

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGIA



*"UNA APROXIMACIÓN ESTADÍSTICA AL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO  
DESCRIPTIVO DE LAS TALASEMIAS EN EL ÁREA SANITARIO-  
DEMOGRÁFICA 09 DE LA COMUNIDAD VALENCIANA"*

*PRESENTADA POR:  
MARIA ANTONIA MIRALLES CELMA*

*CURSO ACADÉMICO 1997-1998*

*PROF. D. JOSE DE LA HIGUERA TORRES-PUJOL  
D. GUILLERMO CAÑIGRAL FERRANDO*

## DEDICATORIA

A mis padres por su cariño, incondicional apoyo y dedicación, a los que debo todo lo que soy y pueda llegar a ser en la vida, por haberme inculcado, el amor al trabajo en beneficio de los demás y como engrandecimiento intelectual y moral personal.

A mi madre, que ya no puede compartir con nosotros este momento y que sé que desde donde ya descansa, no ha dejado de impulsar este proyecto.

A mi padre por haberme ayudado a mantener tras el fallecimiento de mi madre, la llama de ilusión y afán de superación que han hecho posible este momento.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

Tinción de Perls = Tinción de Perls.

CTST = Capacidad total de saturación transferrina.

VCM = Volumen Corpuscular Medio.

HCM= Hemoglobina Corpuscular Media.

CST = Capacidad Saturación Transferrina.

CTFH = Capacidad total de fijación transferrina.

IST = Índice de Saturación Transferrina.

HB = Hemoglobina.

HTo. = Hematocrito.

PHHF = Persistencia hereditaria de Hb. Feral.

Hb F = Hemoblobina Fetal.

RE = recuento Eritrocitario.

ADE = Amplitud Distribución Eritrocitaria.

RDW = Amplitud Distribución Eritrocitaria versión inglesa.

ICSH = Comite Internacional para la Estandarización en Hematología.

Dtd.Std. = Desviación estandard.

Pg = Picogramos.

fl = Fentólitos

gr = gramos.

Sdrs.= Síndromes

## ÍNDICE.

<b>1.- MOTIVACIÓN DE LA TESIS</b>	<b>1</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1.- ANEMIA. CONCEPTO	5
2.1.1.-CLASIFICACIÓN	7
2.2.- ANEMIAS MICROCÍTICAS	11
2.2.1.- ANEMIA FERROPÉNICA	11
2.2.2.- SÍNDROMES TALASÉMICOS	18
2.2.2.1.- CONCEPTO	19
2.2.2.2.- DIAGNÓSTICO. METODOLOGÍA	21
2.2.2.3.-DIAGNÓSTICO DEL RASGO BETA-TALASÉMICO.	22
2.2.2.4.- DIAGNÓSTICO DEL RASGO BETA-DELTA TALASÉMICO	23
2.2.2.5.- TRATAMIENTO.	23
2.3.- GENÉTICA POBLACIONAL DE LAS TALASEMIAS	23
2.4.- DETECCIÓN DE BETA Y DELTA-BETA TALASEMIAS HETEROCIGOTAS.	27
2.4.1.- FUNDAMENTO	28
2.4.2.- ESTUDIOS INICIALES	28
2.4.3.-VALORACIÓN DE LA ANISOCITÓISIS EN PACIENTES CON MICROCITÓISIS..	30
2.4.4.-UTILIZACIÓN DE LOS CONTADORES ELECTRÓNICOS DE TERCERA GENERACIÓN. ADE	32
<b>3.- OBJETIVOS</b>	<b>36</b>

<b>4.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1.- POBLACIÓN ESTUDIADA	39
4.1.1.- ÁREA SANITARIO-DEMOGRÁFICA 09 DE LA COMUNIDAD VALENCIANA.	39
4.1.2.- GRUPO TOTAL DE ESTUDIO	39
4.1.3.- GRUPO ANEMIAS FERROPÉNICAS	39
4.1.4.- GRUPO BETA-TALASÉMIAS	42
4.1.5.- GRUPO DELTA-BETA TALASÉMIAS	42
4.2.- MÉTODOS	43
4.2.1.- RECOGIDA DE DATOS	43
4.2.2.- METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	45
4.2.2.1.- DESCRIPTIVA	45
4.2.2.2.- COMPARATIVA	45
4.2.3.- SOPORTE INFORMATICO LÓGICO (SOFTWARE).	46
<b>5.- RESULTADOS</b>	<b>47</b>
5.1.- PARÁMETROS SOCIO DEMOGRÁFICOS	48
5.1.1.- PREVALENCIA MICROCITÓISIS	49
5.1.2.- EDAD.	50
5.1.3. SEXO..	53
5.2. - PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS	55
5.2.1.- RECUENTO ERITROCITARIO	55
5.2.2. - HEMOGLOBINA	57
5.2.3.- HEMATOCRITO	59
5.2.4.- VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO	61
5.2.5.- HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA	63

5.2.6.- CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA	65
5.2.7.- AMPLITUD DE DISTRIBUCIÓN ERITROCITARIA	67
5.3.- PRUEBAS DISCRIMINATORIAS ESPECIALES	69
5.3.1.- SIDEREMIA	71
5.3.2.- FERRITINA	73
5.3.3. - TRANSFERRINA	75
5.3.4.- RETICULOCITOS	77
5.4. - UTILIZACIÓN COMBINADA DE PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS	77
5.4.1.- DISCRIMINACIÓN ENTRE RASGOS TALASÉMICOS (BETA Y DELTA-BETA)	77
5.4.2.- DISCRIMINACIÓN ENTRE RASGO TALASÉMICO (BETA Y DELTA-BETA) Y FERROPENIAS	78
5.5.- PROYECCIÓN ESTADÍSTICA DE LA INCIDENCIA DE LA MICROCITOSIS	79
5.5.1.- PROYECCIÓN ESTADÍSTICA DE LA INCIDENCIA DE BETA-TALASEMIA....	79
5.5.2.- PROYECCIÓN ESTADÍSTICA DE LA INCIDENCIA DE DELTA-BETA TALASEMIA	79
5.5.3.- PROYECCIÓN ESTADÍSTICA DE LA INCIDENCIA DE FERROPENIA	80
<b>6.- DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
6.1. - PARÁMETROS SOCIO-DEMOGRAFICOS	81
6.2.- PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS	81
6.2.1.-VALOR DISCRIMINANTE DE LOS PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS INDIVIDUALES	82
6.3. - PARÁMETROS ESPECIALES	82
6.3.1.- SIDEREMIA	84
6.3.2.- FERRITINA	84
6.3.3.- TRANSFERRINA	85

6.3.4.- RETICULOCITOS	85
6.4.- PARÁMETROS COMBINADOS	85
6.4.1.- DISCRIMINACIÓN ENTRE BETA Y DELTA-BETA TALASÉMIAS	85
6.4.2.- DISCRIMINACIÓN ENTRE RASGO TALASÉMICO (BETA Y DELTA-BETA) Y FERROPENIA	87
6.5.- PROYECCIÓN ESTADÍSTICA DE LA INCIDENCIA DE LA MICROCITOSIS	89
7.- CONCLUSIONES	90
8.- BIBLIOGRAFÍA	94

**MOTIVACION TESIS**



Los síndromes talasémicos figuran entre los trastornos genéticamente determinados más comunes de la raza humana, con amplia distribución en todo el mundo.

En España, en la última década, ha crecido espectacularmente el interés por la patología congénita del hematie, pudiéndose hoy en día disponer de suficientes datos para configurar un mapa de esta patología en la mayoría de las áreas geográficas españolas.

Asimismo, se ha establecido de una manera precisa la dimensión real del problema de la beta-talasemia y por otra parte se ha hecho patente la existencia de otras formas de talasemias (alfa-talasemia y delta-beta talasemia), de las que se tenía un escaso conocimiento.

Todos estos hechos unidos a la presencia en mi familia de varios casos de esta patología, han alentado mi interés y entusiasmo hacia el conocimiento y estudio de los síndromes talasémicos.

De esta manera, la presente Tesis no es más que una aproximación al mundo de los síndromes talasémicos en una determinada área geográfica de gran impacto en cuanto a la incidencia de casos y con la finalidad de ayudar a desarrollar una eficaz prevención de las formas graves de estos trastornos.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años hemos asistido a considerables avances en la investigación sobre las bases moleculares de las talasemias. Estos hechos nos permiten actualmente poder reconocer la gran heterogeneidad en la lesión genética que condiciona la aparición de un fenotipo talasémico (De Mayer E , Adiels-Tegman M , 1985).

La alta prevalencia de talasemia en la Comunidad Valenciana, hace necesaria la planificación de programas de prevención de nuevos casos (Sevona-Ventura C y Bonello F, 1994). Esta programación preventiva se debe realizar en base a las siguientes estrategias: a) Asesoramiento genético retrospectivo para las familias donde haya nacido un hijo con talasemia mayor; b) asesoramiento prospectivo para la detección de los heterocigotos en la población antes del matrimonio o de la procreación; c) diagnóstico intrauterino (Cossu G y cols, 1982).

Así pues, son de gran interés la detección en masa de los heterocigotos y los programas de asesoramiento con los que, al menos teóricamente, se podría evitar la aparición de sujetos homocigotos.

Los medios de diagnóstico habituales son laboriosos y por tanto difíciles de aplicar como método de detección a poblaciones amplias.

Existen diferencias evidentes en los parámetros hematimétricos entre la Anemia Ferroménicas y el Rasgo Talasémico (Johnson CS y cols. 1983) Desde la introducción en 1973 por England y Fraser de una ecuación discriminante que pretendía diferenciar entre Anemia Ferropénica y Talasemia Heterocigota, se propusieron durante la década de los 70, diferentes índices que tenían por objetivo la detección del Rasgo Talasémico. Sin embargo, su aplicación mostró una utilidad bastante limitada para diferenciar entre ambos procesos, tanto en sujetos adultos como en la población infantil.

La introducción en 1979 de los primeros contadores celulares conocidos como de tercera generación, que permiten determinar nuevos parámetros, condujo a su aplicación en el diagnóstico diferencial de las anemias, entre ellas las microcíticas.

Hoy en día la detección de las anemias ferropénicas y por ende del rasgo talasémico, se ha convertido en un proceso prácticamente estandarizado.

Dada la elevada incidencia de este tipo de patología en el área geográfica que bordea la laguna de La Albufera en Valencia (Área Sanitaria 9 de la Comunidad Valenciana), el propósito de este trabajo, será la aplicación de las estrategias anteriormente comentadas cuya finalidad es la reducción en la incidencia de nuevos y más graves casos.

## 2.1.- ANEMIAS. CONCEPTO

Se denominan anemias a aquellos trastornos en la producción de eritrocitos o de hemoglobina, destrucción prematura y / o excesiva de eritrocitos, o por disminución de eritrocitos post-hemorragia, que dan como resultado que las medidas cuantitativas de los componentes celulares de la sangre sean inferiores a lo normal.

La anemia es un hallazgo clínico frecuente que no constituye un diagnóstico definitivo, sino un dato de laboratorio al que hay que buscar una explicación etiológica. Puede manifestarse por síntomas propios o puede acompañar a los de la enfermedad asociada y, en ocasiones, puede ser el único dato patológico de un proceso subyacente potencialmente grave. Por tanto, se debe conceder la mayor importancia a la búsqueda de la causa.

De los elementos formes que constituyen la sangre, los hematies son los de mayor número. En la sangre de la población adulta alcanzan unas cifras que oscilan entre los 4.5 y 5.5 millones de células por mm<sup>3</sup> y suponen un volumen algo menor del 50% del total de la sangre del cuerpo humano.

La función fundamental de los hematies de la sangre es, el de transporte de oxígeno que ha sido adquirido en su paso a través de los vasos capilares que están alrededor de los alvéolos pulmonares, para ser distribuido por todo el organismo que lo utiliza en efectuar el metabolismo aeróbico a nivel celular en todos los tejidos; de forma secundaria a esta función pero a la par, se encarga de retirar el dióxido de carbono producido por las mismas células y reencaminarlo hacia el aparato respiratorio para su eliminación. Para realizar con efectividad esta

función, el eritrocito ha tenido que sufrir una superespecialización en su estructura, que parte del proeritroblasto y finaliza en una célula sin núcleo compuesta por una membrana, escasa dotación enzimática y la hemoglobina que es su principal constituyente.

La membrana del hematíe sigue el modelo de "mosaico fluido" y esta compuesta por un 40% de lípidos, un 45% de proteínas que constituyen el citoesqueleto o estructura rígida pero flexible y el resto de componentes que son agua e hidratos de carbono.

En cuanto a la dotación enzimática, el hematíe está compuesto por dos grupos de enzimas: los que toman parte en la producción de ATP (energía), y los que intervienen en los procesos respiratorios y mecanismos de defensa frente a la oxidación incluyendo la regeneración del hierro férrico a ferroso. Dadas las características del eritrocito de célula sin núcleo y síntesis proteica, la dotación enzimática es única y fija, no variando a lo largo de la vida del hematíe.

La hemoglobina es una proteína de compleja estructura responsable del transporte del oxígeno que debido a su escasa solubilidad en medio acuoso, no alcanza nunca suficiente concentración para abastecer los distintos tejidos del organismo. Esta formada por las globinas y los grupos hem; las globinas son cadenas proteicas de conformación globular tridimensional que al unirse dos a dos forman un tetrámero. El grupo hem, es una estructura fija, que no se presenta en distintas formas - o isómeros - dentro de la hemoglobina. Es un anillo que aloja en su interior el átomo de hierro en forma ferrosa ( $Fe^{++}$ ) que será quien transporte al átomo de oxígeno, en proporción equimolecular. A la célula que posee el hierro en forma férrica ( $Fe^{+++}$ ) se la conoce como metahemoglobina, no tiene capacidad de transporte, y es una molécula oxidada. La hemoglobina, va a estar conformada por la reunión de cuatro moléculas de globina y las mismas de grupos hem, adoptando una configuración espacial con las globinas replegadas alojando a los grupos cercanos a la superficie.

Según la composición de las cadenas de globina - idénticas dos a dos - se clasifican las hemoglobinas; en el adulto podemos distinguir:

Hb A: 2 cadenas alfa y 2 cadenas beta. Supone el 96-98%.

Hb A2: 2 cadenas alfa y 2 cadenas delta. Normalmente presente hasta en un 3%.

Hb F: 2 cadenas alfa y 2 cadenas gamma, representa el 0.5-1 %, en el adulto, suponiendo una cantidad mayor en la hemoglobina del feto.

Se define la anemia como una disminución de la concentración de hemoglobina en sangre, sin que tenga que existir forzosamente una disminución del hematocrito. La definición rigurosa de la anemia, es una disminución en la masa eritrocitaria, pero hay situaciones con aumento del volumen plasmático como insuficiencia cardiaca congestiva, embarazo, etc., que dan lugar a una disminución considerable del hematocrito y no existe un descenso real de la masa eritrocitaria así como las pérdidas agudas de sangre, en las que existe una disminución simultánea de hematies y plasma pero no así de hemoglobina, hasta que posteriormente, se produce una expansión del volumen plasmático.

