%
IVSI-1	Sustitución puntual β nt 143 G>A. Sitio de splicing, procesamiento del ARNm. Herencia recesiva. Fenotipo: °. Localización: intrón 1. Frecuencia reportada en Argentina: 10,7%
IVSI-6	Sustitución puntual β 92+6T>C. Sitio de splicing, procesamiento del ARNm. Herencia recesiva. Fenotipo: + (síntesis reducida). Localización: intrón 1. Frecuencia reportada en Argentina 7,9%
IVSI-110	Sustitución puntual β nt 252 G>A sitio crítico de splicing, procesamiento del RNAm. Herencia recesiva +. Localización: intrón 1. Frecuencia reportada en Argentina: 23,2%
IVSII-1	Sustitución puntual β nt 496 G>T. Sitio de splicing, procesamiento del ARNm. Herencia recesiva. Fenotipo: °. Localización: intrón 2. Frecuencia reportada en Argentina: 2,5%
IVSII-745	Sustitución puntual β nt 1240 C>G sitio crítico de splicing, procesamiento del RNAm. Herencia recesiva + Localización: intrón 2. Frecuencia reportada en Argentina: 0,7%

El objetivo del presente trabajo es determinar la frecuencia de 6 mutaciones de β -talasemias en una población con pseudopoliglobulia y microcitosis en la ciudad de La Rioja, utilizando diagnóstico molecular por PCR-ARMS (12).

La técnica de PCR-ARMS aplicada en este estudio, reúne los requisitos necesarios de los métodos de diagnóstico: alta especificidad, reproducibilidad y bajo costo. Por lo tanto constituye un método eficaz para el diagnóstico de β -talasemia en pacientes sin posibilidad de estudio familiar, debido a la falta de uno de los padres. Esta técnica no sólo permite detectar la mutación causante del padecimiento, sino también determinar si se encuentran en estado homocigota o heterocigota, siendo particularmente útil su aplicación en estudios poblacionales, a fin de poder identificar la frecuencia real de la β -talasemia menor (7).

MATERIALES Y METODOS

PACIENTES

Para la realización de este estudio se analizaron muestras de pacientes que concurren al Instituto bioquímico Cortes Viñes en la ciudad de La Rioja, en el período comprendido entre julio y diciembre de 2012.

El criterio de inclusión requiere la presencia de microcitosis ($VCM < 80 \text{ fl}$) y pseudopoliglobulia según criterio OMS para la edad y sexo correspondiente, con lo que finalmente se seleccionaron 60 pacientes para el presente estudio. Ambas características son altamente sugestivas de β -talasemias. Se incluyeron en el estudio pacientes adultos de todos los grupos etarios y de ambos sexos previa firma de consentimiento informado. Fueron excluidos pacientes en tratamiento prolongado debido a enfermedades crónicas.

A todos ellos se les tomó una muestra de sangre entera con EDTA- K_3 y fueron analizadas en el contador hematológico Sysmex K-4500 para determinar la presencia de microcitosis y pseudopoliglobulia. Posteriormente la muestra fue congelada a -20°C y almacenada hasta completar el número de pacientes incluidos en el estudio.

La extracción de ADN genómico se realizó con el equipo FlexiGene® de QIAGEN y en todas las muestras se constató la presencia de ADN por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio. Concentración final de ADN $60 \mu\text{g/ml}$.

METODOLOGÍA

Se utilizó la técnica de amplificación de ADN mediante PCR-ARMS múltiple, la cual permite obtener fragmentos de un tamaño característico para cada una de las mutaciones estudiadas, siempre que éstas estén presentes en la muestra.

En este método, el ADN genómico objetivo, se amplifica usando un primer común y un primer alelo específico complementario a la mutación dirigida que están diseñados para discriminar entre secuencias que difieren en una única base. Además, utiliza primers control que amplifican otra región del gen de β -globina, cercana a la mutación que será detectada, actuando como control interno de amplificación asegurando la eficiencia de la PCR y evitando falsos negativos.

