



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ NAPOCA**

FACULTATEA DE MEDICINĂ

**ASPECTE HEMATOLOGICO - BIOCHIMICE ÎN
BETA -TALASEMIA MINORĂ ȘI CORELAREA
ACESTORA CU MUTAȚII DE LA NIVELUL
GENELOR BETA-GLOBINEI ȘI HFE**

REZUMAT

Conducător științific:

Prof.univ.dr. Ioan Victor POP

Doctorand:

Miruna Iulia ANTONESEI

Cluj Napoca

2009

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

Introducere	1
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	2
I.1. Beta-talasemia – Definiție. Istoric.....	2
I.2. Epidemiologie.....	5
I.3. Fiziopatologia beta-talasemiilor	7
3.1. Hemoglobina umană normală	7
3.1.1. Structură.....	7
3.1.2. Funcție.....	12
3.1.3. Relația structură – funcție	12
3.1.4. Controlul genetic și sinteza hemoglobinei	13
3.2. Patologia moleculară a beta – talasemiilor	20
3.2.1. Mutații care afectează nivelul transcripției	22
3.2.2. Mutații care afectează procesarea ARN.....	22
3.2.3. Mutații care afectează translația ARN	23
3.2.4. Producția de lanțuri beta – globinice instabile	24
3.2.5. Mutații de cap – site	24
3.2.6. Mutații ale site-ului de poliadenilare	25
3.2.7. Deleții.....	25
3.2.8. Mutații silențioase.....	25
3.3. Corelația genotip – fenotip.....	26
I.4. Screening-ul și diagnosticul beta – talasemiilor.....	34
4.1. Diagnosticul clinic și paraclinic al diferitelor forme de beta – talasemie	34
4.1.1. Beta – talasemia majoră	34
4.1.2. Beta – talasemia intermedia	36
4.1.3. Beta – talasemia minoră.....	37
4.1.4. Beta – talasemia silențioasă	38
4.2. Strategii de screening.....	38
4.3. Tehnici generale de identificare a purtătorilor de mutații beta – talasemice	40
4.4. Tehnici speciale de diagnostic	42
4.5. Diagnostic prenatal	45
I.5. Profilaxia și tratamentul beta – talasemiei.....	49
5.1. Importanța profilaxiei primare	49
5.2. Componentele profilaxiei primare	50

5.3. Tratamentul diferitelor forme de beta – talasemie	58
5.3.1. Beta – talasemia majoră	58
5.3.2. Beta – talasemia intermedia	65
5.3.3. Beta – talasemia minoră și beta – talasemia silențioasă	66
5.4. Prognostic	66
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	68
II.1. Ipoteza de lucru	68
II.2. Obiective	71
II.3. Material și metode de lucru	72
II.4. Rezultate	90
4.1. Evaluarea lotului din punct de vedere al unor parametri generali	90
4.2. Profilul hematologic și biochimic al beta – talasemiei minore	97
4.3. Aspecte genetice în beta – talasemia minoră	150
II.5. Discuții	181
5.1. Principalele dificultăți de diagnostic la pacienții din lotul studiat	181
5.2. Caracterizarea profilului hematologic și biochimic al beta – talasemiei minore	184
5.3. Aspecte genetice în beta – talasemia minoră	199
II.6. Concluzii	207
III. LISTĂ DE ABREVIERI	209
IV. REFERINȚE	210

Cuvinte cheie: beta talasemie, screening, profilaxie, indici eritrocitari, electroforeza hemoglobinei, diagnostic molecular

Introducere

Am ales ca studiu aspectele hematologice și biochimice în beta-talasemia minoră, tocmai datorită faptului că s-a constatat o creștere a numărului persoanelor cu această patologie. Mai mult decât atât, am încercat prin metode specifice genetice corelarea mutațiilor de la nivelul genelor beta-globinei și HFE cu aceste aspecte fenotipice. Considerăm că este foarte importantă realizarea unui screening bazat pe valorile indicilor eritrocitari în cabinetele de medicină de familie, la nivelul medicinei primare care dă posibilitatea depistării celor care sunt purtători ai genei tarate. Insistăm asupra depistării precoce a bolii pentru a putea realiza un tratament corespunzător și posibilitatea acordării sfatului genetic.

Stadiul actual al cunoașterii

Beta talasemiile reprezintă afecțiuni genetice cu transmitere autosomal recesivă determinate de incapacitatea sintezei β -globinei, prin reducerea cu 5-30% (β^+) sau absența (β^0) sintezei lanțurilor β ale hemoglobinei (Hb), determinând un exces relativ de lanțuri α .

În 1925, Thomas B. Cooley descrie pentru prima dată entitatea cunoscută acum ca talasemie. Termenul de anemie mediteraneană a fost propus de Whipple, într-o vreme în care cazurile cunoscute proveneau din familii italiene și grecești. Hemoglobinopatiile constituie un model privilegiat în patologia moleculară, datorită condițiilor ideale întrunite pentru studiul acestora.

Se estimează că 1,5% din populația lumii sunt purtători ai tării β talasemice, adică cel puțin 80-90 milioane de oameni, cu o estimare de 60.000 de nou-născuți homozigoți pe an. Distribuția heterozigoților este inegală, fiind mai frecventă în zonele calde și umede cu climat ecuatorial, musonic sau de tip mediteranean și rare în zonele cu climat uscat. În România prevalența este mică, dar în creștere, ceea ce constituie unul dintre motivele abordării acestui subiect.