### 2.1.1.- CLASIFICACIÓN

La clasificación de las anemias esta en función de diversos criterios:

#### CRITERIOS ETIOLÓGICOS:

Anemias por perdida de sangre: posthemorragia aguda o crónica.

Anemias por déficit en la producción de eritrocitos ya sea por:

- . deficiencia de factores eritropoyéticos.
- . deficiencia de hierro.
- . deficiencia de cobre.
- . deficiencia de cobalto de forma experimental.
- . deficiencia de vit. B12 y Ac. Fólico (anemia perniciosa y anemia megaloblastica)
- . déficit de proteínas.
- . deficiencia de ac. Ascórbico.
- . deficiencia por insuficiente producción de medula ósea (anemias hipoplásicas aplásicas, y sideroblasticas)

Anemias por destrucción excesiva o anemias hemolíticas:

Por defectos eritrocitarios intrínsecos o extrínsecos.

Anemias por producción disminuida y destrucción aumentada de eritrocitos:

- . Síntesis defectuosa de hemoglobina (hemoglobinopatias o anemias de células falciformes).
- . talasemias.
- . Anemias asociadas a enfermedades crónicas (cáncer, artritis reumatoide...)
- . Anemias por nefropatias.
- . Anemias del mixedema.
- . Anemias por invasión de la medula ósea (anemias mieloptísicas)

#### CRITERIOS MORFOLOGICOS

Son aquellos que hacen referencia, fundamentalmente, al volumen corpuscular medio (VCM), se expresa en femtolitros y se obtiene hoy día fácilmente mediante técnicas contadoras automáticas.

Microcíticas (VCM < 81 fl): Suele expresar trastornos en la hemoglobinogénesis (anemias ferropénicas y hemoglobinopatias). Junto con el VCM suele disminuir la hemoglobina corpuscular media (HCM).

Macrocíticas (VCM > 98 fl): suele expresar trastornos de la maduración nuclear eritroblástica, fundamentalmente secundarias a déficit de ácido fólico y/o vitamina B12, trastornos no megaloblásticos como los que aparecen en ciertas hepatopatías crónicas, anemias refractarias, etc. En estas anemias hay aumento del HCM.

Normocítica (VCM entre 91 y 98 fl): suelen expresar trastornos en la producción medular, por insuficiencia o infiltración, anemias hemolíticas, inflamatorias, etc..

#### CRITERIOS FISIOPATOLÓGICOS

Se basan en la presencia y cuantía de reticulocitos dando lugar a dos grandes grupos:

Regenerativas: Generalmente por causa extramedular, presentando un conteo de reticulocitos aumentado, que es la expresión de una buena respuesta de la médula a la hipoxia con un aumento de la eritropoyesis. Habitualmente expresan una pérdida de hematies en forma de hemorragia

o hemólisis. Las hemorragias, sobre todo, crónicas llevan con sigilo una pérdida de hierro no suplida originando anemias ferropénicas microcíticas; la hemólisis, por otra parte, suele agotar los depósitos de ácido fólico cuando se cronifica debido, al incremento de la eritropoyesis, acabando en la mayoría de los casos en anemias megaloblásticas.

Arregenerativas: Suelen ser originadas en la propia médula ósea y pueden estar producidas por alteraciones en la eritrona (Anemias aplásicas, síndromes mielodisplásicos) o bien por ocupación por procesos infiltrativos en determinadas neoplasias. Pueden estar producidas, también, por disminución de factores estimulantes de la eritropoyesis (eritropoyetina) o situaciones carenciales (ferropenia y déficit de vitamina B12 y ácido fólico) o por trastornos congénitos diseritropoyéticos.

### SINTOMATOLOGÍA GENERAL DE LAS ANEMIAS

La sintomatología general de las anemias, está en relación con la agudeza y gravedad del cuadro, ya que estos síntomas son causados fundamentalmente por la hipoxia tisular que condiciona respuestas compensatorias cardiovasculares-pulmonares. Subjetivamente pueden estar asociados a debilidad, vértigo, dolor de cabeza, tinnitus, visualmente aparición de "moscas volantes", fatiga, debilidad con somnolencia, irritabilidad e incluso conducta psicótica; en ocasiones, ictericia y esplenomegalia, disminución de la libido, amenorrea en la mujer y febrícula.

### PARÁMETROS HEMÁTICOS NORMALES EN INDIVIDUO SANO

En el individuo sano adulto (en recién nacido, son algo más elevadas) y en la latitud en la que nos encontramos es de:

. Hematíes  $5.400.000/\text{mm} \pm 0.8$  en el hombre.  
 $4.800.000/\text{mm} \mp 0.6$  en la mujer.

. Hemoglobina  $14 (2 \text{ gr}/100 \text{ ml})$  en el hombre  
 $12 \mp 2 \text{ gr}/100 \text{ ml}$  en la mujer



Hematocrito  $47 \pm 5$  % en el hombre  
 $42 \pm 5$  % en la mujer

En el niño las cifras al nacer son más elevadas, hacia el tercer mes de vida las cifras normales están en 45.000.000 ( 0.7 para luego ir aumentando hasta la pubertad en las que las cifras se equiparan a las del individuo adulto.

Los índices eritrocitarios tales como el VCM y la HCM y la CHCM derivan de las cifras de hemoglobina total y del hematocrito. Cuando el VCM es inferior a 80, se denominan Anemias Microcíticas ; cuando nos encontramos con cifras de VCM mayores de 94 nos encontraremos frente a las Anemias Macrocíticas.

Con respecto a los valores de HCM y CHCM respectivamente inferiores a 27 y 32, estaremos en presencia de Hipocromia. En las Anemias Macrocíticas encontraremos valores por encima de 32 debido al gran tamaño de la molécula.

En las anemias por síntesis defectuosa de la nucleoproteína, las células son grandes con HCM aumentada y CHCM normal, en contraste con las Anemias Hipocrómicas con células microcíticas por la deficiencia de hierro.

Las Anemias por inhibición, sustitución o insuficiencia de la médula ósea, son normocíticas y normocrómicas.

En el frotis de individuos anémicos encontramos alteraciones celulares en cuanto al tamaño (anisocitosis), contenido de hemoglobina (poiquilocitos y eritrocitos nucleados), a la tinción dependiendo del contenido en RNA (policromasia), células punteadas, esferocitos redondos y pequeños, esquistocitos, células en diana. También aparecen leucocitos inmaduros y células plásticas. Los reticulocitos están aumentados en las Anemias por pérdidas o destrucción excesiva de sangre y disminuidos en las producidas por formación inadecuada de sangre; las cifras absolutas de reticulocitos normales es del 1% de 5.000.000 de eritrocitos que representan 50.000 células. Cifras por debajo del 1% son consideradas anormales.

Consideramos individuo anémico a:

. Varón adulto con cifras menores de 4.500.000/mm<sup>3</sup> o Hb<14gr/100ml de sangre.

. Mujer adulta con cifras menores de 4.000.000/mm<sup>3</sup> o Hb<12gr/100ml de sangre.

## 2.2.-ANEMIAS MICROCÍTICAS. CONCEPTO

La OMS (WHO 1968) considera que concentraciones inferiores a 13 gr/dl de hemoglobina en varones adultos y 12 gr/dl en mujeres adultas, son significativas de anemia. Para los niños el criterio varia estableciendo dos grupos por edades de forma que entre 6 meses y 6 años el limite inferior de la normalidad se establece en 11gr/dl de hemoglobina y entre 6 a 14 años es de 12 gr/dl sin consideraciones de sexo, ya que en adulto las variaciones se justifican por las perdidas menstruales en la mujer.

Las Anemias Microcíticas Hipocromas se caracterizan por un descenso del VCM eritrocitario por debajo de 81 fl acompañado de una disminución de CHCM (Vives Corrons 1988). Esta anemia, es seguramente el tipo más frecuente en el mundo y aparece en todos aquellos procesos que cursan con trastorno de la hemoglobínogénesis.

### 2.2.1.-ANEMIA FERROPÉNICA

La anemia ferropénica es la anemia microcítica más frecuente, originada por la disminución de hierro, esta ferropenia tiene dos etapas en su desarrollo; durante el periodo de ferropenia latente en el que desaparecen los depósitos de hierro pero no se altera la cifra de hemoglobina que daría lugar a una ferropenia sin anemia. Cuando progresa el estado carencial se desarrolla una "eritropoyesis ferropénica" en la que hay un descenso de la hemoglobínogénesis que da paso a la aparición de una anemia hipocroma y microcítica.

La anemia ferropénica se define como aquella situación resultante de un déficit de hierro para una eritropoyesis normal debido a una disminución del mismo en el organismo, cuya causa más frecuente es la

perdida de sangre de forma aguda o crónica, lo que dará lugar a un cuadro clínico mucho más grave en el primer caso y mucho más llevadero en el segundo y más aun si el individuo afecto es mujer, ya que su organismo está adaptado a pérdidas periódicas y en ocasiones, abundantes, de sangre. Por tanto la anemia ferropénica puede quedar clasificada como apuntamos al principio, en Anemia Microcítica e Hipocroma, aunque no todas las anemias de estas características corresponden a anemias ferropénicas, ni tampoco todos los déficits de hierro para la eritropoyesis que se expresan de esta forma corresponden a ferropenias; este es el caso de las anemias por trastornos en la utilización del hierro, en las que, a pesar de existir oferta suficiente de hierro, este no puede ser correctamente utilizado por los eritroblastos por causas que incluyen desde procesos inflamatorios crónicos pasando por las alteraciones de las globinas (síndromes talasémicos), alteraciones del grupo hem (anemias sideroblásticas), o incluso trastornos en el receptor de membrana celular para la transferrina, molécula encargada de transportar el hierro en el plasma.

## INCIDENCIA

En estudios realizados entre los años 1985 a 1987 por distintos autores, se demostró que aproximadamente existen 1000 millones de personas con algún déficit de hierro (De Maeyer E, y Adiels M, 1985). No obstante la incidencia varía extensiblemente entre los países desarrollados y el tercer mundo. Cook J y cols. (1986), efectuaron estudios en los E.E.U.U. en los que detectaron ferropenia en 0.7% de varones y el 10% de mujeres premenopáusicas y un 4.1% en mujeres menopausias presentando Anemia Ferropénica el 0.22% de varones, el 2.6% de mujeres premenopáusicas y el 1.9% de las menopausicas. Frente a estas cifras en regiones del tercer mundo con carencias alimentarias frecuentes y la tasa de infecciones por parásitos intestinales elevada, la prevalencia de anemia en la población infantil estaba entre el 20 a 40%; en mujeres adultas entre 21-20% a 30% y en varones en un 8% según diferentes estudios (Hamedani P y cols, 1978; Milman N y Cohn J, 1984). En España las cifras eran equiparables al resto de los países desarrollados, siendo en ferropenias simple la prevalencia próxima al 1% en varones adultos, del 20% en mujeres adultas y en niños oscilando alrededor del 3%. En cuanto a la Anemia Ferropénica tanto en

varones adultos como en niños es próxima al 0% y en mujeres se aproxima al 4% (Hermosa V y cols. 1986; Muñoz A y cols. 1978).

Según datos de la OMS se estima en más de 500 millones el número de personas que podrían padecer esta patología, lo que la coloca en el número uno de los trastornos hematológicos).0.

Habitualmente en las personas, existe un equilibrio entre las pérdidas y los ingresos de nutrientes; en el caso del hierro, existe un conflicto entre el proceso de la evolución y la civilización y los resultados consecuentes en la dieta, hemos pasado de una alimentación omnívora, a un régimen alimenticio, con inclusión de hidratos de carbono y grasas, situación extrema en países subdesarrollados en los que la dieta es además de escasa e insuficiente, muy pobre en principios inmediatos y casi exclusiva en hidratos de carbono y cereales. Se calcula que la prevalencia de la anemia ferropénica es de un 10% en el conjunto de los países desarrollados, con valores inferiores en países como E.E.U.U. o Suecia, que han adoptado el enriquecimiento de las harinas con el aporte de sales ferrosas en programas de prevención primaria, consiguiendo así prevalencias por debajo del 6%. Por contra en países del Tercer Mundo se han obtenido cifras de prevalencia de hasta el 50% o más, achacables a deficiencias alimentarias (Jandl JH y Creenberg MS, 1959).

Las causas fisiológicas más importantes de las anemias ferropénicas son básicamente dos, por un lado un descenso importante en cuanto a la ingesta de nutrientes con alto contenido en hierro y a un aumento en las pérdidas del mismo, que afecta fundamentalmente a tres grupos de riesgo:

Mujeres embarazadas, sobre todo en el tercer trimestre del embarazo que es cuando el crecimiento fetal es mayor con gran consumo de hierro.

Mujeres en edad fértil, por las pérdidas menstruales, que en ocasiones son considerables.

Adolescentes, por el intenso crecimiento que experimentan y por errores alimentarios influidos por las "modas" en la alimentación.

En cuanto a las causas patológicas más frecuentes de anemia ferropénica son todas aquellos cuadros que cursan con pérdida de sangre por

microhemorragias generalmente del tracto digestivo, y genito-urinario que se producen de forma solapada, lenta no dando lugar a la aparición de graves cuadros carenciales por lo que en la mayoría de los casos su hallazgo es casual, así como una alimentación inadecuada, etc.

Por todo esto, la anemia ferropénica no es solo una enfermedad "per se" sino que debería ser considerada como un signo más de una causa subyacente que la origina que obliga a indagar en el proceso diagnóstico y terapéutico una vez demostrada la existencia de una anemia ferropénica.

#### DIAGNÓSTICO

Una vez definida la anemia ferropénica como la disminución de síntesis de hemoglobina por carencia de hierro en el organismo distinguiremos dos fases sucesivas:

Estados ferropénicos sin anemia, situación que se mantiene durante un tiempo gracias a la compensación temporal a expensas de las reservas férricas del organismo. Aparecen alteraciones en la tinción de Perls en médula ósea, existe una disminución de sideremia y de la ferritina, pero se mantienen cifras de hemoglobina y un índice de saturación de la transferrina (IST) normales que enmascaran la situación.

Eritropoyesis ferropénica, situación esta que acontece cuando los depósitos ya no son capaces de subsanar las necesidades. Aparecen descensos en la cifra de hemoglobina y el IST es inferior al 6%.

En el periodo de ferropenia latente, la carencia de hierro (como ya se ha dicho) no tiene expresión hematimétrica. Es cuando el déficit progresa cuando nos encontramos en el hemograma:

Disminución de la cifra de hemoglobina.

Disminución entre ligera y moderada en el recuento eritrocitario que incluso puede ser normal.

Descenso hemoglobínico, eritrocitario o hipocromia que condiciona descenso de los parámetros de hemoglobina corpuscular media (HCM) y de la concentración corpuscular media de la hemoglobina (CCMH).

En el examen morfológico del frotis sanguíneo aparece hipocromia y microcitosis, asociadas a anisocitosis y poiquilocitosis moderada.