En el siguiente esquema de próxima página, se muestra la disposición de las mutaciones analizadas en el gen de β -globina (Fig.1)

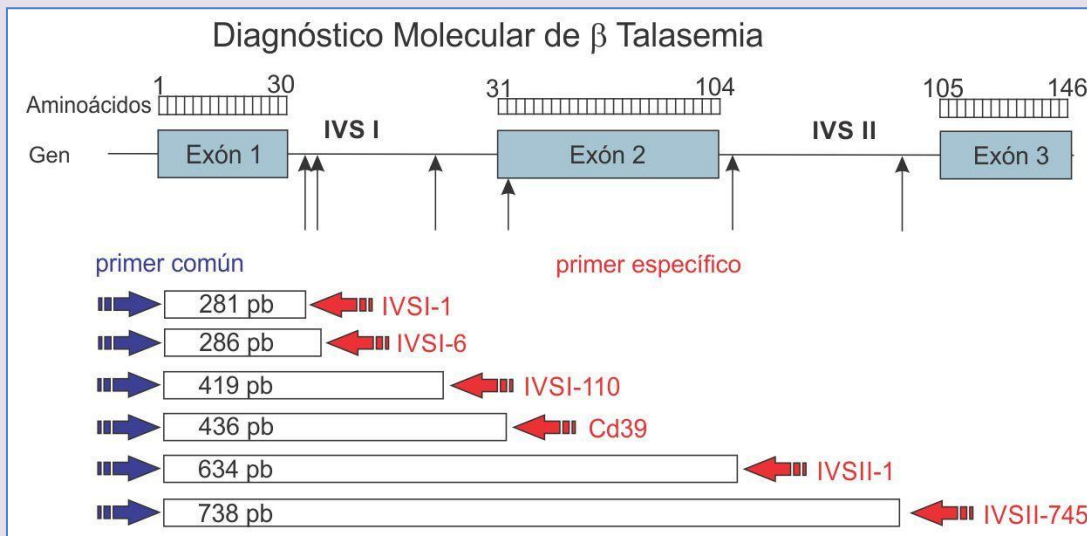


Figura 1: Los números indicados en los exones indican los aminoácidos correspondientes a la cadena de β -globina. IVSI e IVSII representan los dos intrones del gen. Las flechas negras indican la posición de las mutaciones. La flecha azul es el primer común B. Se indican en cada caso la longitud en pares de bases de los fragmentos amplificados.

Se realizaron dos rondas de PCR-ARMS múltiple a cada paciente, en las que se utilizaron diferentes mezclas de primers para permitir la amplificación de tres fragmentos y un control en cada reacción.

La mezcla Delta está conformada por primers o iniciadores alelo específicos para las mutaciones CD 39, IVSI-1 e IVSII-1, además de una pareja de primers no alelo específicos comunes que generan un fragmento control.

La mezcla Omega está formada por primers específicos para las tres mutaciones restantes: IVSI-110, IVSI-6 e IVSII-745, más una pareja de primers para generar un fragmento control. (Tabla 3)

La mezcla Omega no puede utilizar el mismo control de la mezcla Delta, debido a que sus primers D-E son muy cercanos a los de la mutación IVSII-745. Por tal razón, lleva una pareja de primers diferentes, F-G que amplifican un fragmento del gen de γ -globina de 323 pb (12).

Las secuencias de los primers y tamaños de amplificación se obtuvieron de la base de datos de variantes de la hemoglobina humana y Talasemias HbVar (13).

Tabla 3: Distribución de primers en cada mezcla de PCR-Múltiple y tamaño final de los fragmentos amplificados.

Mezcla de Reacción	Primers	Tamaño del fragmento	Primer común
Delta	CD39	436 pb	B
	IVSI-1	281 pb	B
	IVSII-1	634 pb	B
	D-E	863 pb	-
Omega	IVSI-110	419 pb	B
	IVSI-6	286 pb	B
	IVSII-745	738 pb	B
	F-G	323 pb	-

Para la amplificación mediante PCR-ARMS múltiple usando q-PCR se utilizó 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) de Solis BioDyne.

Los primers fueron preparados a una concentración de 200uM.

Para cada amplificación se prepararon 20 μ l de mezcla de reacción compuesta por: 4 μ l de 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX); 0,05 μ l de cada primer (concentración final en la mezcla 0,2 μ M); 3,3 μ l de ADN (concentración final 4 ng/ μ l) y agua c.s.p.

La amplificación por qPCR se llevó a cabo en un termociclador Line- Gene K FQD-48A de Bioer Technology usando cuantificación relativa. El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial o preciclo a 95°C por 15 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, hibridación a 60°C por 20 s y extensión a 72°C por 40 s.

