

I difetti emoglobinici e la loro valutazione di laboratorio

R. Galanello^a, M.D. Cipollina^a, F.R. Demartis^a, M.C. Sollaino^a,
S. Satta^a, D. Loi^a, L. Perseu^b, F. Anni^a

^a Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Cagliari,
Ospedale Regionale Microcitemie, ASL 8, Cagliari

^b Istituto di Neurogenetica e Neurofarmacologia CNR, Cagliari

Riassunto

Le emoglobinopatie includono disordini genetici quantitativi e/o qualitativi causati da mutazioni che colpiscono i geni responsabili della sintesi emoglobinica. Sulla base del gene coinvolto e del tipo di difetto, le emoglobinopatie possono essere complessivamente classificate in talassemie (alfa, beta, delta beta) e varianti strutturali anormali.

L'indagine di laboratorio include la determinazione dell'emocromo, la determinazione del pattern emoglobinico, la quantificazione dell'HbA₂, HbF e il rilevamento di varianti Hb mediante cromatografia. Il sequenziamento del gene globinico, mediante amplificazione del DNA, consente di identificare in maniera semplice e rapida il difetto molecolare.

Summary

Hemoglobin defects and their laboratory evaluation

The hemoglobinopathies include quantitative and/or qualitative genetic disorders caused by mutations affecting the genes responsible for hemoglobin synthesis. Based on the gene involved and the type of defect, the hemoglobinopathies can be broadly classified into thalassemias (alfa, beta, delta beta) and abnormal structural variants.

The laboratory investigation include determination of RBC indices, hemoglobin pattern, quantification of HbA₂, HbF and detection of Hb variants by HPLC. Sequencing of the amplified globin gene DNA allows easy and quick identification of the molecular defect.

Introduzione

Le emoglobinopatie rappresentano un gruppo di disordini genetici quantitativi e/o qualitativi causati da mutazioni nei geni responsabili della sintesi delle catene globiniche¹. Possono essere classificate, in base ai geni coinvolti e al tipo di difetto, in talassemie (alfa, beta delta/beta) e varianti emoglobiniche.

Le talassemie sono un gruppo eterogeneo di disordini autosomici recessivi nei quali numerosi e diversi difetti molecolari causano una riduzione o l'assenza totale di sintesi di una o più catene globiniche. Lo stato di omozigote presenta un fenotipo clinico di gravità variabile (es. talassemia major, talassemia intermedia), mentre gli eterozigoti sono asintomatici e presentano parametri ematologici caratteristici e utili per la loro identificazione².

Le varianti emoglobiniche derivano da una mutazione puntiforme, cui corrisponde una sostituzione aminoacidica e possono essere totalmente asintomatiche o produrre specifici quadri clinici in relazione all'alterazione funzionale dell'emoglobina conseguente al difetto genetico (anemia emolitica, metaemoglobinemia, cianosi, pallore). Tra le varianti emoglobiniche devono essere ricordate per la frequenza, gravità dei quadri clinici ed interazione con la beta talassemia, l'emoglobina S beta6 Glu→Val³ e l'emoglobina E beta26 Glu→Lys⁴. Quest'ultima appartiene più propriamente al gruppo delle emoglobinopatie talassemiche e cioè a quelle emoglobinopatie in cui il difetto molecolare, oltre alla sostituzione aminoacidica determina anche una ridotta sintesi. In questo gruppo oltre alla HbE va ricordata la Hb Lepore frequente in alcune regioni italia-

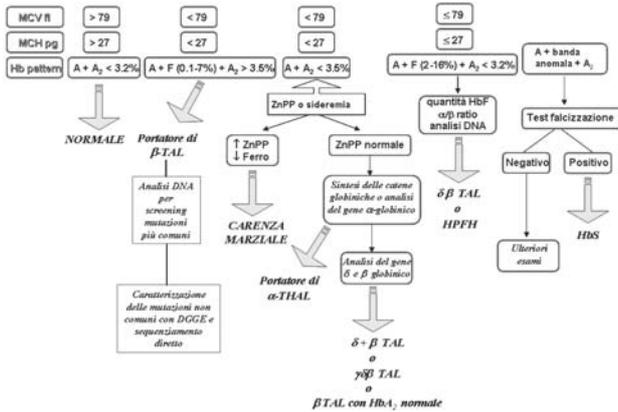


Figura 1. Carta di flusso per lo screening delle talassemie.

ne⁵. Infine meritano un cenno le talassemie cosiddette dominanti dovute a mutazioni responsabili di varianti iperinstabili, che danno luogo a quadri clinici di talassemia intermedia anche allo stato eterozigote⁶.