En médula ósea, por medio de tinción de Perls, se puede evidenciar depósitos de hierro del organismo; en presencia de ferropenia existe un descenso del número de sideroblastos y ausencia del hierro reticular o macrofágico.

Endeterminaciones serológicas, la sideremia o capacidad total de saturación de transferrina (CTST), está disminuida, mientras que la transferrina está aumentada en las ferropénias, lo que constituye diagnóstico cierto en la carencia de hierro; por otro lado, la ferritina permite valorar el estado de los depósitos de hierro en el organismo por lo que la tinción de Perls en médula ósea ha sido relegada actualmente por presentar una buena correlación con esta (Cook JD y cols. 1974, Lipschitz DA y cols, 1974) y ser además una técnica mucho menos agresiva con valor diagnóstico. No hay que olvidar que la concentración de ferritina puede verse alterada por factores distintos a las variaciones de los depósitos de hierro, como ocurre en los casos de hepatopatías, artritis reumatoide, cáncer de pulmón enfermedad de Hodgking, patologías todas ellas en las que aparece aumentada.

La protoporfirina eritropoyética aumentada, demuestra eritropoyesis ferropénica que no hay que olvidar que aparece elevada en otros defectos adquiridos de la síntesis de hemoglobina. Esta determinación se utiliza poco actualmente a pesar de estar automatizada su dosificación por fluorometría (Cook JM, 1982).

a - La sideremia consiste en la determinación total del hierro plasmático, que ofrece una aproximación poco sensible de la carga férrica del organismo, ya que tiende a mantenerse a expensas de la movilización progresiva de las reservas. Las cifras de normalidad se sitúan entre 50 y 140 mgr/dl.

b - Capacidad de saturación de la transferrina o capacidad total de fijación de hierro de la transferrina (CST o CTFH). Con unas cifras de normalidad de 200 a 350 mg/dl mide la cantidad de hierro que sería necesaria para saturar la transferrina. Es un indicador muy fiable de la transferrina y su carga férrica.

c - Índice de Saturación de la Transferrina (IST). Es el cociente entre la sideremia y la CST, y mide por lo tanto el grado de saturación de la transferrina. Sus valores normales son alrededor del 33 %.

d - Ferritina plasmática. Es la determinación de las moléculas de ferritina, que sintetizadas en el hígado y libres todavía de la incorporación del hierro a las mismas, están destinadas a ello. Es un índice un director de gran valor y sensibilidad en la valoración del hierro de reserva, con una equivalencia aproximada de 1 mg./l de ferritina plasmática por cada 8-10 mg de hierro en las reservas. Sus valores normales varían según el sexo.

e - Ferrocínica. Constituyen estudios, que se realizan en ocasiones, en el que se cuantifica un trazado radiactivo inyectado ligado a la transferrina (Fe 59) para medir su aclaramiento en sangre y su incorporación globular.

f-Visualización directa de depósitos de hierro por tinciones específicas en médula ósea (Tinción de Perls).

Para el diagnóstico de la anemia ferropénica hay que tener en cuenta tres puntos:

- Evidencia clínica:

Síndrome anémico, que suele no ser apreciable en la mayoría de los casos, salvo la palidez cutáneo-mucosa, ya que son por lo general, procesos crónicos de lenta instauración, viéndose grados analíticamente severos sin repercusiones hemodinámicas.

Trastornos epiteliales, fragilidad y caída del cabello (no siempre significativo de anemia ferropénica), alteraciones en la forma de las uñas, depapilación lingual, etc.

Infecciones, muy raramente observadas por trastornos en el contenido en lactoferrina de los gránulos de los leucocitos neutrófilos.

- Evidencia analítica: fundamentada en el hemograma y en los estudios ya indicados:

Hemograma que demuestre la existencia de anemia por descenso de la hemoglobina (en la fase latente la carencia de hierro no tiene expresión hematimétrica), VCM y HCM también disminuidos así como el recuento eritrocitario, aunque muy frecuentemente, se encuentra en límites normales.

Sideremia y capacidad total de saturación de la transferrina (CTST) disminuida la primera y aumentada la segunda en ferropenia, pilares ambas en el diagnóstico de la carencia de hierro. La ferritinemia también permite valorar el estado de los depósitos de hierro del organismo hasta el punto de en la actualidad, haber suplantado la tinción de Perls en medula ósea por haber demostrado presentar una buena correlación con ésta (Cook JD y cols 1974; Lipschitz DA y cols 1974) y ser evidentemente una técnica diagnóstica menos agresiva. No obstante no hay que olvidar que la concentración de ferritina puede verse afectada por factores distintos a variaciones de los depósitos de hierro como es el caso de hepatopatías, artritis reumatoide, enfermedad de Hodgking y cáncer de pulmón que aunque esta determinación se ve menos influida por estos factores puede ser un parámetro válido (Cazzola M y cols, 1986).

CST aumentada, consecuencia de un incremento de la transferrina en su intento de compensación, aumento este que es diagnóstico diferencial con las anemias por procesos inflamatorios crónicos en las que puede no alterarse e incluso estar disminuida.

IST inferior al 16%.

Ferritina plasmática disminuida.

Médula ósea (Tinción de Perls): en la que encontramos, descenso del número de sideroblastos, ausencia de hierro reticular o macrofágico y eritrocitario, permitiéndonos evidenciar el estado de los depósitos de hierro del organismo.

El examen morfológico del frotis sanguíneo destaca hipocromia y microcitosis ya señaladas, acompañadas de anisocitosis y poiquilocitosis variable.



Protoporfirina eritrocitaria: Su aumento indica eritropoyesis ferropénica, sin olvidar que también se eleva en otros defectos adquiridos de la síntesis de hemoglobinas. Actualmente es una determinación poco utilizada en la práctica clínica a pesar de estar automatizada su dosificación por fluorometría (Cook JD, 1982).

-Diagnóstico etiológico que estará condicionado por la historia clínica y las exploraciones complementarias realizadas al efecto.

## TRATAMIENTO

Se administran preparados de hierro habitualmente por vía oral y en estados de malabsorción o intolerancia digestiva o cuando sospechamos el incumplimiento de la pauta oral, por vía parenteral. Deben administrarse sales ferrosas por su mejor absorción a dosis entre 100 - 250 mg/día hasta que se normalicen los valores de sideremia y ferritina, asociados a tratamiento de la causa en casos de pérdidas por patología digestiva o hemorrágica de cualquier etiología. En la primera etapa del tratamiento es aconsejable asociar ácido fólico a dosis de 5 mg/día.

### 2.2.2.- SÍNDROMES TALASÉMICOS

#### 2.2.2.1.- CONCEPTOS

El estudio, origen de esta Tesis, se centra en las anemias que tienen su origen en la síntesis defectuosa de Hemoglobina (Fairbanks VK, 1980) por una eritropoyesis ineficaz, que consiste en una velocidad defectuosa de la producción de síntesis, ya sea de la cadena Alfa (en algunos casos de la Delta) ya de la cadena Beta. También llamadas hemoglobinopatías, concretamente las Talasemias, grupo de anemias Hemolíticas crónicas, familiares que se presentan con más incidencia en los países que rodean el Mediterráneo y sudeste de Asia, por lo que también son conocidas como Anemias Mediterráneas, leptocitosis hereditaria, Talasemia Mayor y Minor.

Los Síndromes Talasémicos y las Talasemias, constituyen un grupo de enfermedades muy heterogéneas, tanto desde el punto de vista clínico, hematológico como molecular. En su estudio se incluyen todos aquellos trastornos caracterizados por disminuciones o ausencias en la síntesis de una o varias cadenas globínicas, determinadas hemoglobinopatias estructurales por defecto de recombinación genética durante la fase de meiosis (Hb Lepore) y la llamada Persistencia Hereditaria de Hb Fetal (PHHF).

Son síndromes hereditarios de forma autosómica dominante y su frecuencia dentro de la población mundial es muy elevada.

#### HEMOGLOBINOPATIAS. CONCEPTO

Como ya se ha dicho, son anemias producidas por la síntesis defectuosa de la hemoglobina, de transmisión genética que se manifiestan por alteraciones de sus características químicas, movilidad electroforética o de sus propiedades físicas (Mc Donagh KT, Nienhuis AW, 1993 ; Berzard Y, 1991 y Kazazian HH, 1990).

La molécula de Hb adulta o Hemoglobina A, está formada por dos pares de cadenas de polipeptidos llamados Alfa y Beta que están controlados genéticamente y sus defectos pueden tener como consecuencia moléculas de hemoglobina con propiedades químicas o físicas anormales que pueden dar lugar a Anemias que, serán graves en los homocigotos (Talasemia Mayor) y leves en los portadores heterocigotos del rasgo (Talasemia Minor) que suele ser asintomática. En ocasiones los individuos pueden ser heterocigotos respecto a DOS de las normalidades y sufrir anemia con características de ambos rasgos (Benz EJ Jr, 1988).

La hemoglobina Fetal o Hb F aparece en el momento del nacimiento y va desapareciendo durante los primeros meses de vida quedando en el adulto un residuo de menos del 2% de la Hb total, esta Hb F, está formada por cadenas alfa que sustituyen a las cadenas beta y pueden estar presentes en procesos mieloproliferativos, aplásicos o en ciertos trastornos de la síntesis de la hemoglobina.

En el adulto normal, existe también una Hb A<sub>2</sub> en cantidades de hasta 2.5 % formada por cadenas alfa y delta.

Los mecanismos fisiopatológicos por los que se produce el síndrome anémico en las Talasemias se debe fundamentalmente a tres causas:

Disminución de la síntesis de Hb.

Eritropoyesis ineficaz motivada por la destrucción de los eritroblastos causada por los precipitados intracitoplasmáticos producidos por el aumento de cadenas libres

Hemólisis a consecuencia de las alteraciones morfológicas de los hematies que llegan a madurar.

El predominio de un mecanismo sobre otro o la unión de todos ellos varían de un paciente a otro dando lugar a un gran polimorfismo dentro de sus manifestaciones clínicas.

Los Síndromes talasémicos de mayor interés clínico son los que afectan a la síntesis de las cadenas alfa, beta y delta, clasificándose desde el punto de vista práctico en cinco grandes grupos.

- alfa-talasemia:  $\alpha^+$ ,  $\alpha^0$ , según tengan delección parcial o total de uno o dos genes con sus formas homo y heterocigotas.

- beta-talasemia:  $\beta^+$ ,  $\beta^0$ , siendo su expresividad clínica resultante de la combinación de los genes deleccionados con el gen normal tanto en sus formas homocigotas como heterocigotas muy variada, dando lugar a las talasemias silentes, o portadores de rasgo talasémico, talasemia intermedia y talasemia mayor.

- beta-delta talasemia en sus formas homo y heterocigota, la primera de curso clínico más benigno que su homonima de la variante beta, y la heterocigota que cursa como rasgo talasémico.

- Hemoglobina Lepore, se incluye en los síndromes talasémicos aunque el defecto no es puramente cuantitativo; se produce una hemoglobina anormal que consta de dos cadenas alfa y dos no-alfa, formadas por la fusión de un residuo N-terminal de cadena delta y uno C-terminal de cadena beta.

- Persistencia hereditaria de la Hb fetal (PHHF): que corresponde a un grupo relativamente heterogéneo de alteraciones congénitas que tienen en común la persistencia de síntesis de hemoglobina fetal en la vida adulta pero que en muchas ocasiones se clasifica dentro de los cuadros talasémicos. Su defecto molecular es diverso con frecuente alteración en los genes delta y beta.

Debido al elevado polimorfismo genético y la existencia de diferentes mecanismos fisiopatológicos en el desarrollo de la anemia, la expresividad clínica de los síndromes talasémicos varía desde una situación prácticamente asintomática (rasgo talasémico) hasta la anemia intensa característica de la beta-talasemia mayor (anemia de Cooley) o causa de abortos e hidrops fetal en las formas heterocigotas de las alfa-talasemias.

Las hemoglobinopatias que requieren tratamiento son dos: Enfermedad por hemoglobina S y las Talasemias, dado que en nuestro medio son estas últimas las más frecuentes, sólo apuntar que los tratamientos actuales se basan para las formas homocigotas en especial en la beta-talasemia en regímenes transfusionales para mantener cifras de hemoglobina por encima del 12 gr/dl con tratamientos de quelación concomitantes y si es factible, trasplante alogénico de médula ósea.

Para los estados homocigotos, dada la gravedad del cuadro, debe preconizarse programas para determinar la prevalencia del rasgo talasémico e información a los portadores así como el consejo genético en la beta-talasemia, si con todo ello no se consigue evitar el embarazo y en situaciones de alto riesgo, debe practicarse diagnóstico prenatal a partir de una biopsia de cordón (Baigelt M y cols, 1981 ; Calero F y cols, 1982) durante el primer trimestre del embarazo y localización de la alteración correspondiente por técnicas de biología molecular, siempre y cuando los progenitores hayan sido estudiados previamente por esta metodología.

#### 2.2.2.2.- DIAGNÓSTICO. METODOLOGÍA

Los pacientes que cumplan criterios de microcitosis: VCM por debajo de 81 fl, asociado generalmente a poliglobulia, se les realizará una electroforesis de hemoglobinas con dosificación de A2 y F, así como estudio

del metabolismo férrico completo cuando los datos electroforéticos sean normales para diagnosticar las alfa-talasemias. En contadas ocasiones será preciso acudir a técnicas de estudios moleculares para detectar alteraciones específicas de las talasemias, localizadas en los genes que codifican la síntesis de la cadena correspondiente, y así, en las beta-talasemias se sitúa en el cromosoma 11 y para las alfa-talasemias en el brazo corto del cromosoma 16. El defecto en la síntesis de las cadenas alfa afecta de igual modo a la Hb F, como a la Hb A, lo que motiva que la formación de tetrámeros de cadenas sobrantes den lugar a la aparición de hemoglobinas anormales como la hemoglobina H (beta 4) en las formas homocigotas y hemoglobina Barts (gamma 4) al nacimiento.

De acuerdo con las hemoglobinas resultantes del estudio, los pacientes podrán catalogarse en los siguientes grupos:

Beta-talasemia menor: en los que encontramos niveles de Hb A2 aumentados con Hb F normal o aumentada.

Beta-delta talasemia menor: con niveles de A2 normales o disminuidos con aumento de la Hb F.

Microcitosis familiar atípica (alfa-talasemia menor): con metabolismo férrico normal, microcitosis, electroforesis y dosificación de Hb normales. En los casos de afectación por herencia homocigota con presencia de Hb H, la aparición de datos de hemólisis moderada o grave así como la presencia de cuerpos de Heinz por azul de cresil brillante, y electroforesis patológica evidenciando una banda de migración rápida son diagnóstico de certeza de esta entidad (Giro R, 1994).