Hb este un tetramer cu greutatea moleculară de 64,5 kDa, format din patru lanțuri polipeptidice (două lanțuri α și două lanțuri β), fiecare lanț având atașată printr-o legătură covalentă o grupare prostetică (hem) formată dintr-un complex de protoporfirină IX și o moleculă de fier. Structura primară a fiecărui lanț de globină este formată din secvențe de aminoacizi. Relația dintre aminoacizii adiacenți de-a lungul lanțului permite interacțiuni care au ca rezultat două configurații ale structurii secundare: α helix sau β pliere. Prin interacțiuni între aminoacizii din diferite poziții ale catenelor, acestea capătă spontan o configurație tridimensională, spațială, care reprezintă structura terțiară a Hb. Structura cuaternară se referă la relația dintre cele patru subunități ale Hb. La om sunt opt loci diferiți care codifică șase tipuri de lanțuri de globină. În plus sunt cel puțin patru pseudogene care au secvențe similare celorlalte gene globinice, dar diferă de acestea prin faptul că nu sunt exprimate în proteine globinice. Genele β - like formează o familie de gene (cluster) la extremitatea distală a brațului scurt al cromozomului 11 (11p15.5). Acestea sunt cinci gene funcționale, aranjate în ordinea dezvoltării după formula $5' - \epsilon - \gamma^G - \gamma^A - \psi\beta - \delta - \beta - 3'$. Nivelul de expresie a genelor familiei β variază în cursul dezvoltării ontogenetice. Gena ϵ este activă exclusiv în viața embrionară, genele γ sunt active în viața fetală, cu un raport $\gamma^G:\gamma^A=3:1$, care se schimbă după naștere, 2:3. Gena β începe să se exprime la sfârșitul primului trimestru de viață intrauterină, atingând nivelul maxim la câteva săptămâni după naștere. Gena δ este activă după naștere la nivele de

exprimare foarte mici. Această secvență temporală corespunde aranjamentului spațial al diferitelor gene în direcția 5'→3'.

Distribuția geografică a mutațiilor responsabile de β talasemii nu este uniformă la nivelul populațiilor umane. În general, o mutație dată se întâlnește doar în mijlocul aceleiași populații și invers, aceeași populație poate prezenta o varietate de mutații diferite. Cazul populațiilor mediteraneene ilustrează aceste două posibilități prin heterogenitatea alelică a β talasemiilor. Sunt cunoscute aproximativ 200 de tipuri de mutații diferite sau inserții/deleții mici de secvențe ADN în și în jurul genei de β globină, împreună cu un număr mic de deleții genice de la 25 pb la 67 pb.

Ideea că mutațiile de la nivelul genei HFE ar fi mai frecvente la populația purtătoare a unei mutații la nivelul genei β -globinei și că interacțiunea între β -talasemie și hemocromatoza ereditară (HE) ar putea crește încărcarea cu fier a organismului care prezintă ambele tipuri de mutații au făcut obiectul a numeroase studii.

Manifestările clinice ale β talasemiilor sunt extrem de diverse, acoperind un larg spectru, de la statusul de dependent de transfuzii al β talasemiei majore, la cel asimptomatic al trăsăturii β talasemice.

Insistăm pe utilitatea efectuării screeningului, scopul screening-ului fiind de a identifica purtătorii mutațiilor β talasemice, pentru a evalua riscul unor cupluri de a avea copii bolnavi și de a oferi informații despre opțiunile disponibile pentru a evita această eventualitate. Ideal, screeningul ar trebui realizat înainte de sarcină. Electroforeza Hb este metoda care, în majoritatea cazurilor, pune diagnosticul de trăsătură β talasemică, deși au fost studii care au demonstrat că valori de graniță (3,1-3,9%) ale Hb A₂ nu sunt așa de rare, mai ales în populațiile cu o mare prevalență a β talasemiei, sugerând necesitatea diagnosticului molecular la acești indivizi, mai ales dacă partenerul este purtător al unei mutații β talasemice.

Tratamentul beta talasemiei include: tratament substitutiv, tratament chelator, suplimentare vitaminică, splenectomia, transplantul alogenic de măduvă și alte metode terapeutice în studiu (terapia genică, manipularea farmacologică a Hb F).

Contribuții personale

Obiective

1. Determinarea prevalenței β -talasemiei minore la nivelul populației din județul Cluj.
2. Precizarea dificultăților de diagnostic la pacienții din lotul studiat.
3. Analiza profilului hematologic și biochimic al cazurilor luate în studiu și evidențierea corelațiilor existente între parametri analizați.
4. Analiza modului de transmitere a genei mutante și diagnosticul molecular al mutațiilor de la nivelul genei β -globinei în lotul studiat.
5. Diagnosticul molecular al mutațiilor de la nivelul genei HFE și stabilirea influenței acestora asupra statusului fierului în organism.
6. Precizarea posibilităților de ameliorare a diagnosticului β -talasemiei minore la nivelul asistenței primare.

Material și metodă

Lucrarea prezintă rezultatele unui studiu descriptiv-analitic.

Am conceput studiul în două părți. În prima parte ne-am propus realizarea eșantionului reprezentativ și analiza acestuia din punct de vedere al unor parametri generali, hematologici și biochimici, iar în a doua parte analiza aspectelor genetice ale lotului. *Populația disponibilă* pentru acest studiu a fost reprezentată de pacienții care au

solicitat asistență medicală într-un cabinet din Centrul Clinic de Diagnostic și tratament-Pediatrie din Cluj-Napoca (1421 de pacienți) și 1081 de pacienți aflați în evidența unui cabinet de medicină de familie din Cluj-Napoca. Am realizat un screening la nivelul acestor 2502 de pacienți prin analiza variabilelor VEM și CHEM, pe cei cu valori scăzute i-am selectat și am recomandat efectuarea electroforezei Hb. În urma acestui screening am selectat un lot de 21 de pacienți, la care am adăugat 10 pacienți aflați în evidența Clinicilor de Pediatrie I și Hematologie.

Caracteristicile pacienților urmărite în cadrul primei părți a studiului au fost: sexul, vârsta în momentul diagnosticului, tratamente anterioare cu fier, examenul hematologic periferic, electroforeza hemoglobinei, teste biochimice, indicele Mentzer.

În cea de-a doua parte a studiului, pentru lotul de 31 de pacienți incluși în lotul de studiu a fost efectuat diagnosticul molecular pentru depistarea unor mutații la nivelul genei care codifică β -globina, precum și evidențierea asocierii unor eventuale mutații la nivelul genei HFE. Pentru toți subiecții selectați a fost alcătuit arborele genealogic, a fost izolat ADN-ul genomic (după un prealabil consimțământ informat, standardizat și acceptat în scris, sub semnătură). Ulterior a fost amplificată gena β -globinei cu tehnica ARMS-PCR pentru detecția următoarelor mutații: IVS I-110 (G→A), cd 39 (C→T), IVS II-745 (C→G), IVS I-1 (G→A), -87 (C→G). De asemenea a fost utilizată tehnica PCR-RFLP pentru amplificarea genei HFE și determinarea următoarelor mutații: C187G (H63D), A193T (S65C), G845A (C282Y).