Los productos de amplificación de cada paciente y control se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, con bromuro de etidio, a 150 V por 30 minutos. Las bandas fueron comparadas con marcadores de peso molecular en un rango de 1000pb-100pb, y visualizadas con luz U.V en un transiluminador.

RESULTADOS

Fueron analizados 60 pacientes de los cuales sólo 9 poseían diagnóstico médico de Talasemia e historial familiar. El resto de los pacientes no poseían diagnóstico médico, pero eran portadores de características clínicas presuntivas de Talasemia.

El origen étnico del grupo estudiado fue: 46,8% Italianos, 46,8% Españoles, 1,6% Griegos, 1,6% Turcos, 1,6% Alemanes y 1,6% Yugoslavo.

Con la técnica de PCR-ARMS múltiple se identificaron tres de las seis mutaciones estudiadas (Fig.1). Se encontraron 7 pacientes con la mutación CD 39 (11,7%), 6 pacientes con IVSI-1 positivo (10%) y un paciente con la mutación IVSI-6 (1,7%). Esto constituye un 23,3% en la población estudiada.

Las Figuras 2 y 3 muestran geles representativos de PCR-ARMS de los pacientes estudiados.

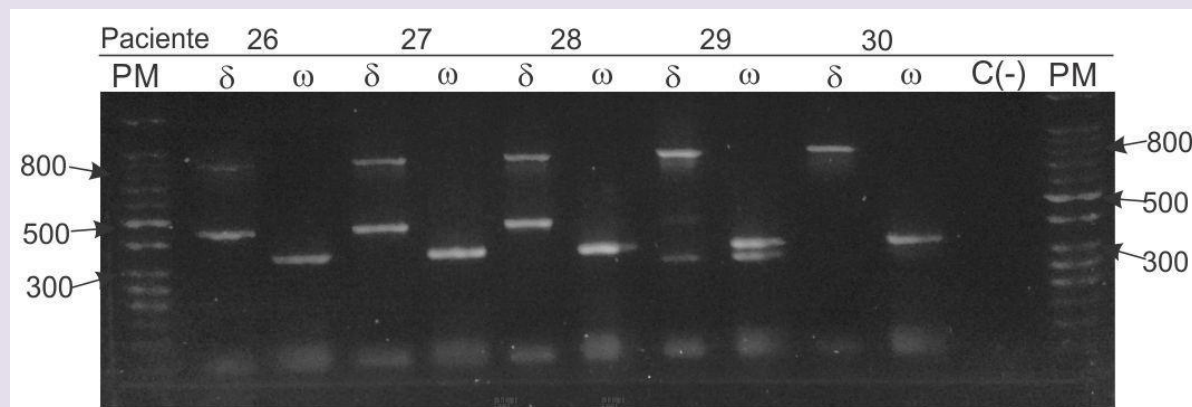


Fig. 2: Patrón de bandas de electroforesis en geles de agarosa al 2%. PM es el marcador de peso molecular, en él se señalan las bandas correspondientes a 800, 500 y 300 pares de bases. Se muestran para cada paciente las bandas amplificadas con las mezclas Delta (δ) y omega (ω).

En la figura 2 puede observarse que los pacientes 26, 27 y 28 presentan en la mezcla delta la banda correspondiente al control de 863pb y una banda adicional de 436pb característica de la mutación CD39. En la mezcla omega sólo se visualiza la banda control de 323pb (primers F-G). El paciente 29 resultó negativo para la mezcla delta, pero presenta en la mezcla omega una banda adicional de 286pb característica de la mutación IVSI-6. En la línea delta para este paciente 29 se puede advertir una muy ligera banda compatible con 436 pb que dio negativa a la confirmación posterior. El paciente 30 fue negativo para ambas mezclas, donde solo se visualizan las bandas control de cada una de ellas.