#### 2.2.2.3.- DIAGNÓSTICO DEL RASGO BETA TALASÉMICO

La forma clínicamente asintomática de beta talasemia heterocigota conocida como rasgo talasémico o talasemia menor se caracteriza por una pseudopoliglobulia microcítica con discreta anemia, su diagnóstico es con frecuencia casual o bien en el curso de un estudio familiar, si bien en determinadas circunstancias, embarazo o infecciones severas pueden dar lugar a la aparición de un grado moderado de anemia. Sus valores de hemoglobina oscilan generalmente entre 9 y 11 gr/dl, su VCM está disminuido generalmente entre 50 y 70 fl y la HCM se halla también disminuida en cifras próximas a 20-22 pg. Para el diagnóstico de la beta talasemia heterocigota es la electroforesis de hemoglobinas donde se

observa un incremento de la fracción de Hb A2 cuya dosificación resulta ser superior o igual al 3,5%. El nivel de hemoglobina fetal puede hallarse elevado aunque no suele exceder de un 3%. Dado que los niveles de Hb A2 pueden verse afectados en caso de ferropenia asociada debe tenerse en cuenta este factor en casos dudosos. Ocasionalmente, algunas formas silentes precisan para su diagnóstico del estudio in vitro de la síntesis de cadenas de globina (Bunn HF y cols, 1986) e incluso el análisis del ADN mediante la técnica del Southernblotting (Southern EM 1975).

#### 2.2.2.4.-DIAGNÓSTICO DEL RASGO DELTA-BETA TALASÉMICO.

En el estado heterocigoto el síndrome talasémico es superponible al de la Beta-Talasemia heterocigota, aunque en el estudio de hemoglobinas se detecta aumento exclusivo de hemoglobina fetal (5-20%) (Pearson HA y Benz EJ Jr, 1984 ; Schwartz E y Benz EJ Jr, 1989; Katatamis AC y cols, 1996)).

#### 2.2.2.5.- TRATAMIENTO

El tratamiento de los síndromes talasémicos heterocigotos, dependerá del mayor o menor grado de hemólisis, y si existe o no carencia asociada de hierro.

Por lo general suplementos periódicos de ácido fólico en especial durante el embarazo, lactancia y épocas de crecimiento, son suficientes.

#### 2.3.- GENÉTICA POBLACIONAL DE LAS TALASÉMIAS

El problema de la distribución geográfica (de Mayer E y cols, 1985) de las talasemias está relacionado con dos factores: a) el origen y ventaja selectiva de las mutaciones talasémicas en regiones palúdicas (Nagel RL y Roth Jr, 1989); b) los movimientos migratorios (Pearson HA y cols. 1975), Las talasemias, conjuntamente con las hemoglobinopatias estructurales (HbS, HbC, HbE) (Vives Corrons JL, 1988) y la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, constituyen variaciones genéticas de los hematíes que confieren a los heterocigotos una protección selectiva frente al paludismo por Plasmodium malariae (Nagel RL y Roth EF Jr, 1989). Así, tuvieron origen y fueron seleccionadas mutaciones que tienen un efecto protector semejante, alcanzando altas tasas de prevalencia en países mediterráneos (sur de Europa, Oriente Medio, norte de África),

África Tropical, sudeste de Asia, subcontinente Indio y sur de China. Entre las grandes corrientes migratorias responsables de la introducción de esas enfermedades en otras regiones, pueden señalarse: a) los esclavos negros de África que fueron llevados a América Latina, Caribe y Estados Unidos, responsables de la introducción de los genes de HbS, HbC y alfa-talasemia delecional en los siglos XVI a XVIII; b) la migración italiana hacia los Estados Unidos, Brasil y Argentina en el siglo XVIII y principio del siglo XIX; c) las recientes migraciones de Caribeños y Africanos hacia Inglaterra y Francia; d) los grandes contingentes de Chipriotas, Indios y Paquistaníes afincados en Inglaterra; e) los Asiáticos Orientales recién llegados a los Estados Unidos, especialmente originarios del sudeste Asiático.

La Organización Mundial de la Salud calcula que ocurren anualmente de 10000 a 20000 nuevos casos de alfa-talasemia homocigota, y el nacimiento de 20000 a 40000 niños homocigotos para beta-talasemia, más de la mitad de ellos en Asia. En Europa, las mayores prevalencias de heterocigotos beta-talasémicos ocurren en Italia (2-15 %), Grecia (8%) y Chipre (18%). En la Península Ibérica (Pellicer A, 1967) la distribución es heterogénea variando la frecuencia en la población de 0,1 a 2,0%. Se estima que hay más de 4 millones de heterocigotos en el sur de Europa y alrededor de 200000 en Portugal y España (De las Nieves MA y cols, 1985) (GEHBTA, 1986). Antes de la introducción de los programas de diagnóstico intrauterino (Dozy AM y cols 1979) (Kazazian HH y cols 1988) (Kazazian HH Jr, 1990) , nacen anualmente alrededor de 650-700 talasémicos mayores en el sur de Europa, número que ha ido disminuyendo sensiblemente en los últimos años. También es heterogénea la distribución en América Latina y el Caribe, pero los valores más frecuentemente obtenidos en encuestas de detección de heterocigotos son de 1-2%. En estos países la beta-talasemia fué introducida principalmente por los portugueses, españoles e italianos. Desde el punto de vista molecular, a pesar de existir un gran número de mutaciones que causan las beta-talasemias, en general sólo un pequeño número de ellas son responsables de la enfermedad en cada raza o población. De este modo, fueron descritas alrededor de 20 mutaciones beta-talasémicas entre los mediterráneos (Cao A y cols, 1989), de los cuales ocho son comunes y sólo cuatro son responsables de más del 80% de los casos observados. Sin embargo, la frecuencia de cada una de las cuatro mutaciones es diferente en las diversas poblaciones mediterráneas (Fey Y y cols, 1989). El estudio de las beta-talasemias en Brasil corrobora su origen mediterráneo (Zago MA y cols, 1983) (Costa FF 1985) (Costa F, 1989).

Los datos poblacionales de las alfa-talasemias son más complejos (Higgs DR 1993) (Schwartz E y Atwater J, 1972). Las formas sintomáticas graves (hidropesía fetal y Hemoglobinopatía H) (Corral E y cols, 1994) son comunes en Asia (Tailandia, China, Indochina). Alrededor del 20 % de los negros son heterocigotos para la delección alfa 3.7; sin embargo, la enfermedad de HbH es rara y la hidropesía fetal no fue observada hasta ahora en esa raza, pues la alfa<sup>o</sup>-talasemia (es decir, la delección de los dos genes alfa del mismo cromosoma) es muy rara entre los negros. En países mediterráneos ocurren alfa<sup>o</sup> y alfa+-talasemias delecionables y no delecionables; por consiguiente, numerosos ejemplos de enfermedad de HbH han sido observados en Grecia, Italia, España y Portugal (Román L y cols, 1989) (Koler RD y Rigas DA, 1961). En España, la prevalencia de heterocigotos para la alfa talasemia delecional del tipo alfa 3,7 se estiman 1,5%. Deleciones (Med-Spain) y mutaciones puntuales específicas han sido descritas en este país. En Iberoamérica hay descripciones de algunos casos de HbH (genes de origen negro y mediterráneo). La prevalencia de alfa-talasemia delecional entre los pacientes negros y brasileños con anemia drepanocítica (Belloy M, 1992) es alrededor del 20%.

Finalmente, las beta-talasemias y las hemoglobinopatías estructurales no fueron hasta ahora identificadas en poblaciones de americanos no mestizados, donde la malaria fue introducida después de la llegada de los europeos en el siglo XV.

#### Alfa-Talasemia:

Las primeras prospecciones para determinar la prevalencia de alfa-talasemia en España se realizaron en áreas del Centro y de Cataluña, basándose en el hallazgo de cantidades elevadas de Hb Bart en recién nacidos (Calero F, 1982), demostrada por métodos electroforéticos (Naiget M, 1981) Ello permitió avanzar que la prevalencia de alfa-talasemias

En nuestro medio es del 0,199 %. Estudios posteriores han confirmado la presencia de esta forma de talasemia estableciéndose con mayor presión de prevalencia de la misma. Estos estudios, basados en mapa genético con enzimas de restricción, han permitido identificar la lesión



molecular de la alfa-talasemia en España, siendo la forma de delección de 3,7 kb (rigward deletion) la predominante aunque también se ha hallado esporádicamente la delección de 4,2 kb (leftward deletion).

### Beta-Talasemia

Se puede afirmar que la beta-talasemia está presente en todas las áreas geográficas estudiadas, con excepción del País Vasco. Sin embargo, su distribución es heterogénea, como muestran las cifras de porcentajes en las provincias del Centro y Sur de España. Por último cabe destacar la alta prevalencia de beta-talasemia encontrada en la Isla de Menorca, que coincide con la denominada "prevalencia isleña", concepto que pretende reflejar el mayor porcentaje de casos de esta patología encontrado en muchas islas de mediterráneo en relación con sus respectivos países continentales.

La lesión molecular de la beta-talasemia en España se ha estudiado recientemente (De las Nieves MA, 1990). La lesión más frecuente encontrada es la mutación sin sentido en el cordón 39 (Bunn HF, 1986). Sin embargo, en un reciente estudio realizado en Andalucía Occidental, la mutación en IVS-2 nucleótido 745 ha demostrado presentar una alta incidencia en este área (Adams JG, 1990). Por último, se debe destacar que la distribución geográfica de estas lesiones no es homogénea sino que varía según las diferentes áreas geográficas de la península.

### Delta Beta-Talasemia

En la tabla 1 se muestran dos datos disponibles actualmente en cuanto a la prevalencia de la delta beta-talasemia en España, en relación con el número de diagnósticos realizados de beta-talasemia heterocigota. debe destacarse la alta incidencia de esta forma de talasemia que se registra en la costa levantina. En concordancia con estos datos, siete de las ocho familias en las que se conoce la existencia de un sujeto homocigoto (Maige M, 1983) para delta beta-talasemia son oriundas de la provincia de Murcia. Los aspectos hematológicos de estos sujetos han sido minuciosamente estudiados, así como la lesión molecular que genera esta forma de talasemia en España, y que consiste en una delección de ADN (Ottolenghi S, 1982) que hace desaparecer los genes delta y beta de globina abarcando una determinada extensión deferente en otras formas de delta beta-talasemia mediterránea (Amselme S, 1988).

## Otros reordenamientos de genes de globina hallados en España.

El escaso interés que tiene en patología humana los reordenamientos de genes que controlan la síntesis de hemoglobinas embrionarias (Higg DR, 1990) y de la hemoglobina fetal -por su escasa o nula expresión en el adulto- no significa que estos genes no se vean afectados por lesiones que conduzcan a la aparición de su correspondiente forma de talasemia (por ej. gamma talasemia). En el Centro y sur del país se demuestra la existencia de triplicaciones de genes y cuadruplicación de genes gamma (Fei YJ, 1989).

### Hemoglobinas de fusión

La procedencia geográfica de estas hemoglobinas, revela que están presentes en aquellas áreas donde la prevalencia de beta-talasemia es alta, como es el caso de Extremadura o de la provincia de Cádiz. El análisis estructural de todos los casos que se relacionan, demuestra que la variante más frecuente hallada es la Hb Lepore-Borton.

## 2.4.- DETECCIÓN DE BETA Y DELTA-BETA TALASEMIAS HETEROCIGOTAS

### 2.4.1.- FUNDAMENTO

Es de gran interés la diferenciación entre talasemia heterocigota y ferropénia, especialmente en regiones donde el rasgo talasémico presenta elevada incidencia. Esto es así si consideramos que, al menos teóricamente, la incidencia de sujetos homocigotos para esta alteración puede ser reducida prácticamente a cero si todos los heterocigotos pueden ser detectados.

La determinación de los parámetros del metabolismo férrico (sideremia, capacidad total de saturación de la transferrina y ferritina) y la dosificación de hemoglobinas permite diferenciar entre anemia ferropénica y beta y delta-beta talasemias heterocigotas, en una gran mayoría de sujetos con microcitosis. Sin embargo, la realización de estas pruebas diagnósticas es evidentemente costosa si se pretendieran estudiar grandes masas de población o efectuar un estudio epidemiológico amplio. De ahí que se hayan buscado métodos diagnósticos alternativos útiles, de rápida realización y bajo coste.

#### 2.4.2.- ESTUDIOS INICIALES

Desde la introducción, hace algo más de dos décadas, de los contadores electrónicos de partículas mediante los que podemos realizar recuento celular y al mismo tiempo determinar una serie de índices eritrocitarios de gran valor para el estudio de la patología eritrocitaria, varios han sido los investigadores que han realizado estudios en cuanto a su utilización para la diferenciación entre beta-talasemia heterocigota y anemia ferropénica.

England y Fraser fueron los primeros en 1973, en utilizar los parámetros obtenidos mediante contador celular para diferenciar estos dos tipos de anemia. Su estudio se centró en 25 pacientes con microcitosis ferropénica y 28 pacientes con rasgo talasémico, en su estudio valoraron los 6 parámetros eritrocitarios obtenidos con un contador Coulter S (Coulter Electronics Inc, Hialeah, Fla). De los parámetros obtenidos, tres, hemoglobina, recuento de hematíes y volumen corpuscular medio, aunque considerados de forma aislada, mostraban un notable solapamiento entre los dos grupos de pacientes, pero cuando se utilizaban en combinación permitían una aceptable diferenciación entre ferropenia y rasgo beta-talasémico, lo que hizo que postularan una función discriminante:

$$F.D.= VCM - RE -(5 \times Hb) -8,4$$

Su aplicación en los grupos estudiados, resulto ser una función discriminante de signo negativo en todos menos uno de los pacientes con rasgo talasémico y de signo positivo en todos los pacientes con anemia ferropénica.

Posteriormente, Mentzer en 1973 postuló un índice de más sencilla aplicación consistente en dividir el VCM por el RE (recuento eritrocitario),

este índice se aplicó en un estudio de 103 pacientes, de los cuales 53 eran portadores de anemia ferropénica y 50 con rasgo talasémico alfa o beta, de los cuales 87 resultaron correctamente clasificados con el índice propuesto (VCM/RE) y los 86 restantes se clasificaron mediante la función discriminante de England y Fraser. Con ambos índices quedaba una fracción no desdeñable de pacientes que no pudieron ser clasificados por la aplicación de ninguna de las dos ecuaciones.

Cuatro años después, en 1977 Shine I y Lal S, realizaron un estudio en una población de 25.302 sujetos sanos con el fin de detectar beta talasémicos heterocigotos, a los que aplicaron las ecuaciones descritas por England y Fraser y por Mentzer, junto con otra propuesta por ellos consistente en multiplicar el VCM al cuadrado por la HCM. Con su propio índice detectaron el 99% de los sujetos con rasgo talasémico, lo que daba una alta sensibilidad diagnóstica que chocó con 1116 falsos positivos (4,4%). Al aplicar las ecuaciones descritas por Pearson, Mentzer y England y Fraser detectaron respectivamente el 92%, 47,8% y 55,1% de los beta talasémicos heterocigotos. En lo referente a la especificidad las ecuaciones de Mentzer y la de England y Fraser mostraron un 0,7 y 2,6% de falsos positivos respectivamente.