În cercetarea statistică s-au utilizat calcule descriptive și procentuale în funcție de natura variabilelor studiate (variabile cantitative sau calitative). De asemenea pentru extrapolarea rezultatelor s-a folosit calculul de semnificații (testele Student cu variații egale sau inegale, testul Mann-Whitney, testul Z pentru frecvențe).

Rezultate

Capitolul de rezultate detaliază datele obținute în acord cu obiectivele tezei. În prima secțiune sunt evaluate datele referitoare la parametrii generali: vârsta în momentul diagnosticului, sexul, tratamente anterioare cu fier. Referitor la vârsta pacienților incluși în lot, s-au constatat următoarele: vârsta medie a pacienților în momentul diagnosticului a fost de 24 de ani, jumătate din cazuri au fost diagnosticate după vârsta de 20 de ani. Repartiția pe sexe în cadrul lotului a fost relativ uniformă, 45% dintre subiecți fiind bărbați și 55% femei. În privința tratamentului cu fier anterior diagnosticului, am insistat pe faptul că majoritatea pacienților (84%) au primit tratamente cu fier ca rezultat al unui diagnostic greșit.

Secțiunea a doua a acestui capitol expune rezultatele referitoare la profilul hematologic și biochimic al beta talasemiei minore, prin evaluarea hemoglobinei, hematocritului, numărului de hematii, reticulocitelor, VEM, HEM, CHEM. Deși β -talasemiile sunt definite ca anemii, la 26% dintre pacienți nivelul Hb a fost normal. Analizând repartiția nivelului Hb la copii, femei, bărbați, observăm că cel mai mare număr de pacienți cu valori scăzute ale nivelului Hb sunt în rândul femeilor (90,9%), copiii urmând femeilor, cu valori scăzute ale Hb la un procent de 71,43%, iar dintre bărbați, jumătate au avut valori scăzute ale Hb, iar jumătate valori normale. Valoarea cea mai scăzută a seriei a fost 9,6 g/dl.

Și în cazul Ht au fost 9 pacienți cu valori normale ale acestui indicator.

În lotul studiat 48% dintre cazuri au prezentat un număr crescut de hematii, distribuția acestora fiind egală între femei și bărbați, predominând la copii (7 cazuri).

Fenotipul clasic al heterozigoților purtători ai unei mutații la nivelul genei β -globinei este caracterizat prin reducerea VEM și HEM și creșterea Hb A₂. Pe aceste considerente ne-am bazat pentru prima parte a studiului, în care am selectat pacienții cu VEM și HEM scăzute, caracteristici menținute în toate hemoleucogramele pacienților până în acel moment. Deși sunt autori care susțin că un screening primar ar trebui să includă și electroforeza Hb (deoarece cazurile cu VEM, HEM normale și Hb A₂ crescută ar putea scăpa screeningului), am ales metoda de screening primar bazat pe valorile VEM și HEM. Suntem în acord cu părerea specialiștilor care susțin că un astfel de screening este mai adecvat pentru țări cu o prevalență scăzută a β -talasemiei, în timp ce un screening complet care să conțină și electroforeza Hb ar trebui aplicat în țările unde prevalența β -talasemiei este mare, sau unde β -talasemia coexistă în proporții ridicate cu α -talasemia, ceea ce ar duce la normalizarea indicilor.

Am demonstrat în cadrul studiului nostru că valorile CHEM nu sunt un parametru eficient în cadrul screeningului, valoarea medie a CHEM fiind de 31,62 g/dl (sub valoarea normală minimă), dar 25% dintre cazuri au avut valori normale ale CHEM (cuartila 3=32,2 g/dl), diferențele dintre valorile medii ale femeilor și bărbaților din lot nefiind semnificative statistic.

Considerăm că trebuie acordată o atenție deosebită analizei statusului fierului în cadrul lotului studiat. La analiza lotului în ansamblu, observăm o pondere mai mare a cazurilor cu sideremie scăzută (12,9%), decât a celor cu sideremie crescută (6,45%), deși talasemia este definită ca o formă de anemie normo sau hipersideremică.

Beta talasemia este cunoscută ca o condiție care crește depozitele de fier ale organismului, dar acest lucru se pare că nu este valabil întotdeauna în cazul β -talasemiei minore, doar trei dintre bărbații din lot având valori crescute ale feritinei. Repartiția valorilor medii ale feritinei pe subloturi de bărbați, femei, copii, ne arată diferențele în ceea ce privește valoarea acesteia, fiind mult mai scăzută în cazul copiilor și femeilor (30,35 ng/ml, respectiv 49,63 ng/ml) decât în cazul bărbaților (328,03 ng/ml).

Nivelul Hb A₂ a reprezentat criteriul de includere în studiu. Valoarea medie a Hb A₂ în cadrul lotului a fost 4,62%. A fost subliniat faptul că o singură valoare la limită a Hb A₂ nu exclude diagnosticul de beta talasemie minoră, mai ales în condițiile unui deficit asociat de fier.

Analizând valorile indicelui Mentzer în lotul studiat, s-a observat valoarea medie a șirului de 11,51 (aflată în limita valorilor sugestive pentru β -talasemie), dar folosirea lui ca indicator de screening în selectarea lotului studiat ar fi dus la omiterea a 8 pacienți, ceea ce îl face inefficient în cadrul activităților de screening populațional.

În a treia secțiune a acestui capitol se redau rezultatele referitoare la aspectele genetice în beta talasemia minoră. Se analizează modul de transmitere a mutației de la nivelul genei beta-globinei. Dintre cele cinci mutații de la nivelul genei β -globinei pentru care s-au efectuat testele moleculare, singurele diagnosticate în lotul studiat au fost IVS I-110 (G→A) și IVS II-745 (C→G), în proporții egale. Au fost analizați comparativ parametrii hematologici pentru pacienții cu mutație IVS I-110 (G→A), respectiv IVS II-745 (C→G), rezultatele studiului nostru confirmând încadrarea acestor două mutații în cadrul mutațiilor β^+ severe.