La valutazione di laboratorio delle emoglobinopatie deve consentire l'identificazione sia dei soggetti malati sia dei portatori (screening). Lo screening è utile per l'individuazione di coppie a rischio di avere un figlio affetto da difetti emoglobinici gravi e per fornire loro una corretta consultazione genetica⁷. Esistono diverse strategie per l'attuazione di un programma di screening, la cui scelta dipende da diversi fattori quali frequenza della malattia, eterogeneità del difetto genetico, risorse disponibili, fattori sociali, culturali e religiosi.

Diagnosi delle emoglobinopatie

Gli indici più utili per la diagnosi di emoglobinopatie sono il volume corpuscolare medio (MCV), l'emoglobina corpuscolare media (MCH), il pattern emoglobinico con particolare riguardo ai livelli di HbA2, HbF ed alla eventuale presenza di varianti (Fig. 1).

I metodi attualmente più diffusi per la determinazione di tali indici sono l'uso di contaglobuli elettronici e la cromatografia ad alta pressione (HPLC) che consente una analisi qualitativa e quantitativa delle varie frazioni emoglobiniche e l'identificazione della maggior parte delle varianti emoglobiniche^{8,9} (Fig. 2a e 2b). In alcuni casi è necessario lo studio del ferro serico (sideremia e transferrina).

La possibilità di amplificare e sequenziare il DNA dei geni globinici consente di caratterizzare le varie forme di talassemie e le varianti emoglobiniche in maniera rapida e relativamente semplice^{10,11}.

La sintesi in vitro delle catene globiniche è un esame complesso che è raramente richiesto per la diagnosi delle varie sindromi talasemiche, ma è molto utile in alcuni casi come ad esempio la diagnosi differenziale tra alfa e delta-beta talassemia o per la definizione di fenotipi atipici derivanti da interazioni genotipiche complesse.

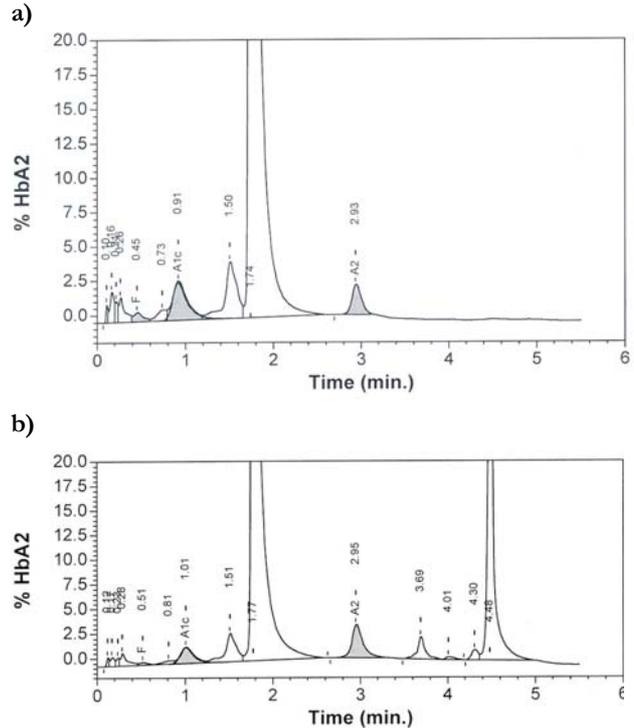


Figura 2. Analisi in HPLC di emoglobina umana: a) pattern emoglobinico normale b) pattern con variante emoglobinica C.