La utilidad diagnóstica de estos índices predictivos, fue testada posteriormente por otros autores. En 1975 Gimferrer y cols aplicaron los índices de England y Fraser y el de Mentzer a un grupo de 243 pacientes, 48 con beta talasemia heterocigota y 195 con microcitososis ferropénica. Con respecto a los pacientes con rasgo talasémico, la aplicación de la función discriminante de England y Fraser mostró valor negativo como correspondía al rasgo talasémico en un 77,5% de casos, un 14,5% obtuvieron valores inciertos y un 8% dieron valores positivos propios de ferropenia. El método de Mentzer aplicado a los pacientes talasémicos permitió clasificar correctamente al 48%, un 39,5% dieron valores inciertos y un 12,5% dieron valores de ferropenia. Con respecto a los pacientes con anemia ferropénica las ecuaciones de England y Fraser y la de Mentzer detectaron un 99% y un 87% de ellos, con un 0,5% y 10% de sujetos con valores inciertos respectivamente y un 0,5% y 1% de falsos negativos.

Johnson y cols. en 1983 evaluaron estos tres índices en 93 pacientes con microcitososis, 36 con ferropenia y 57 con beta talasemia menor. La ecuación de England y Fraser clasificó correctamente el 69% de los pacientes (27 ferropenias y 37 talasemias), la de Mentzer un 73% de los

pacientes (32 ferropenias y 36 talasemias) y, por último, la de Shine y Lal un 67% (8 ferropénicas y 54 Talasemias).

Aghai y cols en 1986 evaluaron nuevamente los índices anteriores en 115 niños con anemia microcítica, 75 con beta talasemia menor y 40 con microcitosis ferropénica. El índice de England y Fraser identificó correctamente 52 de las talasemias y 8 ferropenias, el de Mentzer clasificó bien 71 talasemias y 36 ferropenias y el de Shine y Lal 75 talasemias y 16 ferropenias. La clasificación de los niños en función de la presencia de microcitosis en uno de los padres, permitía detectar un mayor número de talasemias que los métodos referidos, lo que decidió a los autores a considerarlo como un método de detección aconsejable.

De todo ello se desprende que estas ecuaciones muestran unos resultados limitados no pudiendo ser consideradas validas en términos absolutos. Existe un solapamiento entre los valores de las anemias microcíticas estudiadas que imposibilita la obtención, con solo estos parámetros, de una ecuación con alta sensibilidad y especificidad.

#### 2.4.3.- VALORACIÓN DE LA ANISOCITÓISIS EN PACIENTES CON MICROCITÓISIS

Price-Jones 1922, publicó la primera experiencia sobre la determinación de la microcitosis eritrocitaria, basada en la determinación del diámetro de los hematies calculada por microscopia óptica, posteriormente en la década de los 70 empiezan a aparecer estudios realizados por métodos automatizados; England y Down 1974, utilizando un marcador Coulter modelo Fn, conectado a un Coulter Channelyzer, estudiaron las curvas de distribución de volumen eritrocitario que demostraron una desviación hacia la derecha, que sugería una distribución logarítmica. En la mayoría de los casos, demostraron que el logaritmo del volumen eritrocitario presentaba una distribución normal, en la que la representación del gráfico de frecuencias acumulativas mostraba una línea casi superpuesta a la recta. De esta distribución podía determinarse la mediana y la desviación estándar de los logaritmos del volumen eritrocitario y a partir de ésta calcular una serie de medidas de tendencia central y de dispersión. Se utilizaron dos medidas de dispersión como expresión del grado de anisocitosis que fueron, el intervalo de volumen y la razón o ratio de volumen, calculados del 95% de la población eritrocitaria, o lo que es lo mismo, la mediana más o menos 1,96 por la desviación estándar. El intervalo de volumen o diferencia entre el

volumen de los hematies mayores y menores no resultó de utilidad diagnóstica diferencial de las anemias microcíticas, ya que al depender de la media, que estaba disminuida, podía ser normal o incluso disminuido. El ratio de volumen al depender únicamente de la desviación estándar y no estar influenciado por el logaritmo de la mediana, resultó ser un buen indicador de anisocitosis, permitiendo diferenciar entre anemia ferropénica y beta talasemia heterocigota por ser mayor en la primera.

Bessman y Jhonson en 1975 estudiaron las curvas de distribución eritrocitaria utilizando el mismo sistema, un Coulter Channelyzer. En sujetos normales encontraron una curva de distribución eritrocitaria normal sobre la que podían determinar una serie de parámetros, definieron la amplitud de la curva de volumen eritrocitario, "EVR-50" según la expresión en inglés, y el VCM de la distribución como el VCM correspondiente al punto medio del intervalo referido.

En sujetos sanos encontraron una estrecha correlación entre el VCM determinado por el contador Coulter modelo ZBI y el extrapolado de la curva de distribución, siendo el EVR-50 en estos pacientes inferior a 40 micras cúbicas. Pero cuando determinaron estos parámetros en 10 pacientes con anemia microcítica por hemorragias digestivas, observaron diferencias notorias en el VCM determinado por ambos métodos y un EVR incrementado con respecto a los sujetos normales en 6 de los 10 pacientes. Estos resultados dieron pie a que concluyeran que el estudio de las curvas de distribución eritrocitaria podrían ser de utilidad en el estudio de las anemias microcíticas.

Tres años después, Bessman y Feinstein, 1979, con un contador Coulter ZBI con Channelyzer C-1000, estudiaron los eritrogramas obtenidos en pacientes con ferropenia y rasgo talasémico. Estos autores calcularon el coeficiente de variación de volumen eritrocitario como relación entre la desviación estándar y la media pero utilizando en esta ocasión, una distribución logarítmica. Así encontraron un coeficiente de variación superior al 14% en 53 pacientes con anemia ferropénica mientras que este coeficiente fue superior a 14% en 25 pacientes con beta talasemia menor.

En 1983 Jhonson y cols, estudiaron una serie de 93 pacientes con microcitosis, 36 por ferropenia y 57 por rasgo talasémico. Valoran los métodos de cuantificación de la anisocitosis arriba mencionada y su utilidad para diferenciar entre ambos procesos, utilizaron el mismo aparataje que los

anteriores autores y determinaron en estos pacientes los valores de "intervalo de volumen" según método de England y Down, el EVR-50 y el coeficiente de variación como habían propuesto Bessman y cols. encontrando una mejor resolución del EVR-50 que permitió clasificar correctamente al 100% de los pacientes, mientras que del intervalo de volumen o del coeficiente de variación se clasificaban bien el 88 y 84% respectivamente de los sujetos.

No obstante la cuantificación de la anisocitosis eritrocitaria en las anemias, no resultó utilizable dada su complejidad en la práctica clínica.

#### 2.4.4.- UTILIZACIÓN DE LOS CONTADORES ELECTRÓNICOS DE TERCERA GENERACIÓN. AMPLITUD DE DISTRIBUCIÓN ERITROCITARIA.

A finales de los años 70 aparecen los contadores celulares llamados de tercera generación; en la actualidad se determina, no solo el volumen corpuscular medio eritrocitario, sino también la medida del volumen de cada hematie y por ende se calcula de forma directa parámetros cuantificadores de la anisocitosis eritrocitaria. La introducción de datos derivados de la distribución de volumen eritrocitario para uso clínico ha ido acompañada de varios puntos de confusión (Brittenham y cols. 1987) así, el primer parámetro introducido "amplitud de distribución eritrocitaria" (ADE) o RDW según la terminología inglesa (Laso FJ y cols 1990), ha tenido diferentes definiciones no sólo entre diferentes fabricantes, sino también entre diferentes modelos del fabricante que lo introdujo por primera vez (Coulter Electronic Inc. Hialeah, Fla).

El primer aparato que determinaba automáticamente el ADE fue el modelo Coulter S Plus (Rowan y Col. 1979) que lo calculaba:

$$\text{ADE} = \frac{\text{Volumen del percentil 20} - \text{Volumen percentil 80} \times 100 \times 0,66}{\text{Volumen del percentil 20} + \text{Volumen percentil 80}}$$

Se consideraba como eritrocitos todas aquellas partículas cuyo tamaño este comprendido entre 20 y 360 fl. El factor 0,66 era un valor de corrección utilizado únicamente para normalizar los resultados a 10.

En sus modelos posteriores (S-Plus II-VI), Coulter Electronics ha determinado el ADE como coeficiente de variación de la distribución de

volumen de la población eritrocitaria comprendida entre los percentiles 16° y 84° y que supere el 20 % de la escala de la curva. Si el histograma muestra una distribución anormal, con una curva adicional que supere un 20% de la escala de volumen, esta segunda población es excluida y los cálculos son efectuados sobre la población principal, aunque el aparato puede indicarlo mediante una alarma.

Otros dos aparatos recientes definen el ADE como coeficiente de variación: modelo Cell-Dyn 200 (Sequoia-Turner, Mountain View, California) comercializado en 1985 y basado, a semejanza de los aparatos Coulter, en el principio de impedancia eléctrica (Bessman JD, 1986) y el modelo Technicon H-1 (Technicon Instruments Corp, Tarrytown, Nueva York) (Ross y Bentley, 1986; Fossat y cols, 1987) introducido en el mercado también en 1985 que emplea un sistema de cuantificación de la dispersión de rayos laser (Kim YR y cols, 1982; Tycko DM y cols, 1985; Mohandas N y cols, 1986). Sin embargo, los valores obtenidos no coinciden entre los diferentes aparatos. Aparatos más recientes, como el Sysmex E-5000 y EN-8000 (Tao Medical Electronics Co Ltd. Del Amo, California) basados en el principio de impedancia eléctrica calculan la amplitud de distribución eritrocitaria como desviación estandar Bessman JD, 1986).

La aplicación de un único parámetro derivado de la distribución de volumen eritrocitario es limitado, una única medida no puede ofrecer toda la información útil que puede extraerse de una distribución diferente a la normal, por ese motivo el ICSH (Comité Internacional para la Estandarización en Hematología) recomienda que la distribución del volumen eritrocitario se ajuste a una curva logarítmica, siendo calculados los parámetros estadísticos derivados de este tipo de distribución (ICSH 1982).

El primero que llevó la aplicación de la amplitud de distribución eritrocitaria, en el diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas, fue Bessman y cols, en 1983. Utilizando un contador Coulter modelo S Plus II, estos autores determinaron el VCM y ADE, proponiendo una clasificación de los diferentes tipos de anemia en función de estos dos parámetros y que ha sido posteriormente aceptada por otros autores (Karnard A y cols, 1985; McClure S y cols, 1985). Las anemias microcíticas las clasificaron en "microcitosiis homogénea" las que tenían un ADE normal, incluyéndose en este grupo las talasemias heterocigotas, y en "microcitosiis heterogénea" en las que se incluía la anemia ferropénica.



volumen de la población eritrocitaria comprendida entre los percentiles 16° y 84° y que supere el 20 % de la escala de la curva. Si el histograma muestra una distribución anormal, con una curva adicional que supere un 20% de la escala de volumen, esta segunda población es excluida y los cálculos son efectuados sobre la población principal, aunque el aparato puede indicarlo mediante una alarma.

Otros dos aparatos recientes definen el ADE como coeficiente de variación: modelo Cell-Dyn 200 (Sequoia-Turner, Mountain View, California) comercializado en 1985 y basado, a semejanza de los aparatos Coulter, en el principio de impedancia eléctrica (Bessman JD, 1986) y el modelo Technicon H-1 (Technicon Instruments Corp, Tarrytown, Nueva York) (Ross y Bentley, 1986; Fossat y cols, 1987) introducido en el mercado también en 1985 que emplea un sistema de cuantificación de la dispersión de rayos laser (Kim YR y cols, 1982; Tycko DM y cols, 1985; Mohandas N y cols, 1986). Sin embargo, los valores obtenidos no coinciden entre los diferentes aparatos. Aparatos más recientes, como el Sysmex E-5000 y EN-8000 (Tao Medical Electronics Co Ltd. Del Amo, California) basados en el principio de impedancia eléctrica calculan la amplitud de distribución eritrocitaria como desviación estandar Bessman JD, 1986).

La aplicación de un único parámetro derivado de la distribución de volumen eritrocitario es limitado, una única medida no puede ofrecer toda la información útil que puede extraerse de una distribución diferente a la normal, por ese motivo el ICSH (Comité Internacional para la Estandarización en Hematología) recomienda que la distribución del volumen eritrocitario se ajuste a una curva logarítmica, siendo calculados los parámetros estadísticos derivados de este tipo de distribución (ICSH 1982).

El primero que llevó la aplicación de la amplitud de distribución eritrocitaria, en el diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas, fue Bessman y cols, en 1983. Utilizando un contador Coulter modelo S Plus II, estos autores determinaron el VCM y ADE, proponiendo una clasificación de los diferentes tipos de anemia en función de estos dos parámetros y que ha sido posteriormente aceptada por otros autores (Karnard A y cols, 1985; McClure S y cols, 1985). Las anemias microcíticas las clasificaron en "microcitosis homogénea" las que tenían un ADE normal, incluyéndose en este grupo las talasemias heterocigotas, y en "microcitosis heterogénea" en las que se incluía la anemia ferropénica.

En 1985 Roberts GT y El Badawi SB, con un contador Coulter S-Plus estudiaron pacientes con diferentes tipos de anemia. Estos autores, en contra de lo demostrado hasta el momento, encuentran un incremento del ADE en pacientes con beta-talasemia heterocigota que es superior al de los pacientes con anemia ferropénica. Estos autores justifican sus hallazgos en base a una supuesta correlación entre ADE y recuento reticulocitario, aunque no especifican el grado de esta correlación.

Marti HR y cols. 1987, con un marcador Sysmex E-5000, que utiliza el principio de impedancia eléctrica, determinaron la amplitud de distribución de la serie roja en 81 pacientes con microcitosis, beta-talasemia heterocigota o ferropenia. Este parámetro para la detección del rasgo talasémico muestra una sensibilidad del 79%, con una especificidad del 95% y un valor predictivo del 94%. Comparando la amplitud de distribución eritrocitaria por este sistema con los métodos de England JM y Fraser PM, Mentzer WC Shine I y Lal S 1977, este parámetro resulta superior para la detección del rasgo beta-talasémico.

Flyn MM y cols. 1986, estudiaron el ADE con un contador Coulter S Plus-IV en 184 pacientes con microcitosis entre ellos 68 con ferropenia y 97 con talasemia (68 presentaban rasgo alfa talasémico y 24 beta talasemia heterocigota). El ADE calculado con este contador mostró en los pacientes ferropénicos una media de 18, 2%, incrementándose en el 94% de los sujetos. En el grupo de pacientes con rasgo talasémico, la media del ADE fue de 14,9%, pero estaba incrementado en un 48% de ellos. Al encontrarse un importante solapamiento entre los valores de ADE en ambos grupos, este parámetro no mostró un buen valor predictivo, solo se clasificaron correctamente el 69 % de los pacientes con microcitosis. Este estudio dejó sin determinar el metabolismo del hierro a todos los pacientes con rasgo talasémico, por lo que no descarta que entre los mismos no se encontraban algunos con componente ferropénico asociado.