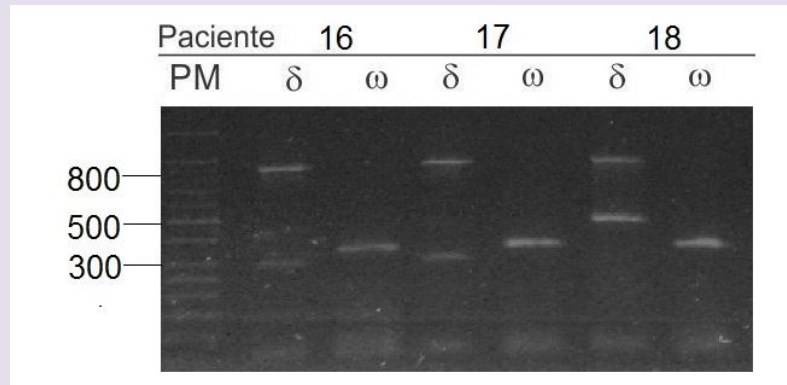


Fig. 3: Patrón de bandas de electroforesis en geles de agarosa al 2%. PM es el marcador de peso molecular, en él se señalan las bandas correspondientes a 800, 500 y 300 pares de bases. Se muestran para cada paciente las bandas amplificadas con las mezclas Delta (δ) y omega (ω).

Los pacientes 16 y 17 presentan en la mezcla delta la banda correspondiente al control de 863pb y una banda adicional de 281pb característica de la mutación IVS1-1. El paciente 18 muestra en la mezcla delta una banda adicional de 436pb correspondiente a la mutación CD39. Las tres muestras en la mezcla omega sólo amplifican la banda control de 323pb (Figura 3).

Todos los pacientes CD39 positivos poseían diagnóstico médico de Talasemia e historial familiar de anemias crónicas, así mismo todos ellos tenían ascendencia italiana. Para confirmar el resultado obtenido por PCR-ARMS múltiple y verificar el estado heterocigota de la mutación, a cada paciente se le realizaron dos amplificaciones, una de ellas utilizando los primers específicos de alelo para la mutación CD39 y otra con los primers complementarios a la secuencia normal (CD 39 normal), cada uno con los respectivos controles. En este caso las reacciones deben realizarse por separado ya que la amplificación tanto del gen normal como del mutado generan fragmentos de la misma longitud (Fig. 4 y 5).

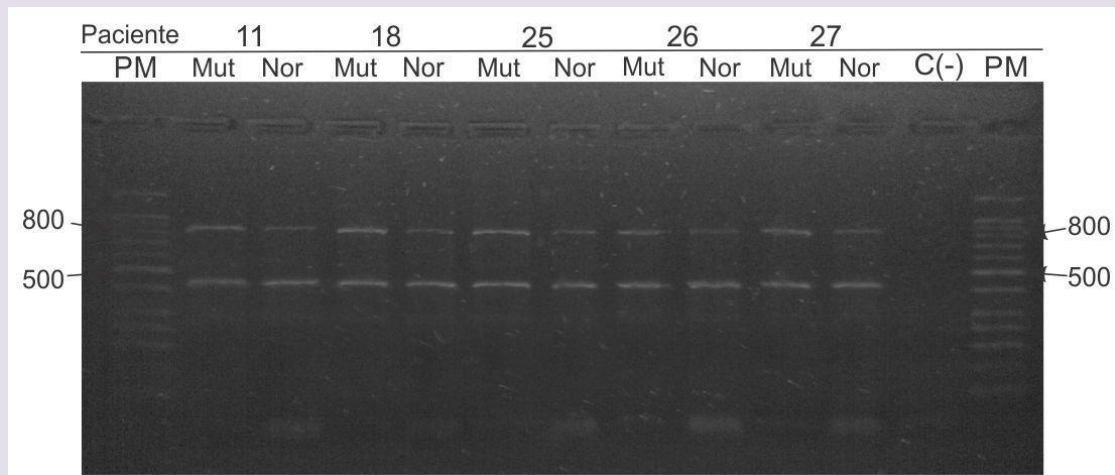


Fig. 4: Patrón de bandas de electroforesis en geles de agarosa al 2%. PM es el marcador de peso molecular, en él se señalan las bandas correspondientes a 800 y 500 pares de bases. Se muestran para cada paciente las bandas amplificadas de los genes mutados (Mut) y normales (Nor), en ambos casos de 436pb. La banda presente en todos ellos de 863pb corresponde al control (primers D-E). Todos los casos pertenecen a pacientes heterocigotas.