În cadrul studiului am diagnosticat un pacient cu mutație C282Y, unul cu mutație S65C și 8 cu mutație H63D, frecvența aleică în lotul studiat fiind de 1,61% pentru C282Y, 1,61% pentru S65C, respectiv 12,9% pentru H63D. Nu am diagnosticat

nici un homozigot sau heterozigot compus pentru nici una dintre aceste mutații. Rezultatele studiului nostru arată că prevalența mutațiilor de la nivelul genei HFE în populația generală nu diferă semnificativ statistic față de prevalența mutațiilor din gena HFE la populația purtătoare a unei mutații la nivelul genei β -globinei. Studiul nu a arătat diferențe semnificative între nivelele medii ale sideremiei și feritinei pentru cele două grupuri (cu mutații asociate la nivelul genei HFE și fără mutații la nivelul acestei gene).

Analiza variațiilor fenotipice intrafamiliale au demonstrat faptul că încărcarea cu fier la heterozigoții pentru o mutație β -talasemică depinde mai mult de statusul fiziologic asociat sexului (sexul feminin fiind protejat față de supraîncărcarea cu fier, hiposideremia nefiind un eveniment foarte rar la pacientele cu β -talasemie heterozigotă) sau de patologiile asociate (microhemoragii) decât de tipul mutațiilor β -talasemice sau de coexistența mutațiilor asociate la nivelul genei HFE.

Concluzii

- Prevalența β -talasemiei minore în județul Cluj este de 8,4%.
- Peste jumătate dintre pacienți au fost diagnosticați tardiv, după vârsta de 25 de ani.
- În lotul analizat a predominat sexul feminin (55%), la acesta constatându-se și valori mai scăzute ale hemoglobinei.
- Majoritatea pacienților (84%) au primit anterior diagnosticului tratament cu preparate de fier.
- Analizând parametrii hematologici am constatat că un procent de 26% dintre pacienți aveau valori normale ale hemoglobinei și aproape jumătate (48%) au prezentat număr crescut de hematii.
- Indicii eritrocitari VEM și HEM au fost scăzuți la toți pacienții incluși în lot, fiind parametrii de bază pentru screening. Valorile lor nu au fost influențate de parametrii metabolismului fierului (sideremie, feritină). CHEM nu reprezintă un parametru util pentru screening.
- Studiul metabolismului fierului a relevat valori normale ale sideremiei la majoritatea pacienților, existând însă și cazuri cu sideremie scăzută și feritina la limita inferioară a normalului.
- Folosit ca și criteriu de includere în studiu, nivelul Hb A₂ a fost crescut la toți pacienții, dar în fața unui tablou clinic și hematologic sugestiv pentru β -talasemie minoră, valorile la limita superioară a normalului nu exclud diagnosticul, impunându-se repetarea investigațiilor sau/și diagnosticul molecular.
- Nu am putut stabili corelații între Hb A₂ și nici un alt parametru studiat.
- Valoarea diagnostică a indicelui Mentzer în β -talasemia minoră este limitată.
 - Dintre mutațiile studiate, raportate de studiile anterioare ca fiind cele mai frecvente în România, am diagnosticat doar 5 alele cu mutația IVS I-110 (G→A) și 5 alele cu mutația IVS II-745 (C→G).
- Parametrii hematologici și biochimici studiați nu au variat semnificativ în funcție de tipul mutației, ambele mutații fiind încadrate ca β^+ severe.
- În lotul studiat am diagnosticat 8 pacienți cu mutația H63D și câte unul cu mutațiile C282Y, respectiv S65C la nivelul genei HFE.
- Diferențele între prevalența mutațiilor de la nivelul genei HFE în populația generală comparativ cu populația heterozigotă pentru β -talasemie nu au fost semnificative.
- Studiul nu a arătat diferențe semnificative ale parametrilor metabolismului fierului între pacienții cu mutații la nivelul genei HFE și cei fără aceste mutații.

CURRICULUM VITAE

Nume: Antonesei
Prenume: Miruna Iulia
Data nașterii: 11.08.1972
Locul nașterii: Victoria, Jud. Brașov, România
Cetățenia: română
Stare civilă: căsătorită
E-mail: mipase2005@yahoo.com

Studii:

2005-prezent Doctorand
Conducător științific: Prof. Univ.Dr. Ioan Victor Pop
Titlul tezei: Aspecte hematologico-biochimice în beta-talasemia minoră și corelarea acestora cu mutații de la nivelul genelor beta-globinei și HFE
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România

2000-2003 Medic rezident Medicină de Familie
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România-Spitalul Clinic de Adulți

1992-1998 Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România
Diplomă de Licență, profilul Medicină, specializarea Medicină Generală
Calificarea: doctor-medic

1987-1991 Liceul de informatică, Brașov, România
Calificare: operator, programator, analist-ajutor

Experiența profesională:

2004-prezent Asistent universitar
Catedra de Medicină de Familie
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România

2004-prezent Medic specialist medicină de familie
Cabinet Medical Normed Serv

2003-2004 Medic specialist medicină de familie
Asociația de Ajutor Familiar Asistmed, Cluj-Napoca, România

2003-2004 Membru în echipa de proiect „Centru de îngrijire la domiciliu” derulat în cadrul unui proiect Phare 2001 parteneri: Asociația de Ajutor Familiar Asistmed, Primăria Municipiului Gherla, Direcția de Sănătate Publică a județului Cluj, AJOFM Cluj

2000-2003 Medic rezident
Specialitatea medicină de familie
Spitalul Clinic de Adulți, Cluj-Napoca, România

1999 Medic stagiar
Spitalul Clinic de Adulți, Cluj-Napoca, România

Specializări și calificări:

- 1991 Diplomă de Bacalaureat, Liceul de informatică, Brașov, România
Ministerul Învățământului și Științei, Seria J, Nr. 38173
- 1998 Diplomă de Licență, Titlul de DOCTOR-MEDIC
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România
Ministerul Educației Naționale, Seria R, Nr. 0026608
- 2001 Adeverință curs-Îngrijiri paleative la domiciliu
Asociația de Ajutor Familiar Asistmed
- 2000 Certificate: Type 2 Diabetes and its Complications
„Nicolae Paulescu” Advanced Postgraduate Course for Eastern Europe
European Association for the Study of Diabetes
- 2003 Adeverință curs-Urgențe medico-chirurgicale
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România
- 2003 Adeverință medic specialist, specialitate medicină de Familie
Confirmare în specialitate prin Ordinul Ministrului Sănătății nr. 4606/2003
Certificat seria A, Nr. 13825
- 2006 Certificat de absolvire a cursurilor de educație medicală, ciclul II
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România
- 2006 Certificat de absolvire Curs Postuniversitar-Impactul Geneticii în Patologia Umană
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România
- 2007 Atestat de Studii Complementare în ULTRASONOGRAFIE GENERALĂ
Ministerul Sănătății Publice, Centrul Național de Perfecționare în Domeniul
Sanitar București, România
Seria C, Nr. 019628
Data eliberării: 15 iunie 2007, Nr. De înregistrare 21548

Membru al asociațiilor profesionale:

Colegiul Medicilor, 1999
Societatea Română de Genetică Medicală, 2006

Limbi străine cunoscute:

Engleză (scris, vorbit, citit)

Activitate științifică:

Articole:

1. Antonesei M, Domnița S, Pop IV. Tendințe actuale în abordarea beta talasemiilor, Clujul Medical 2006;LXXIX,3:289-293.
2. Antonesei M, Domnița S, Pop IV. Aspecte clinico-biologice și evolutive în beta-talasemia minoră. Clujul Medical 2009;LXXXII(2):237-241.

Congres național cu participare internațională

1. Antonesei M, Domnița S. Aspecte clinico-biologice și evolutive în beta talasemia minoră la copil. Al II-lea Congres Național de Genetică Medicală 2006, 20-23 septembrie, Cluj-Napoca, România.
2. Domnița S, Antonesei M. Hemoglobinopatie heterozigotă cu hemoglobină Lepore-prezentare de caz. Al II-lea Congres Național de Genetică Medicală 2006, 20-23 septembrie, Cluj-Napoca, România.

Participare la Congrese Naționale: 5**Contribuții didactice:**

Antonesei M. Conținutul examenului obiectiv pe grupe de vârstă. În: Oprea S. Ghidul practicii de vară pentru studenții din anii I și IV. Tipografia Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 2008.



**“IULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY
CLUJ NAPOCA**

FACULTY OF MEDICINE

**HEMATOLOGIC AND BIOCHEMICAL ASPECTS IN
BETA-THALASSEMIA MINOR AND THEIR
CORRELATION WITH BETA-GLOBIN AND HFE
GENE MUTATIONS**

ABSTRACT

Scientific coordinator:

Prof. univ. dr. Ioan Victor POP

Ph.D. Student:

Miruna Iulia ANTONESCI

Cluj Napoca

Content of the doctoral thesis

Introduction.....	1
I. Current stage of knowing.....	2
I.1. Beta-thalassemia- Definition. History.....	2
I.2. Epidemiology.....	5
I.3. Physiopathology of beta-thalassemia.....	7
3.1. Normal human hemoglobin.....	7
3.1.1 Structure.....	7
3.1.2. Function.....	12
3.1.3. Structure-Function Relationships.....	12
3.1.4. Genetic control and hemoglobin synthesis.....	13
3.2. Molecular pathology of the beta-thalassemia.....	20
3.2.1. Transcriptional mutations.....	22
3.2.2. RNA processing mutations.....	22
3.2.3. RNA translation mutations.....	23
3.2.4. Production of unstable beta chain variants.....	24
3.2.5. Cap site mutations.....	24
3.2.6. Polyadenylation site mutations.....	25
3.2.7. Gene deletions.....	25
3.2.8. Silent mutations.....	26
3.3. Genotype- phenotype correlation.....	26
I.4. Screening and diagnosis of the beta-thalassemia.....	34
4.1. Clinical and paraclinical diagnosis of different forms of beta-thalassemia.....	34
4.1.1. Beta- thalassemia Major.....	34
4.1.2. Beta- thalassemia Intermedia.....	36
4.1.3. Beta- thalassemia Minor.....	37
4.1.4. Silent form of beta- thalassemia.....	38
4.2. Screening strategies.....	38
4.3. General techniques for beta-thalassemia carrier identification.....	40
4.4. Specialised diagnostic techniques.....	42
4.5. Prenatal diagnosis.....	45
I.5. Prophylaxis and treatment of beta-thalassemia.....	49
5.1. Importance of the primar prophylaxis.....	49
5.2. Components of the primar prophylaxis.....	50
5.3. Treatment of different forms of beta-thalassemia.....	58
5.3.1. Beta- thalassemia Major.....	58
5.3.2. Beta- thalassemia Intermedia.....	65
5.3.3. Beta- thalassemia Minor and Silent form of beta- thalassemia.....	66
5.4. Prognostic.....	66
II. Personal contributions.....	68
II.1. Working hypothesis.....	68
II.2. Objectives.....	71
II.3. Materials and working methods.....	72
II.4. Results.....	90
4.1. The lot evaluation from the point of view of some general parameters.....	90

4.2. The hematological and biochemical profile of the minor beta-thalassamia	97
4.3. Genetic aspects in the minor beta-thalassemia	150
II.5. Discussions	181
5.1. Diagnosis main difficulties at the patients of the studied lot	181
5.2. Characterization of hematological and biochemical profile of the minor beta-thalassemia	184
5.3. Genetic aspects in the minor beta-thalassemia	199
II. 6. Conclusions	207
III. Abbreviations list	209
IV. References	210

Key words: beta-thalassemia, screening, prophylaxis, red cell indices, hemoglobin electrophoresis, molecular diagnosis

Introduction

I chose to study the hematological and biochemical aspects in the minor beta-thalassemia, the fact being the increasing number of persons suffering of this pathology. More than that, I tried, by genetic specific methods, to correlate the mutations from the level of the beta-globin and HFE genes with these phenotypic aspects. We consider that is very important the achievement of a screening based on the values of the red cell indices in the family medicine cabinets, at the level of the primal medicine which gives the possibility to trace those people which are run gene carriers. We insist over the early tracking of the disease for establish a right treatment and the possibility to give a genetic advise.