Laso FJ y cols., 1990, determino el ADE mediante un contador Coulter S Plus IV y V en 43 pacientes con anemia microcítica ferropénica y en 40 con rasgo beta talasémico, 12 casos presentaban ferropenia asociada. Tomando un nivel de ADE de 18%, encontraron un valor predictivo positivo del 95% para pacientes con ferropenia, pero solo el 59% para pacientes con talasemia sin ferropenia asociada. Los pacientes talasémicos con componente ferropénico el ADE se encontró elevado en niveles semejantes a los pacientes ferropénicos. En conclusión, se deduce de este estudio que el

ADE de forma aislada no tiene capacidad discriminante entre ambos procesos.

Cuando se determinaba el ADE a pacientes con delta beta talasemia heterocigota, los valores obtenidos eran semejantes a los de la anemia ferropénica. Miguel y cols en 1988, estudiaron 477 pacientes con microcitos, 116 ferropenias, 186 beta talasemias heterocigotas y 175 delta beta talasemias heterocigotas. El ADE no mostraba diferencias entre ferropenia y delta beta talasemia, pero en ambas el ADE era significativamente superior al que presentaban los pacientes con beta talasemia. Por todo ello el ADE empleado como parámetro aislado, no tiene utilidad para diferenciar entre ferropenia y rasgo talasémico en aquellas zonas con alta incidencia de delta beta talasemia.

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los conocimientos actuales sobre los síndromes talasémicos, hemos considerado de interés realizar un análisis de esta patología en un área geográfica de marcada prevalencia talasémica como es el Área que bordea la laguna de La Albufera (Área de Salud 09 de la Comunidad Valenciana). Este estudio se ha realizado con el fin de analizar los siguientes aspectos:

- Análisis epidemiológico-descriptivo de las alteraciones talasémicas en el área geográfica de La Albufera.

- Comprobar la reproductividad de los parámetros y métodos discriminantes, comúnmente utilizados, frente a nuestros pacientes.

- Analizar mediante metodología estadística los parámetros y métodos de detección de más alto poder discriminante.

- Calcular mediante metodología estadística a partir de nuestra población con microcitosis, ecuaciones que permitan discriminar los síndromes talasémicos entre sí y estos de los status ferropénicos.

- Realizar un análisis estadístico de series temporales con distribución estacional, que permitirá proyectar la evolución futura de la incidencia de los síndromes talasémicos y estatus ferropénicos.

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.1.- Población estudiada

##### 4.1.1.-Área Sanitario Demográfica 09 de la Comunidad Valenciana.

Este área esta situada bordeando la laguna de La Albufera de Valencia siendo su delimitación geográfica la que se observa en el gráfico 1.

La población total de este área es de 320.791 habitantes, siendo el porcentaje de mujeres del 52%, observándose en su pirámide poblacional ( gráfico 1) grandes contingentes de personas en los grupos de edades intermedias.

##### 4.1.2. Grupo total de estudio.

La población estudiada fue un total de 871 pacientes, sin distinción de edad ni diferenciación de sexos, con el diagnóstico previo de microcitosis, desde el año 1976 hasta noviembre de 1996.

##### 4.1.3. Grupo Anemias Ferropénicas.

Se consideraron cifras de sideremia inferior a 50 mcg/dl y ferritinas inferiores a 15 ng/ml, contabilizandose un total de 296 pacientes, de los cuales se obtubieron los siguientes parámetros:

- . 285 pacientes: número hematíes.
- . 200 pacientes: valor hematocrito.
- . 285 pacientes: valor hemoglobina.
- . 279 pacientes: valor VCM.
- . 202 pacientes: valor HCM.
- . 129 pacientes: valor CHCM.
- . 77 pacientes: valor ADE.
- . 109 pacientes: valor ferritina.
- . 195 pacientes: valor transferrina.







#### 4.1.5 Grupo beta-talasemias heterocigotas.

Se consideraron cifras de Hb A2 superiores a 3,6% y de Hb F entre 1 y 5% (según criterios Weatherall ), contabilizándose un total de 383 pacientes, de los cuales se obtuvieron los siguientes parámetros hematimétricos:

- . 381 pacientes: número de hematíes.
- . 374 pacientes: valor hematocrito.
- . 356 pacientes: valor Hb.
- . 381 pacientes: valor VCM.
- . 377 pacientes: valor HCM.
- . 334 pacientes: valor CHCM.
- . 215 pacientes: valor ADE.
- . 94 pacientes: valor ferritina.
- . 221 pacientes: valor transferrina.

#### 4.1.5.- Grupo beta-delta talasemias heterocigotas

Se consideraron cifras de Hb A2 entre 1,2 y 3,4% y de Hb F superiores al 5% (criterios de Weatherall), contabilizándose un total de 213 pacientes, de los cuales se obtuvieron los siguientes parámetros hematimétricos:

- . 213 pacientes: número de hematíes.
- . 208 pacientes: valor Hematocrito.
- . 213 pacientes: valor Hb.
- . 213 pacientes: valor VCM.
- . 201 pacientes: valor HCM.
- . 172 pacientes: valor CHCM.
- . 178 pacientes: valor ADE.
- . 75 pacientes: valor ferritina
- . 90 pacientes: valor transferrina

## 4.2.- Método

### 4.2.1.- Recogida de los datos

Todos los hallazgos demográficos y hematológicos, hasta un total de 51 variables, fueron obtenidos revisando las historias clínicas de cada paciente. Estos datos se recogieron de forma retrospectiva en una ficha específicamente diseñada al efecto.

Las variables analizadas, así como las opciones de cada una de las variables categóricas son las siguientes:

#### DATOS REGISTRO

Número de registro

Número historia clínica

Apellidos

Nombre

Fecha de nacimiento

Fecha de admisión

Fecha de diagnóstico

Edad

Sexo

#### Diagnóstico previo

Anemia ferropénica

Beta talasemia

Beta- Delta talasemia

#### Antecedentes Familiares

Anemia ferropénica

Anemia microcítica

Rasgo alfa o beta talasémico

**Datos de laboratorio****Hematíes****Hto.****Hb.****VCM.****HCM****CHCM****ADE****Reticulocitos****Leucocitos****Plaquetas****Morfología serie roja****Anisocitosis****Poiquilocitosis****Hipocromía****Microcitosis****Policromasia****Punteado basófilo****Hematíes diana****Esferocitos****Cuerpos de Howell-jolly****Anillos de Cabot****Pruebas especiales****Dosificación de Hb A2****Dosificación de Hb Fetal****Test de Kleinhauer****Cuerpos de inclusión de Hb H****Otras hemopatías****Test de isopropanol****Test de termoestabilidad****Sideremia****Ferritina****Transferrina****Coombs directo**

#### 4.2.2.- Metodología Estadística

El análisis estadístico comprendió una primera parte descriptiva y una segunda comparativa o inferencial.

##### 4.2.2.1.- Estadística descriptiva

En el estudio descriptivo se incluyó el cálculo de distintos estadísticos de distribución (media, mediana, intervalo, desviación estándar, varianza, frecuencia de sucesos en distintas clases) obteniéndose mediante fórmulas estándar.

##### 4.2.2.2.- Estadística comparativa

Para el estudio de las variables y/o funciones discriminantes se utilizaron los métodos estadísticos que se describen a continuación:

- Análisis de la varianza de una vía.

Variable cualitativa: tipo de microcitosis.

Variables cuantitativas:

Recuento de hematíes  
Hemoglobina  
Hematocrito  
VCM  
HCM  
CHCM  
ADE  
Sideremia  
Transferrina  
Ferritina  
Reticulocitos

- Análisis de series temporales con determinación de la estacionalidad del diagnóstico de las microcitosis.

- Regresión logística utilizando una técnica "forward-Stepwise" con calculo de la significación de cada uno de los coeficientes que afectan a las variables incluidas en el modelo y de la proporción de casos correctamente clasificados de acuerdo a dicho modelo.

#### 4.2.3.- Soporte informatico (Software).

Se ha utilizado el programa estadístico SPSS para Windows en la elaboración estadística, a partir de resultados integrados en la base de datos DB-3.

## RESULTADOS

## 5.- RESULTADOS.

### 5.1.- Parámetros socio-demográficos.

Los parámetros sociodemográficos que caracterizan el área 09 de la Comunidad Valenciana, son los que a continuación se indican:

#### 5.1.1.- Prevalencia de la microcitosis:

<u>Microcitosis</u>	<u>casos</u>	<u>% total pobl.</u>
Beta-talasemia	377	0,1
Delta-beta talas.	204	0,06
Ferropenia	290	0,09
Total	871	0,27

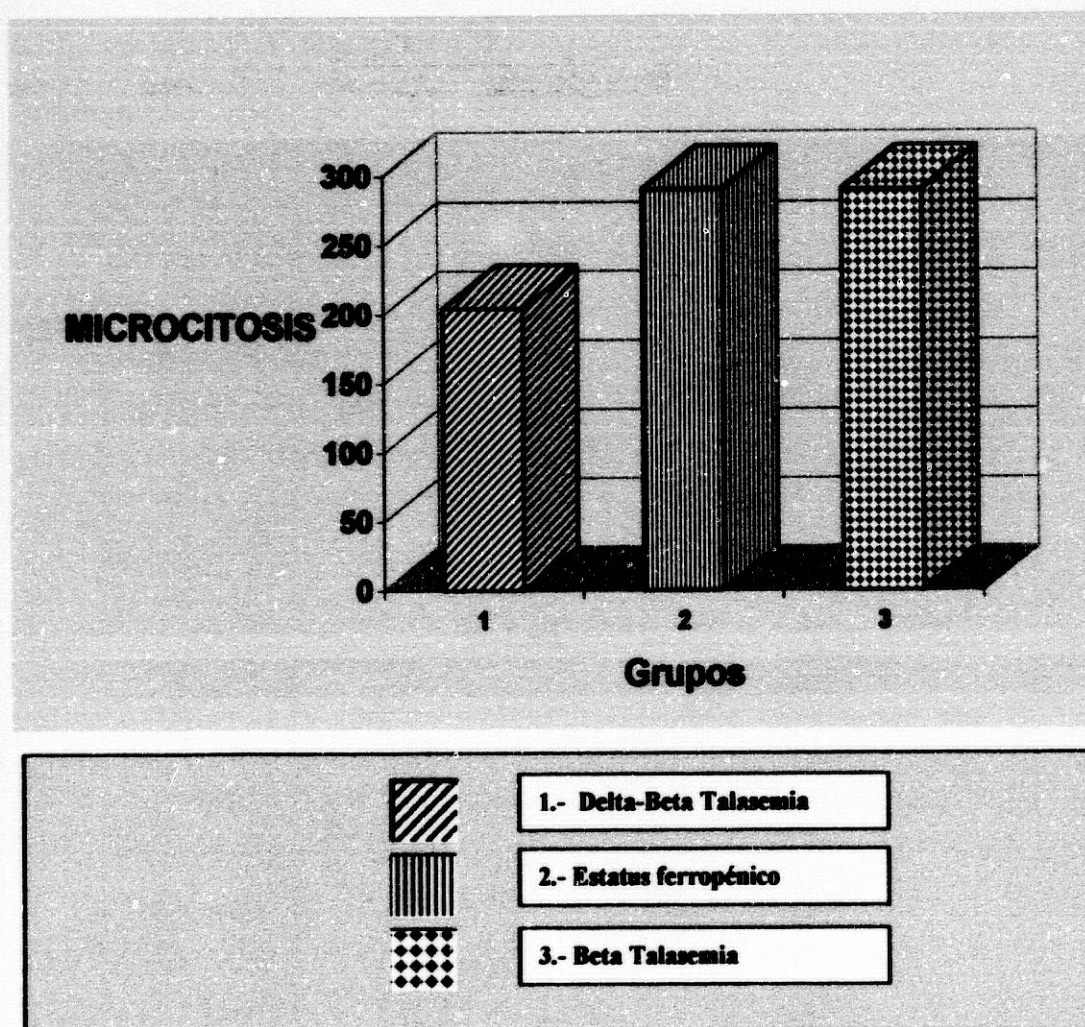


## 5.1.1.- PREVALENCIA MICROCITOSIS

## VARIABLE MICROCITOSIS

GRUPO	
Belta talasemias	290
Delta-beta talasemia	204
Anemias Ferropénicas	290
Total Microcitosis	871

TABLA 2

**Variable MICROCITOSIS****FIGURA 2**

## 5.1.2.- EDAD

Variable: EDAD

Análisis de la Varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	50051	25025	68	,0
Intra grupos	868	316732	364		
Total	870	366784			

Grupo	n	Media	Desv.Std	Intervalo de Confianza del 95%		
1	204	31	19	34	TO	307924
2	290	47	18	49	TO	330029
3	377	30	19	32	TO	29195
Total	871	36	20	37	TO	301524

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		3	1	2
Media	ANEM			
30	Grp 3			
31	Grp 1			
47	Grp 2	*	*	

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 3

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p > 0.05$ )