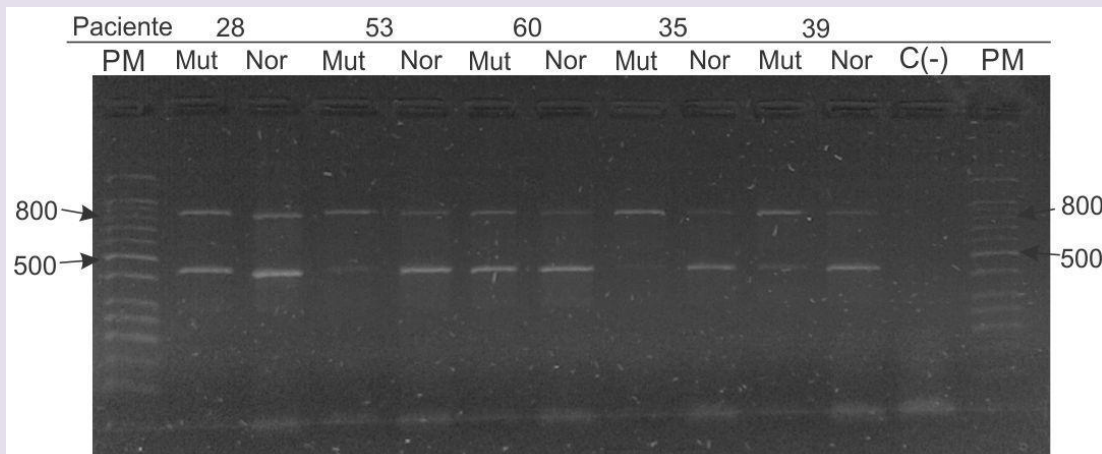


Fig. 5: Se muestran para cada paciente las bandas amplificadas de los genes mutados (Mut) y normales (Nor), en ambos casos de 436pb. La banda presente en todos ellos de 863pb corresponde al control (primers D-E). Los pacientes 53, 35 y 39 sólo amplifican el gen normal. No poseen la mutación CD39.

En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos:

	Número de pacientes positivos	% positividad	Diagnóstico de talasemia	Origen étnico
CD 39	7	11,7	+	100 % italianos
IVSI-1	6	10,0	-	67 % españoles 33 % italianos
IVSI-6	1	1,7	-	100 % italianos
IVSI-110	0	0	-	
IVSII-1	0	0	-	
IVSII-745	0	0	-	

Los pacientes positivos para las mutaciones IVSI-1 e IVSI-6 también se confirmaron utilizando PCR-ARMS con primers específicos de alelos en reacciones únicas para cada mutación, es decir, en cada una de ellas solo había una pareja de primers específicos de alelo y los primers del correspondiente control. No se comprobó para ellos el gen normal a fin de determinar la heterocigosis de la mutación, la cual se sospecha debido a las manifestaciones clínicas.

Los 6 pacientes portadores de la mutación IVSI-1 fueron 2 descendientes de italianos y cuatro de españoles. El único paciente con IVSI-6 era descendiente de italianos.

No se encontraron pacientes con las mutaciones IVSI-110, IVSII-1 ni IVSII-745.

Sólo uno de los nueve pacientes con diagnóstico médico de talasemia resultó negativo para todas las mutaciones ensayadas, lo cual no excluye el diagnóstico dado que puede poseer alguna mutación de menor frecuencia descripta.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La frecuencia de mutaciones encontradas, CD39 (11,7%), seguida de IVSI-1 (10%) es similar a los resultados descriptos en las publicaciones de la ciudad de Tucumán, a diferencia de las demás publicaciones argentinas donde la mutación más frecuente es también CD39, pero seguida en frecuencia por IVSI-110, lo cual es característico de la población mediterránea.(10)

Sin embargo, en Tucumán la frecuencia de CD39 prácticamente duplica la de IVS1-1 y las encontradas en este trabajo son muy similares. Estas diferencias se pueden atribuir a la distribución étnica de los grupos estudiados. Así mismo, es de esperar que las frecuencias encontradas en este estudio sean más bajas que las reportadas por trabajos donde la búsqueda de frecuencia de las mutaciones se realiza en una población de talasémicos diagnosticados.

Mientras que la mutación CD39 está descrita con mucha frecuencia en Italia, España y Francia, la mutación IVS1-1 tiene su máxima frecuencia en República Checa (36%), España (29,5%) y Arabia (26,7%). Debido al origen étnico de los pacientes IVS1-1 positivos encontrados, se concluye que en este caso la herencia sería española.