Beta-Talassemia

Si conoscono più di 200 difetti molecolari responsabili di beta-talassemia. Nella gran parte dei casi si tratta di mutazioni puntiformi, più raramente delezioni, che alterano una o più tappe dell'espressione genica. Le mutazioni talasemiche sono classificate come gravi, lievi o silenti in base alla gravità del difetto molecolare e del conseguente quadro clinico. Da un punto di vista clinico le beta talassemie vengono distinte in: a) talassemia major, grave anemia trasfusione dipendente (omozigosi o composto genetico per due alleli talasemiche); b) talassemia intermedia, anemia di gravità variabile non trasfusione dipendente a patologia molecolare complessa; c) portatore asintomatico (eterozigoti per un allele talasemico).

La talassemia major è caratterizzata ematologicamente da una grave anemia ipocromica con marcata alterazione morfologica dei globuli rossi, consistente in intensa anisopoichilocitosi con emazie a goccia e a bersaglio, presenza nello striscio di sangue periferico di eritroblasti, per lo più del tipo ortocromatico e policromatico e notevole riduzione o assenza dell'HbA con aumento corrispondente percentuale dell'HbF. Nell'omozigosi per la beta 0 talassemia sono presenti solo HbF (95-97%) e HbA2 (3-5%), mentre nella beta + talassemia omozigote vi è anche una quantità variabile di HbA con valori massimi del 20%. La sintesi globinica è notevolmente sbilanciata (rapporto di sintesi alfa/non alfa > 3.0).

La talassemia intermedia è caratterizzata da una anemia microcitica ipocromica di grado variabile con alterazioni morfologiche degli eritrociti simili a quelle della talassemia major. In genere il pattern emoglobinico mostra una maggiore quantità di HbA e minore HbF, ma esistono anche pazienti con talassemia intermedia omozigoti per beta 0 talassemia, nei quali con meccanismi solo in parte noti, si ha una elevata produzione assoluta di HbF che li rende non trasfusione dipendenti.

Il portatore sano di beta talassemia presenta, da un punto di vista ematologico microcitosi (MCV: 60-70fl), ipocromia (MCH: 19-23pg) ed un aumento dei livelli di HbA2 (4-6%). L'emoglobina è in genere ridotta di 1-2 grammi ed in alcuni casi è presente una vera e propria modesta anemia. Il numero dei globuli rossi è, generalmente, aumentato e la loro morfologia è modificata (anisopoichilocitosi). In circa il 30% dei portatori è inoltre presente un modesto incremento dei livelli di emoglobina fetale (HbF 2-5%). La sintesi in vitro delle catene globiniche è sbilanciata per la maggiore produzione relativa di catene alfa, con un rapporto biosintetico alfa/beta ≥ 1.2 .

Accanto a questi portatori "tipici" vi sono poi gli eterozigoti "atipici" nei quali le suddette caratteristiche ematologiche possono essere modificate da fattori genetici ed acquisiti. Gli eterozigoti per mutazioni beta talassemiche lievi (p.e. -88 C→T, -87 C→G, IVS1-6 T→C) generalmente presentano valori di MCV ed MCH più alti rispetto ai portatori di mutazioni gravi beta 0 e beta +. I valori di HbA2 sono generalmente borderline o lievemente aumentati (3,4 -4%), come nei portatori di IVS1-6 T→C o significativamente aumentati nei portatori di mutazioni del promoter del gene beta globinico¹². Nei portatori di mutazioni silenti (-101 C→T, -92 C→T, IVS2-844 C→G, 5' e 3' UTR) il deficit minimo di sintesi di catene beta non altera in genere il quadro ematologico, anche se, talvolta, i valori borderline dell'HbA2 e degli indici eritrocitari possono far sospettare la presenza di un allele talassemico.

Oltre alla gravità dell'allele beta talassemico un altro fattore causa di eterogeneità del fenotipo ematologico è la coereditarietà di un altro difetto dei geni globinici. La coereditarietà di un genotipo alfa talassemico (es. - alfa/-alfa, - /-alfa alfa) determina un aumento di MCV e di MCH e a volte la loro normalizzazione. I valori di HbA2 rimangono tuttavia aumentati e quindi diagnostici¹³. In questi casi lo sbilanciamento della sintesi globinica è meno evidente.