## VARIABLE EDAD

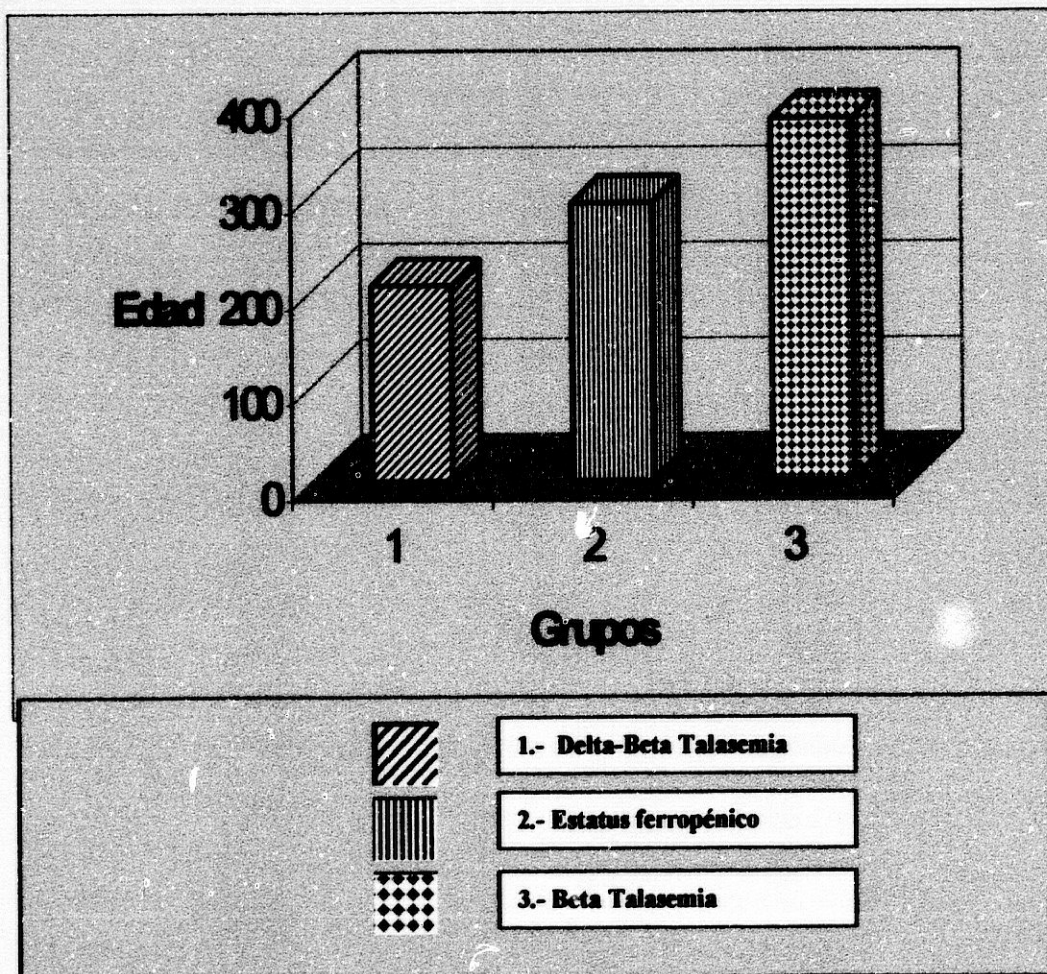


FIGURA 3

## 5.1.3.- SEXO

## VARIABLE SEXO (sobre el total casos)

SEXO	número	% del total
Varones	308	35,36
Mujeres	583	66,93
Total	871	

TABLA 4

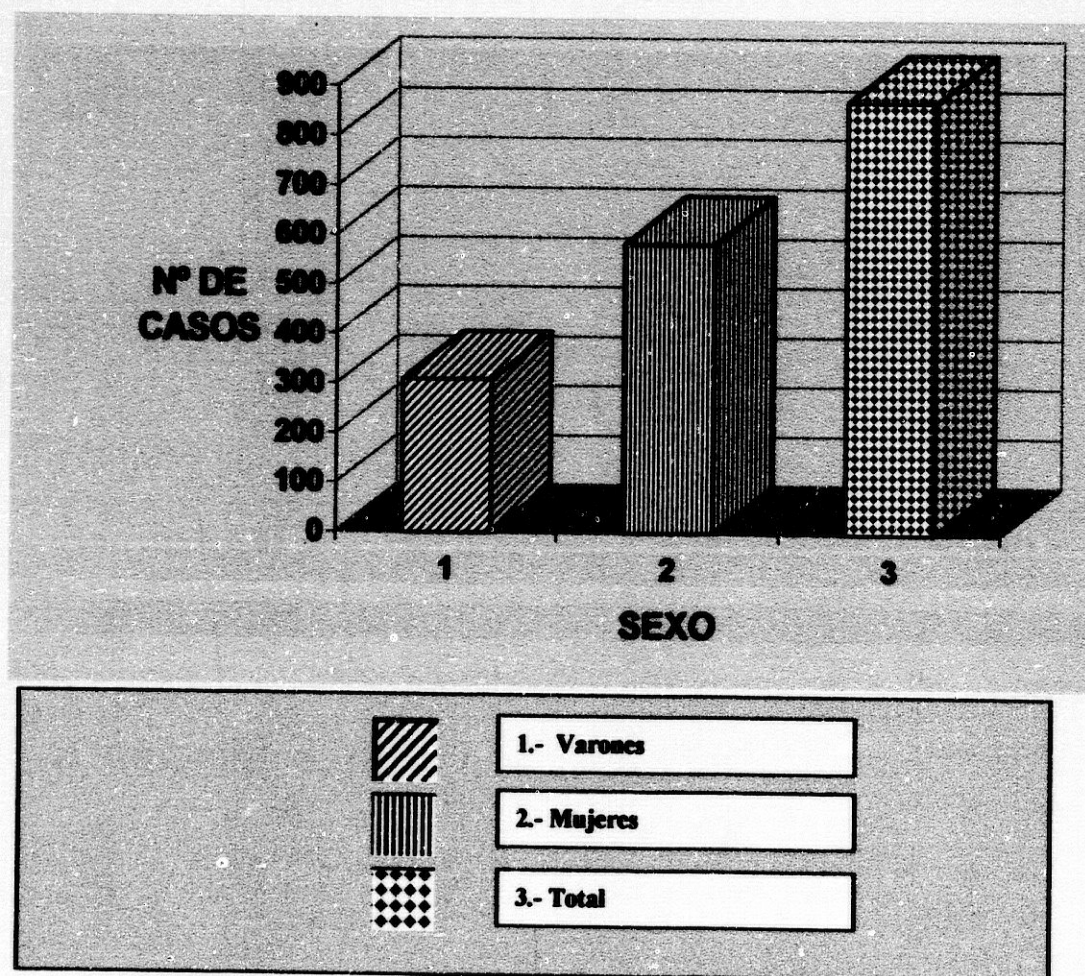
Variable SEXO

FIGURA 4

## 5.2 PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS

### 5.2.1 RECUENTO ERITROCITARIO

Variable HEMATIES

Análisis de la Varianza					
	G.L	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	3	1	356	,0
Intra grupos	847	4	4		
Total	849	7			

Grupos	n	Media	Dev.Std	Intervalo de confianza del 95%		
1	212	5548433	583425	54694452	TO	5627422
2	257	4242902	808372	41436029	TO	4342203
3	381	5662362	664164	55954592	TO	5729265
Total	850	5204769	939464	5141522	TO	5268016

#### Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		2	1	3
Media	ANEM			
4242902	Grp 2			
5548433	Grp 1	*		
5662362	Grp 3	*		

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 5

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

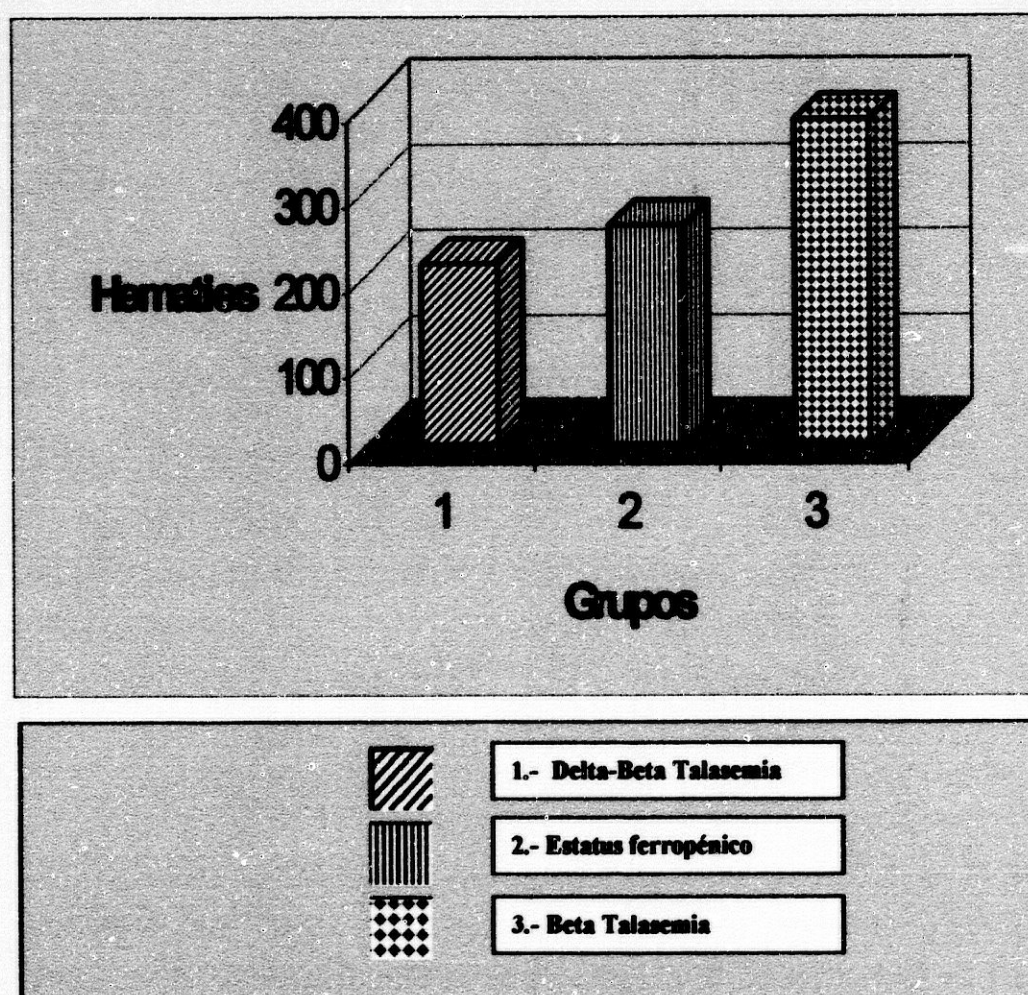
Variable HEMATIES

FIGURA 5



## Variable HB

Análisis de la Varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	1216	608	91	,0
Intra grupos	873	5828	6		
Total	875	7045			

Grupo	n	Media	Desv.Std.	Intervalo de Confianza 95%		
1	212	11	1	11	TO	11
2	284	9	3	8	TO	9
3	380	11	2	11	TO	11
Total	876	10	2	10	TO	10

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
Media	ANEM			
9	Grp 2			
11	Grp 3	*		
11	Grp 1	*		

- 1.- Delta-Beta Talasemia
- 2.- Status ferropénico
- 3.- Beta-Talasemias

TABLA 6

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

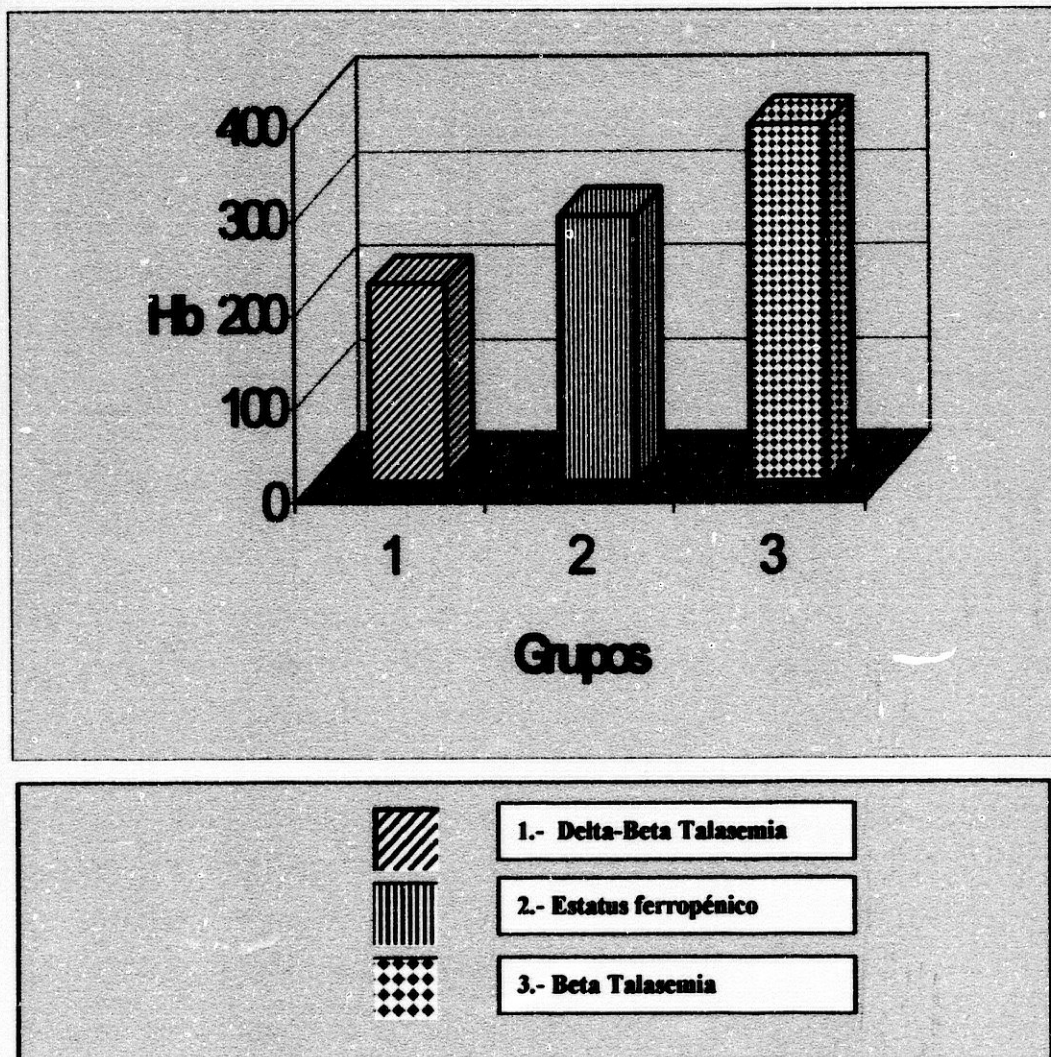
Variable HB

FIGURA 6

## Variable HEMATOCRITO

Análisis de la Varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	6159	3079	94	,0
Intra grupos	778	25479	32		
Total	780	31638			

Grupo	n	Media	Dev.Std.	Intervalo de confianza 95%	
0	206	35	3	35 TO	36
1	198	29	8	28 TO	30
2	374	35	4	35 TO	36
Total	778	34	6	33 TO	34

## Análisis "post hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		2	3	1
Media	ANEM			
29	Grp 2			
35	Grp 3			
35	Grp 1			

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

Tabla 7

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p > 0.05$ )