La distribución étnica del grupo estudiado no representa fielmente la diversidad de la población de la ciudad de La Rioja

La anemia ferropénica es la anemia de mayor frecuencia tanto a nivel mundial como nacional y por recientes trabajos realizados en la ciudad de La Rioja (14) también lo es en esta ciudad. No obstante ello, es muy importante poder distinguir aquellas anemias microcíticas (síntomatología común a la anemia ferropénica y a las talasemias) y hacer un correcto diagnóstico diferencial. Las determinaciones bioquímicas en laboratorios no especializados no permiten hacer en muchos casos un diagnóstico diferencial certero por falta de metodología acorde. Uno de los objetivos de este trabajo fue poner en marcha la metodología específica necesaria para el diagnóstico diferencial de mutaciones observadas en talasemias a través de PCR-ARMS.

Consideramos que la información es de gran importancia dado que muestra la necesidad de indagar acerca de la etiología de las anemias microcíticas sin presuponer que todas ellas son ferropénicas, aún cuando la anemia ferropénica sigue siendo el tipo más frecuente, sobre todo en la población pediátrica. Conocer y diagnosticar los casos de talasemia permitirá no sólo evitar las nocivas sobrecargas de hierro que tienen tanto impacto en la calidad de vida del talasémico, sino acceder a información certera acerca de la prevalencia de talasemia en nuestra ciudad.

En el grupo estudiado sólo un 15% tenían diagnóstico previo de talasemia, el estudio de las mutaciones permitió identificar un 23,3% como portadores de alguna mutación de β -talasemia en la población microcítica. Ese 8% sin diagnosticar necesita ser identificado, para acceder al tratamiento adecuado.

Este trabajo constituye además, el primer reporte acerca de la frecuencia de mutaciones de β -talasemia en la ciudad de La Rioja.

Por otro lado, el conocimiento de las mutaciones frecuentes en nuestro medio, es de utilidad para la realización de asesoramiento genético a parejas en riesgo y diagnóstico prenatal.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al laboratorio Cortes-Viñes por su apoyo incondicional, desde lo económico y profesional. A la universidad Nacional de La Rioja por el apoyo económico y las instalaciones de biología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Bragos I.M., Noguera N.I., Morisoli L., Milani A.C. Most frequent mutations of β -thalassemia in Rosario Argentina. *Haematologica* (2000) 85(1):101
- 2- Organización Mundial de la Salud. Consejo Ejecutivo, reunión 11 de mayo de 2006.
- 3- Modell B., Darlison M. *Bulletin of the World Health Organization* (2008); 86:480–487.
- 4- Bragos I.M., Noguera N.I., Raviola M.P. y Milani A.C. Genética molecular de beta talasémicos heterocigotas. Interrelación con parámetros hematológicos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* (2005); 21(1): s/n.
- 5- Roldan A., Gutierrez M., Cygler A., Bonduel M., Sciuccati G. y Feliu Torres A. Molecular caracterización of β -thalassemia genes in an Argentina population. *Am J Hematol* (1997); 54:170-82
- 6- Noguera N., Bragós I., Morisoli L., Milani A. Screening for hemoglobinopathies in neonates in Argentina. *Haematologica* (1999); 84:387-389
- 7- Acosta K. B., Riera M.A., Labandera N., Zapata P.D., Galeano, Z. Estudio de las mutaciones CD39 e IVS1-110 causantes de b-talasemia mediante ARMS-PCR. *Rev. Cienc. Tecnol.* (2010) Año 12. N° 14: 29-34

8- www.ithanet.eu.

9- Bravo M., Salazar R. Detección de β -talasemia mediante técnica de Amplificación Refractaria de Sistemas de Mutaciones (ARMS-PCR). Invest Clin (1999). 40(3): 203-213.

10- Manuel Calvo-Villas J.M., Iñigo S., Ropero Gradilla P., Zapata Ramos M.F., Sicilia Guillén F., Cuesta Tovar J. Caracterización molecular de la betatalasemia en Lanzarote. Med Clin (Barc). (2008).130(12):450-452

11- Soria N.W., Tulián C.L., Plassa F., Roth G.A. β -thalassemia and hemoglobin types in Argentina population. Am J Hematol (1997);54:160-163.

12-Old J.M., Varawalla N.Y., Wheatherall D.J., Rapid detección and prenatal diagnosis of b-Thalassaemia: Studies in Indian and Chyriot population in the UK. The Lancet.(1990); 336: 834-837.

13- <http://globin.bx.psu.edu/hbvar>

14- Campregher D.N., Campregher H.G, Tulian C.L. Causas más frecuentes de anemia en una población adulta de la ciudad de La Rioja. UNLaR Ciencias (2013). 14(1):12-17.