Current stage of knowing

The beta-thalassemia represents a genetic affection with a recessive autosomal transmission determinates by the incapacity of the β -globin synthesis, through the decrease with 5-30% (β^+) or the absence (β^0) of the synthesis of the hemoglobin β chains (Hb), leading to a relative excess of α chains.

In 1925, Thomas B. Cooley described for the first time the entity knows in our days as thalassemia. The term of Mediterranean Anemia was proposed by Whipple, in a period when the recorded cases came from Italian and Greek families. The hemoglobinopathies represent a privileged model in the molecular pathology, due to the ideal conditions achieved for their study.

It is estimated that 1, 5% of the worldwide population are carriers of the β thalassemic trait, meaning 80-90 millions of people, with an estimation of 60.000 homozygote new born. The heterozygote distribution is not equal, being more frequent in the hot and humid areas with an equatorial, monsoon or Mediterranean climate and rare in the area with a dry climate. In Romania the prevalence is low, but in continuous increasing, which represents one of the reasons of this subject approach.

Hb is a tetramer with a molecular weight of 64, 5 kDa, composed by four polipeptidic chains (two α chains and two β chains), every chain having attached through a covalent link a prosthetic group (hem) composed by a complex of protoporphyrin IX and a molecule of iron. The primal structure of every globin chain is formed by sequences of amino acids. The relation between the adjacent amino acids over the chain allows interactions which have as a result two configurations of the secondary structure: α helix or β folding. By interactions between the amino acids from different positions of the chains, these spontaneous acquire a tridimensional, spatial configuration which represents the Hb third structure. The quaternary structure appertains to the four sub-units of the Hb. In humans there are eight different loci that codify six types of globin chains. There are at least four pseudo genes which have sequences similar to the other globin genes, but they differ from the fact that they aren't expressed in protein product. The β - like genes form a gene family (cluster) at the distal extremity of the short brace of the 11 chromosome (11p15.5). These are five functional genes, arranged in the development order after the formula $5' - \epsilon - \text{}^G\gamma - \text{}^A\gamma - \psi\beta - \delta - \beta - 3'$. The expression level of the β family genes change during the ontogenetically development. The ϵ gene is active exclusively during the embryonic life, the γ is active during the fetal life, with a rapport of $\text{}^G\gamma:\text{}^A\gamma=3:1$, which changes after birth, 2:3. The β gene starts to express her at the end of the first trimester of the intrauterine life, touching the maximum level at a few weeks

after the birth. The δ is active at the lowest expression level. This temporal sequence corresponds to the spatial arrangement of the different genes in the 5'→3' direction.

The geographic distribution of the mutations responsible by the β thalassemia isn't uniform at the level of human populations. Generally speaking, a certain mutation can be found only in the middle of the same population or opposed; the same population can present a variety of different mutations. The case of the Mediterranean populations illustrated those two possibilities through the allelic heterogeneity of the β thalassemia. There are known almost 200 types of different mutations or insertions/deletions of small DNA sequences in and around the β globin gene, together with a small number of gene deletions from 25 pb at 67 pb.

The idea that the mutations from the level of the HFE gene are more frequent at the population carrier of a mutation of the β -globin gene and that the interaction between the β -thalassemia and the hereditary hemochromatosis (HE) could grow the loading of the organism with iron, which presents both types of mutations made the object of different studies.

The clinical manifestations of the β thalassemias are extremely different, covering a huge spectrum, from the dependent status of transfusions of the major β -thalassemia, to that asymptomatic of the β -thalassemia trait.

We insist upon the usefulness of the screening effectuation, the screening purpose being to identify the carriers of β -thalassemic mutations, to evaluate the risks of some couples to born ill children and to offer information about the available options for avoiding this eventuality. Ideal, the screening shall be done before the pregnancy. The Hb electrophoresis represents the method, which in most of the cases, indicates the diagnosis of β -thalassemic trait, although there have been studies which proved that the borderline values (3,1-3,9%) aren't so rare, especially at the population with a big prevalence of β -thalassemia, suggesting the necessity of a molecular diagnosis for those persons, mostly if the partner is a carrier of the β -thalassemia mutation.

The treatment of the β -thalassemia includes: substitutive treatment, chelation treatment, supplement of vitamins, splenectomy, allogeneic hematopoietic transplantation and others therapeutically methods in study (gene therapy, pharmacological manipulations of Hb F).

Personal contributions

Objectives

1. The determination of the prevalence of the β -thalassemia minor at the level of Cluj population.
2. Definition of the diagnosis difficulties of the patients from the studied lot.
3. The analysis of the hematological and biochemical profile of the studied cases and the prominence of the existed correlations between the analyzed parameters.
4. Analyze the way of transmission of the mutant gene and the molecular diagnosis of the mutations from the level of the β -thalassemia gene at the studied lot.
5. The molecular diagnosis of the mutations from the level of the HFE gene and establishment of their influences over the iron status of the human body.
6. Definition of the mend possibilities of the β -thalassemia minor diagnosis at the level of the primar assistance.

Materials and methods

The hereby paper presents the results of a descriptive-analytic study.

We create the study in two parts. In the first part we try to create a representative sample and his analysis from the point of view of some general, hematological and biochemical parameters, and in the second part the analysis of the genetic aspects of the lot. *The available population* for this study was represented by patients which requested medical assistance in a cabinet of the Clinical Center of Diagnosis and Treatment Pediatrics from Cluj-Napoca (1421 patients) and 1081 patients put in the spot of a family medicine cabinet from Cluj-Napoca. We made a screening at the level of those 2502 patients through the analysis of the MCV and MCH variables, we selected those with low values and we recommended the implementation of the Hb electrophoresis. Behind this screening we selected a lot of 21 patients; we added 10 patients put in the spot of the Pediatrics I and Hematology Clinics.