In rari casi i portatori di beta talassemia possono presentare un fenotipo clinicamente significativo. E' il caso della coereditarietà di un gene alfa triplicato, o di tre geni alfa deleti¹⁴. La coereditarietà di una beta talassemia eterozigote e un gene alfa triplicato determina un quadro lieve di talassemia intermedia in quanto essendo, il gene alfa soprannumerario funzionante, si ha un ulteriore eccesso di sintesi di catene alfa con aggravamento dello sbilanciamento globinico¹⁵. L'identifi-

cazione dei portatori di un gene alfa triplicato è difficile in quanto il quadro ematologico è silente, ed è in genere retrospettiva in genitori di pazienti con una talassemia intermedia lieve. Tuttavia, il sospetto diagnostico può essere posto di fronte a valori borderline degli indici eritrocitari e/o dell'HbA2 e la diagnosi può essere confermata con la sintesi delle catene globiniche e l'analisi del DNA.

La associazione di beta talassemia eterozigote e delezione di tre geni alfa globinici determina una anemia con marcata microcitosi ed ipocromia¹⁶.

Tra i fattori acquisiti in grado di modificare il fenotipo dei portatori di beta talassemia va ricordata l'anemia sideropenica, che può determinare una riduzione dell'HbA2, a volte fino a valori borderline o addirittura, nei casi gravi, normali¹⁷.

Alfa-Talassemia

L'alfa-talassemia è un difetto genetico frequente in molte popolazioni, caratterizzato da una ridotta o assente sintesi delle catene alfa globiniche dovuta in genere a delezione di uno o più geni alfa e più raramente a difetti da non delezione (alfaND). Dal punto di vista ematologico e clinico si distinguono 4 differenti condizioni di gravità crescente in rapporto al numero di geni alfa deleti: 1) portatore silente (- alfa/alfa alfa), 2) trait alfa talassemico (-alfa/-alfa o - /-alfa alfa), 3) malattia da HbH (- /-alfa) o più raramente - /alfaNDalfa 4) idrope fetale (- /- -).

I portatori di alfa-talassemia presentano un fenotipo ematologico caratterizzato da MCV ed MCH ridotti, lieve diminuzione dei livelli di emoglobina, sbilanciamento della sintesi globinica (alfa/non alfa <0.9) e livelli di HbA2 ed HbF normali¹⁸. In questi casi si pone la diagnosi differenziale con anemia sideropenica, che può essere fatta con la determinazione della protoporfina eritrocitaria e/o dello stato del ferro serico.

Malattia da HbH

Dalla delezione o mutazione di 3 geni alfa-globinici (- /-alfa o - / alfaND alfa) deriva il quadro clinico della malattia da HbH, caratterizzato dalla presenza di una emoglobina anomala, HbH (omotetramero di catene beta-globiniche). L'emoglobina H, la cui quantità varia dal 3 al 30% dell'emoglobina totale, viene messa in evidenza con l'elettroforesi di un emolisato fresco a pH alcalino o ancora più semplicemente incubando il sangue periferico con coloranti vitali a 37°C per un'ora, che farà evidenziare i caratteristici corpi inclusi. Il quadro clinico varia notevolmente da un'anemia lieve, quasi asintomatica, ad un'anemia grave che può rendere necessarie trasfusioni di globuli rossi. In aggiunta il quadro clinico presenta in genere ittero ed epatosplenomegalia¹⁶.

Idrope fetale

L'assenza di 4 geni alfa-globinici determina l'idrope

fetale con Hb di Bart (tetramero di gamma catene) che è la forma più severa di alfa-talassemia. Questo quadro clinico è molto grave in quanto, oltre ad essere incompatibile con la vita extrauterina, provoca anche gravi complicanze per la madre¹⁹.

Delta-Beta Talassemia

La delta-beta talassemia allo stato eterozigote è caratterizzata da microcitosi, ipocromia, livelli di HbA2 normali o ridotti e livelli aumentati di HbF (5-15%) che è distribuita eterogeneamente nei globuli rossi. Il rapporto di sintesi globinica è in genere sbilanciato (>1), anche se moderatamente. È dovuta a una serie molto eterogenea di difetti molecolari, in genere delezioni che rimuovono porzioni estese del cluster beta globinico, più raramente mutazioni puntiformi²⁰.

Delta-Talassemia

La delta-talassemia non ha alcuna rilevanza dal punto di vista clinico, mentre è importante tenerla presente nello screening dei portatori di beta talassemia. Infatti, la coereditarietà di delta e beta talassemia può complicare l'identificazione del portatore di beta talassemia, in quanto determina una riduzione dei livelli di HbA2 talvolta sino a valori perfettamente normali.

Persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH)

La HPFH è un tratto genetico caratterizzato da persistente produzione di quantità variabili di catene gamma, e quindi di HbF nella vita adulta. Non ha grande rilevanza clinica, ma si possono porre problemi di diagnosi differenziale con la delta-beta talassemia, dalla quale si differenzia per un rapporto biosintetico alfa/non alfa bilanciato. Esistono forme da delezione e da non delezione, e l'aumento dell'HbF può variare da un minimo di 2% ad un massimo di 38%. La coereditarietà di un allele talassemico con un allele HPFH, può causare un quadro clinico di talassemia intermedia molto lieve²¹.

Varianti emoglobiniche

Le varianti emoglobiniche derivano da sostituzioni amminoacidiche a carico delle catene globiniche che costituiscono l'emoglobina A e l'emoglobina A2. La maggior parte di queste varianti sono stabili, funzionalmente efficienti e pertanto non hanno rilevanza clinica, in quanto, non determinano alcun problema sia nell'eterozigote, che in combinazione con beta o alfa-talassemia. Il quadro ematologico associato è normale e si rendono evidenti solo all'analisi dell'emoglobina con elettroforesi o con HPLC. Le varianti instabili (es. Hb Zurich beta 63 His→Arg; Hb Köln beta 98 Val→Met; Hb Hasharon alfa 47 Asp→His) determinano un quadro clinico di anemia emolitica con reticolocitosi ed iperbilirubinemia.

Il 75% delle varianti instabili è legato a mutazioni

della catene beta-globiniche.

Le emoglobine iperinstabili (es. Hb Cagliari beta 60 Val→Glu; Hb Quong Sze alfa 125 Leu→Pro) determinano un quadro clinico rilevante di talassemia intermedia anche allo stato eterozigote e data l'estrema instabilità non vengono rivelate all'elettroforesi dell'emoglobina.

Le varianti emoglobiniche possono avere una diversa affinità per l'ossigeno rispetto all'emoglobina A:

- Varianti con aumentata affinità, determinano una eritrocitosi compensatoria legata ad aumentata produzione di eritropoietina.
- Varianti con ridotta affinità (meno frequenti), possono produrre un quadro di cianosi familiare.
- Oltre alle emoglobine instabili e a quelle con abnorme affinità per l'ossigeno esistono altre varianti con rilevanza clinica come:
- Emoglobina M (di cui si conoscono 7 varianti), determina un colore caratteristico al sangue (mogano). Clinicamente si manifesta con cianosi.
- Emoglobina S allo stato eterozigote può determinare episodi vaso-occlusivi minimi in particolari situazioni di ipossia (altitudini elevate, anestesia, ecc.).

Ematologicamente si caratterizza per la presenza di banda lenta (circa 35%) all'elettroforesi dell'emoglobina e positività al test di falcizzazione in vitro, mentre i parametri ematologici sono normali. Allo stato omozigote determina l'anemia falciforme, mentre la doppia eterozigosi HbS/β⁰talassemia produce il quadro clinico della microdrepanocitosi, che è sovrapponibile a quello della malattia falcemica. Questa è caratterizzata essenzialmente da anemia emolitica, crisi vasocclusive in diversi distretti vascolari, dovute alla formazione di polimeri di HbS, che provocano la classica deformazione a falce dei globuli rossi. I globuli rossi falcemici sono più rigidi delle cellule normali e tendono ad ostruire le piccole arterie, creando una insufficiente ossigenazione dei tessuti e degli organi. All'elettroforesi dell'emoglobina si osserva HbS (circa l'80%), l'HbA2 e quantità variabili di HbF.

Vi sono infine delle varianti (Hb Lepore, HbE) che possono determinare, sia allo stato omozigote che in doppia eterozigosi con la beta talassemia, un fenotipo beta-talassemico, mentre altre (ad. es. Hb Constant-Spring) possono produrre un quadro clinico di tipo alfa-talassemico.