The followed characteristics of the patients in the first part of the study were: sex, age in the moment of diagnosis, previous treatments with iron, hematological features, electrophoresis of the hemoglobin, Mentzer index.

In the second part of the study, for the 31 patients lot included in the study, the molecular diagnosis was made for tracking some mutations at the level of the gene which codifies the β -globin, also the prominence of some eventual mutations at the level of the HFE gene. For all the selected subjects was made the pedigree, the genomic DNA was isolated (after a prior informed, standardized and accepted in written, under signature, approval). After that the gene of the β -thalassemia was enhanced with the ARMS-PCR technique for the detection of the following mutations: : IVS I-110 (G \rightarrow A), cd 39 (C \rightarrow T), IVS II-745 (C \rightarrow G), IVS I-1 (G \rightarrow A), -87 (C \rightarrow G). Also the technique PCR-RFLP was used for the HFE gene enhancement and determination of some mutations: C187G (H63D), A193T (S65C), G845A (C282Y).

In the statistical research descriptive and percentage calculus were used according to the nature of the studied variables (quantitative and qualitative variables). Also for the extrapolation results was used the signification calculus (Student with equal or non equal variations tests, Mann-Whitney test, Z test for frequencies).

Results

The results chapter detailed the obtained data according to the thesis objectives. In the first section are evaluated the data relative to the general parameters: sex, age in the moment of diagnosis, previous treatments with iron. Regarding the age of patients included in the lot, it was fund out the following: the medium age of the patients in the diagnosis moment was of 24 years, half of cases were diagnosed after the age of 20 years. The repartition on sexes, inside the lot, was relatively uniform, 45% of the subjects being men and 55% women. Regarding the treatment with iron previous to the diagnosis, we insisted upon the fact that most of the patients (84%) received treatments with iron as a result of a wrong diagnosis.

The second section of this chapter layout the results regarding the hematological and biochemical profile of the minor β -thalassemia, by the evaluation of the hemoglobin, haematocrit, number of erythrocytes, reticulocytes, MCV, MCH, MCHC. Although the β -thalassemia is defined as anemia, at 26% of patients the Hb level was normal. Analyzing the repartition of the Hb level at children, men and women we can notice that the biggest number of patients with Hb low values was at women (90,9%), children- with a

percentage of 71, 43%, and among men, half of them had Hb low values, and half of them normal. The lowest values of the series was of 9,6 g/dl.

Even in the case of Ht, 9 patients with normal values of this indicator were recorded.

In the suited lot, 48% of cases presented a growing number of erythrocytes, their distribution being equal between men and women, prevailing at children (7 cases).

The classical phenotype of heterozygotes which are carriers of a mutation of the β -globulin is characterized through the reduction of MCV and MCH and the growth of Hb A₂. We based the first part of our study on these aspects, where we selected patients with low MCV and MCH, characteristics which are, up to this moment, maintained in all the hemoleucograms of the patients. Although, there are authors who state that a primary screening should also include Hb electrophoresis (as the cases with normal MCV and MCH and an increased Hb A₂ could be omitted by the screening), we chose the primary screening method based on MCV and MCH values. We agree with those specialists opinion who consider that such a screening is more appropriate for countries with a low prevalence of β -thalassemia, while a full screening containing both Hb electrophoresis and red cell indices should be applied in countries where the prevalence of β -thalassemia is high, or where β -thalassemia coexists in high ratios with α -thalassemia, which would lead to the normalization of the indices.

In our study, we proved that MCCH values are not an efficient parameter in screening, as the average value of MCHC is 31.62 g/dl (under the normal minimal value), but 25% of the cases had normal MCHC values (quartile 3=32.2 g/dl), the difference between the average values for the women and men in the lot not being statistically significant.

We consider that special attention needs to be given to the analysis of iron status within the studied lot. In the analysis of the lot in general, we observe a higher percentage of cases with low serum iron value (12.9%), than of those with high serum iron value (6.45%), although thalassemia is defined as a form of normo or hypersideremic anemia.

Beta thalassemia is known as a condition which increases the organisms iron deposits, but it seems that this is not always the case for minor β -thalassemia, as only three men in the lot had high levels of ferritin. The repartition of average ferritin values on sublots of men, women and children shows us the differences concerning its value, which is much lower in case of children and women (30.35 ng/ml, respectively 49.63 ng/ml) as in the case of men (328.03 ng/ml).

The Hb A₂ level represented the criteria for integration in the study. The average Hb A₂ value within the lot was 4.62%. The fact that a single borderline value of Hb A₂ does not exclude the diagnostic of beta thalassemia minor, especially in case of an associated iron deficit, was highlighted.

Analyzing the values of the Mentzer index value in the studied lot, the average value of the 11.51 sequence (within the limit of the suggestive values for β -thalassemia) was noticed, however using it as a screening indicator in the selection of the studied lot would have lead to the omission of 8 patients, which makes it inefficient for the population screening activities.

In the third section of this chapter, the results regarding the genetic aspects in minor β -thalassemia are presented. The means of transmission of the mutation from the beta globin gene is being analyzed. From the five mutations of the β -globin gene, for which the molecular tests have been carried out, the only ones diagnosed in the studied lot were

IVS I-110 (G→A) and IVS II-745 (C→G), in equal proportions. The hematological parameters for patients with IVS I-110 (G→A), respectively IVS II-745 (C→G) mutation have been analyzed, and the results of our study confirmed the positioning of these two mutations in the category of severe β^+ mutations.

In our study, we diagnosed a patient with a C282Y mutation, one with a S65C mutation and 8 with H63D mutation, the allelic frequency within the studied lot being of 1.61% for C282Y, 1.61 % for S65C and 12.9% for H63D. We did not diagnose any homozygote or compound heterozygote for any of these mutations. The results of our study showed that the prevalence of the mutations of HFE gene in the general population does not differ statistically considerably from the prevalence of mutations of the HFE gene in the population which carries a mutation of the β -globin gene. The study does not show considerable differences between the average levels of serum iron and serum ferritin for the two groups (with associated mutation of the HFE gene and without mutations of these gene).