L'identificazione delle varianti emoglobiniche avviene tramite il riscontro di un picco anomalo all'HPLC e di una banda con diversa mobilità all'elettroforesi dell'emoglobina, mentre per la loro caratterizzazione è necessaria l'analisi molecolare²². Nel sospetto di varianti instabili vanno eseguiti il test di precipitazione con isopropanolo e la ricerca dei corpi di Heinz, mentre nel sospetto di alterata affinità per l'ossigeno vanno eseguiti test funzionali specifici. Va comunque ricordato che circa un terzo delle varianti emoglobiniche è elettroforeticamente silente.

Bibliografia

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79:704-12.
2. Borgna-Pignatti C, Galanello R. Thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: Lippincott Williams & Wilkins eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: 2004. p. 1319-65.
3. Weatherall DJ, Higgs DR. The Haemoglobinopathies. *Bailliere's Clinical Haematology*. London: WB Saunders Company; Vol 6 1993.
4. Wasi P, Winichagoon P, Baramée T, Fucharoen S. Globin chain synthesis in heterozygous and homozygous haemoglobin E. *Hemoglobin* 1982; 6:75-8.
5. Steinberg MH, Adams JG. Thalassaemic hemoglobinopathies. *Am J Pathol* 1983; 113:396-409.
6. Thein SL. Beta thalassaemia. In: *Bailliere's Clinical Haematology, Sickle Cell Disease and Thalassaemia*. London: Rodgers; 1998. p.91-126.
7. Galanello R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, Old J, Petrou M, Angastiniotis M. Prevention of thalassemias and other hemoglobin disorders. *Thalassemia International Federation Publications*. Vol 1; 2003.
8. Galanello R, Satta S, Pirroni MG, Travi M, Maccioni L. Globin chain synthesis analysis by high performance liquid chromatography in the screening of thalassemia syndromes. *Hemoglobin* 1998; 22:501-8.
9. Galanello R, Barella S, Gasperini D. Evaluation of a new automatic HPLC analyser for thalassaemia and haemoglobin variants screening. *Journal of Automated Chemistry* 1995; 17:73-6.
10. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
11. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74:5463-9.
12. Galanello R, Barella S, Ideo A, Gasperini D, Rosatelli C, Paderi L, et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A2 levels: implication for beta-thalassemia carrier screening. *Am J Hematol* 1994; 46:79-81.
13. Galanello R, Paglietti E, Melis MA, Crobu MG, Addis M, Moi P, et al. Interaction of heterozygous beta zero-thalassemia with single functional alpha-globin gene. *Am J Hematol* 1988; 29:63-6.
14. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Vrettou C, Maragoudaki E, Michael T, Metaxotou-Mavromati A, et al. The triplicated alpha-globin gene locus in beta-thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *Br J Haematol* 1996; 95:467-71.
15. Bianco I, Lerone M, Foglietta E, Deidda G, Cappabianca MP, Morlupi L, et al. Phenotypes of individuals with a beta thal classical allele associated either with a beta thal silent allele or with alpha globin gene triplication. *Haematologica* 1997; 82:513-25.
16. Origa R, Sollaino MC, Giagu N, Barella S, Campus S, Mandas C, et al. Clinical and molecular analysis of haemoglobin H disease in Sardinia: haematological, obstetric and cardiac aspects in patients with different genotypes. *British Journal of Hematology* 2006; 136:326-32.
17. Galanello R, Ruggeri R, Addis M, Paglietti E, Cao A. Hemoglobin A2 in iron deficient beta-thalassemia heterozygotes. *Hemoglobin* 1981; 5:613-8.
18. Galanello R, Paglietti E, Melis MA, Giagu L, Cao A. Hemoglobin inclusions in heterozygous alpha-thalassemia according to their alpha-globin genotype. *Acta Haematol* 1984; 72:34-6.
19. Beris P, Darbellay R, Extermann P. Prevention of beta-thalassemia major and Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *Semin Hematol* 1995; 32:244-61.
20. Weatherall DJ and Clegg JB. *The thalassaemia syndromes*. Oxford: Blackwell Science, 2001.
21. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 1994; 83:1673-82.
22. Old J, Traeger-Synodinos J, Galanello R, Petrou M, Angastiniotis M. Prevention of thalassemias and other hemoglobin disorders. *Thalassemia International Federation Publications*. Vol 2; 2005.