The analysis of intra-family phenotypic variations has proven the fact that the iron load in heterozygote for a β -thalassemic mutation depends more on the physiological status associated to gender (females being more protected from iron overload, low levels of serum iron not being a very rare event in female patients with heterozygote β -thalassemia) or on associated pathologies (micro-bleedings), than on the type of β -thalassemic mutation or on the coexistence of associated mutation in the HFE gene.

Conclusions

- The prevalence of the minor β -thalassemia in Cluj county is of 8,4%;
- Over half patients were tardily diagnosed, after the age of 25 years;
- In the analyzed lot predominated the feminine sex (55%), observing in the main time lower values of the hemoglobin;
- The majority of patients (84%) received before the diagnosis, treatments with iron;
- Analyzing the hematological parameters we noticed that a percentage of 26% of patients had normal values of hemoglobin and almost half (48%) presented a increasing number of erythrocytes;
- The MCV and MCH red cell indices were low at all the patients included in the lot, being the main parameters for screening. Their values weren't influenced by the parameters of the iron metabolism (serum iron, serum ferritin). MCHC doesn't represent a useful parameter for screening;
- The study of the iron metabolism relived normal values of the serum iron at most of patients, but also prevail some cases with low levels of serum iron and ferritin at the inferior limit of the normal;
- Used as a criteria of inclusion in the study, the Hb A₂ level was increased at all patients, but behind a clinical and hematological panel suggestive for the β -thalassemia minor, the values at the superior limit of normal don't exclude the diagnosis, imposing the repetition of the investigations or/and the molecular diagnosis.
- We couldn't establish correlations between Hb A₂ or another studied parameter;
- The diagnostic value of the Mentzer index in the minor β -thalassemia is limited;

- Among the studied mutations reported by the previous studies as being the most frequent in Romania, we diagnosed only 5 alleles with the IVS I-110 (G→A) mutation and 5 alleles with the IVS II-745 (C→G) mutation;
- The studied hematological and biochemical parameters didn't significantly varied according to the type of mutation, both mutations being enclosed as severe β^+
- In the studied lot we diagnosed 8 patients with the H63D mutation and one with the C282Y, respectively S65C mutations at the level of the HFE gene;
- The differences between the mutations prevalence from the level of the HFE gene in the general population comparative with the heterozygote population for the minor β -thalassemia was not significant;
- The study didn't demonstrate significant differences of the parameters of the iron metabolism between the patients with mutations at the level of the HFE gene and those without these mutations.

CURRICULUM VITAE

Last name: Antonesei

First name: Miruna Iulia

Date of birth: 11th August, 1972

Place of birth: Victoria, Brasov county, Romania

Nationality: romanian

Marital status: married

E-mail: mipase2005@yahoo.com

Academic Education:

2005-todate: PhD Student in Medicine

Scientific coordinator: Prof. Pop Ioan Victor, MD, PhD

PhD Thesis: Hematologic and biochemical aspects in beta thalassemia
minor and their correlations with beta globin and HFE gene mutations

„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania

2000-2003: Resident in Family Medicine

„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania-Clinical Hospital for Adults

1992-1998: „Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania

Faculty of Medicine

Licensed in Medicine, Specialisation: General Practitioner, Qualification:
Medical Doctor

1987-1991: IT Hight School, Brasov, Romania

Qualification: computer operator, programmer, assistant analyst

Professional Experience:

2004-to date: Teaching Assistant

Department of Family Medicine

„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania

2004-to date: Family Medicine Practitioner

Normed Serv Private Practice

2003-2004: Family Medicine Practitioner

Asistmed Family Aid Association, Cluj-Napoca, Romania

2003-2004: Team-member in the project „Homecare Center” part of a Phare 2001 Project
with partners: Asistmed Family Aid Association, Gherla City Major`s
Office, Public Health Institution of Cluj County, AJOFM Cluj

2000-2003: Resident

Speciality: Family Medicine

Clinical Hospital for Adults

1999-2000: Stagier Physician

Clinical Hospital for Adults

Specialisation and Competence:

- 1991: Bachelor Degree, IT High School, Brasov, Romania
Ministry of Science and Education, Diploma Series J, No 38173
- 1998: Licensed Diploma, Medical Doctor Degree
„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania
Romanian Ministry of Education, Diploma Series R, No 0026608
- 2000: Certificate: Type 2 Diabetes and its Complications
„Nicolae Paulescu” Advanced Postgraduate Course for Eastern Europe
European Association for the Study of Diabetes
- 2001: Training Certificate: Palliative Homecare
Asistmed Family Aid Association
- 2003: Training Certificate: medical and Surgical Emergencies
„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania
- 2003: Specialist in Family Medicine
Romanian Ministry of Health, Degree No 4606/2003
Certificate Series A, No 13825
- 2006: Pedagogical Training Certificate
„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania
- 2006: Training Certificate for post-graduate class: The Impact of Genetics in Human
Pathology
„Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Romania
- 2007: Ultrasound Certification
Romanian Ministry of Health
Certificate Series C, No 019628

Professional Affiliation:

- Romanian College of Physicians-1999
Romanian Association of Medical Genetics-2006

Language:

English (written, spoken, read)

Scientific Activities:**Articles:**

1. Antonesei M, Domnita S, Pop IV. Actual tendencies in approaching beta thalassemyas. Clujul Medical 2006;LXXIX,3:289-293.
2. Antonesei M, Domnița S, Pop IV. Clinical-biological and evolutive aspects in minor beta thalassemya. Clujul Medical 2009;LXXXII(2):237-241.

National Congres with international participations

1. Antonesei M, Domnița S, Pop IV. Clinical-biological and evolutive aspects in minor beta thalassemia in children. IInd National Congres of Medical Genetics 2006, September 20-23, Cluj-Napoca, Romania
2. Domnita S, Antonesei M. Heterozygotes hemoglobinopathies with Lepore hemoglobin-case presentation. IInd National Congres of Medical Genetics 2006, September 20-23, Cluj-Napoca, Romania

National Conferences:5**Educational contributions:**

Antonesei M. Contens of physical examination on age groups. In: Oprea S: Summer internship guide for Ist and Vth year students. „Iuliu Hatieganu” University of medicine and Pharmacy Typography, Cluj-Napoca, 2008