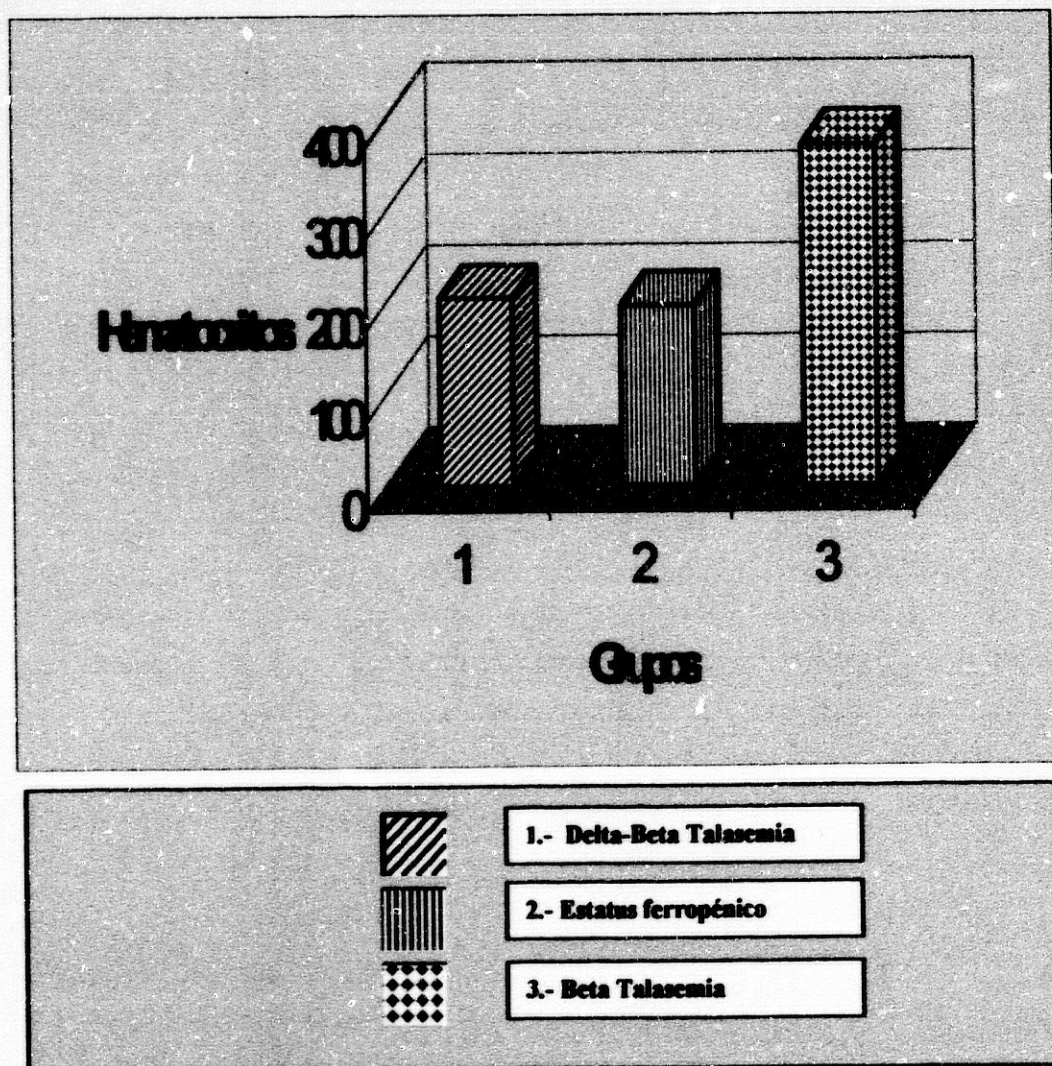
Variable HEMATOCRITO

FIGURA 7

## 5.2.4.- VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

## VARIABLE VCM

Análisis de la variable					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	p
Entre grupos	2	7457	3728	84	,0
Intra grupos	847	37329	44		
Total	849	44786			

Grupo	n	media	Dev.Std	Intervalo de confianza del 95%		
1	211	65	4	65	TO	66
2	268	71	9	69	TO	72
3	371	64	5	63	TO	64
Total	850	66	7	66	TO	67

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		3	1	2
Media	ANEM			
64	Grp 3			
65	Grp 1	*		
71	Grp 2	*	*	

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 8

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p > 0.05$ )

## Variable VCM

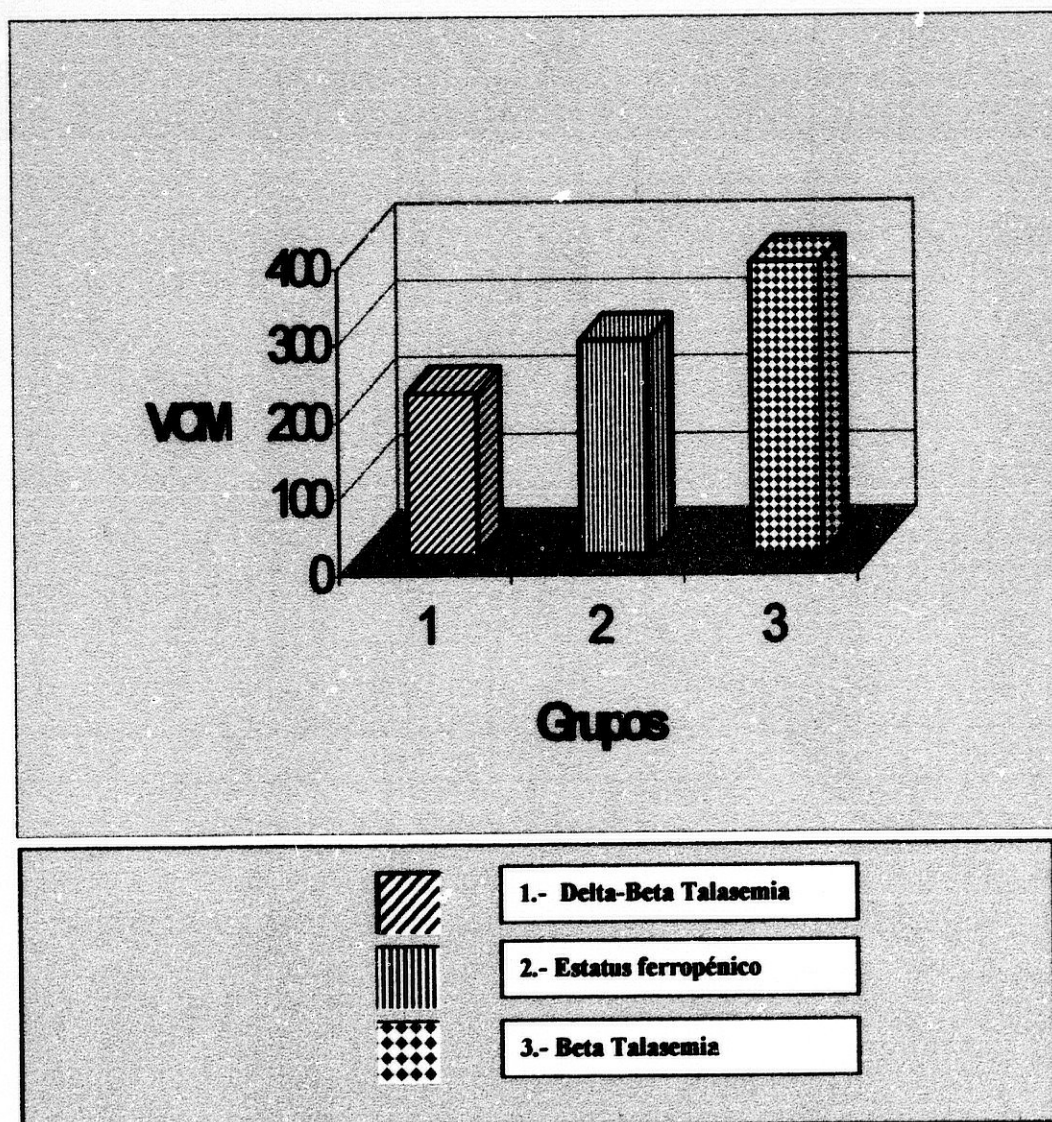


FIGURA 8

## 5.2.5.- HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

## Variable HCM

Análisis de la varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	581	290	11	,0
Intra grupos	777	19918	25		
Total	779	20499			

Grupo	n	Media	Dev.Std.	Intervalo de Confianza 95%		
1	200	21	2	20	TO	21
2	203	22	8	21	TO	23
3	377	20	3	20	TO	21
Total	780	21	5	21	TO	21

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls"

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		3	1	2
Media	ANEM			
20	Grp 3			
21	Grp 1			
22	Grp 2	*	*	

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 9

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

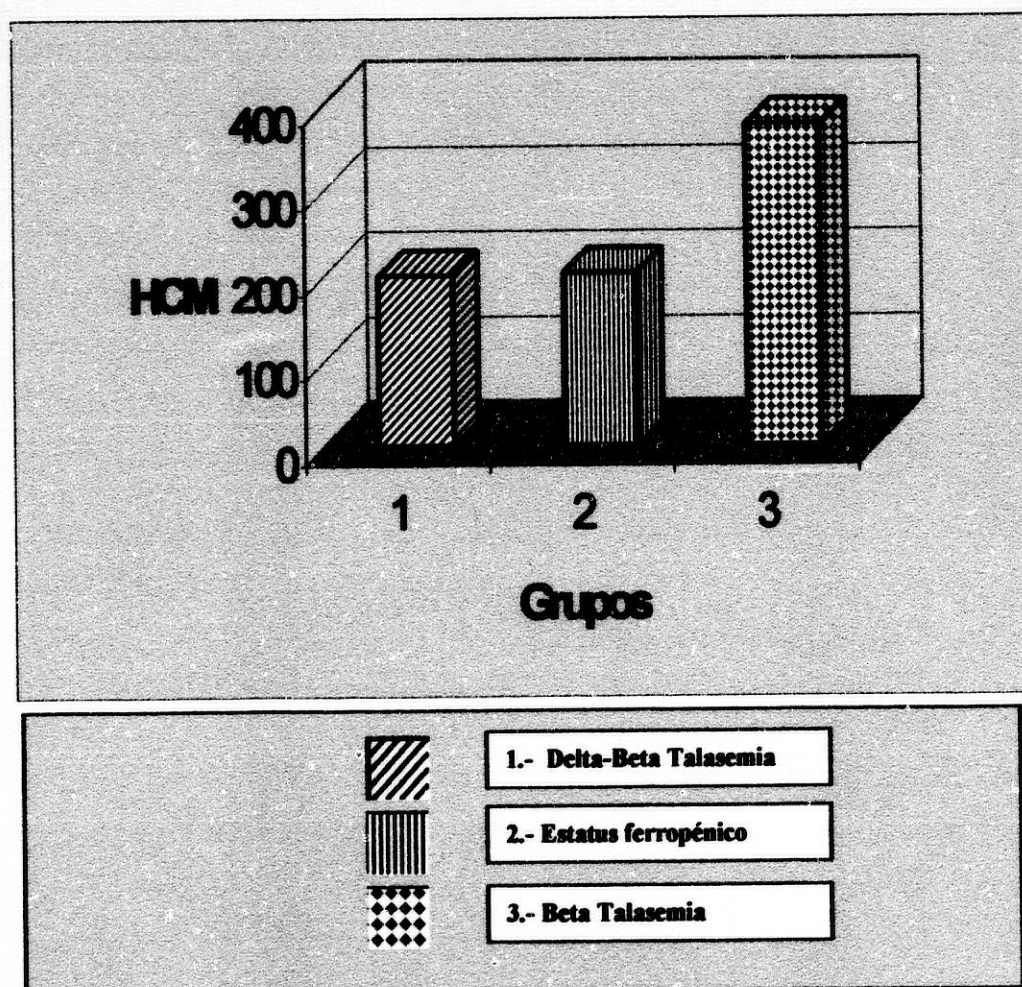
Variable HCM

FIGURA 9



## Variable CHCM

Análisis de la Varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre Grupos	2	272	136	25	,0
Intra Grupos	631	3389	5		
Total	633	3661			

Grupo	n	Media	Dev.Std.	Intervalo de confianza 95%		
1	170	32	2	31	TO	32
2	130	30	3	29	TO	31
3	334	31	1	31	TO	32
Total	634	31	2	31	TO	31

## Análisis "post-hod" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		2	3	1
Media	ANEM			
30	Grp 2			
31	Grp 3	*		
32	Grp 1	*		

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 10

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

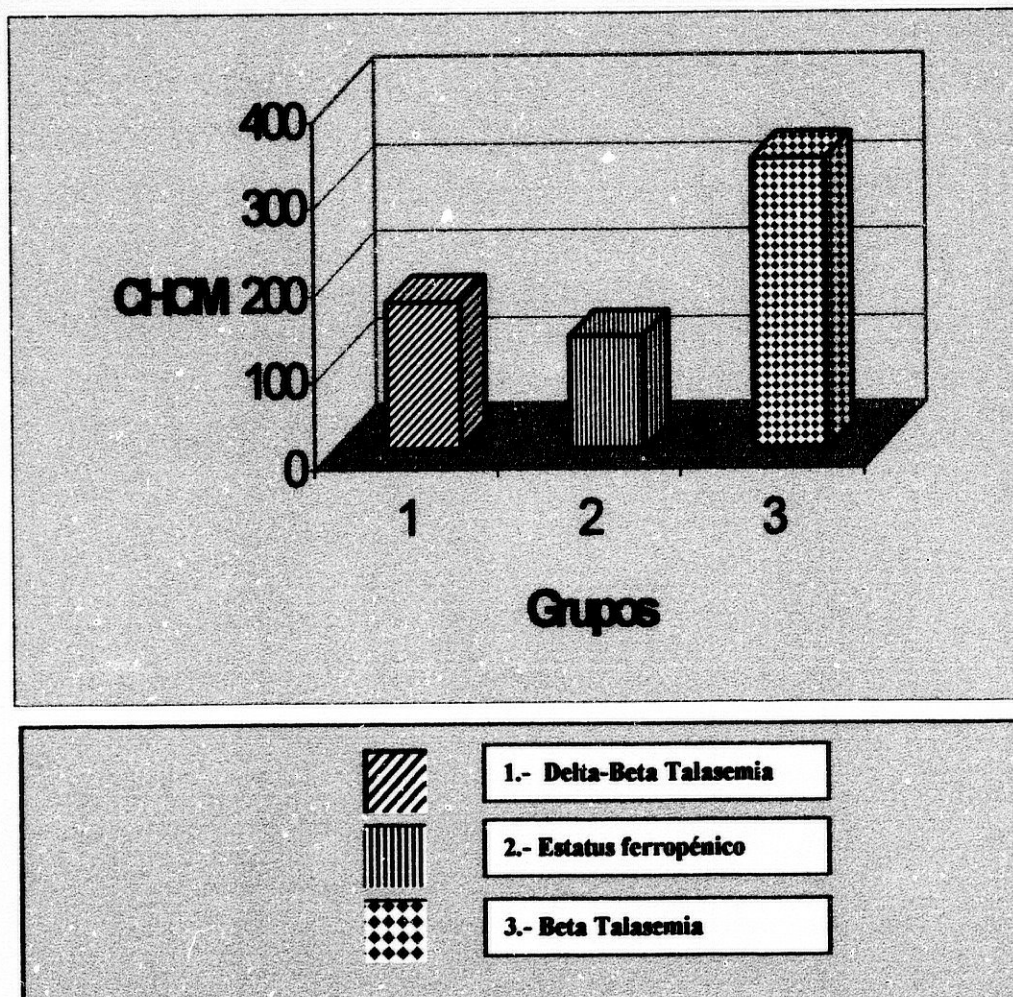
Variable CHCM

FIGURA 10

## Variable ADE

Análisis de la varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	1541	770	84	,0
Intra grupos	451	4124	9		
Total	453	5665			

Grupo	n	Media	Dev.Std.	Intervalo de Confianza 95%		
1	176	18	2	18	TO	19
2	74	18	5	17	TO	20
3	204	15	1	14	TO	15
Total	454	17	3	16	TO	17

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		3	1	2
Media	ANEM			
15	Grp 3			
18	Grp 1	*		
18	Grp 2	*		

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 11

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

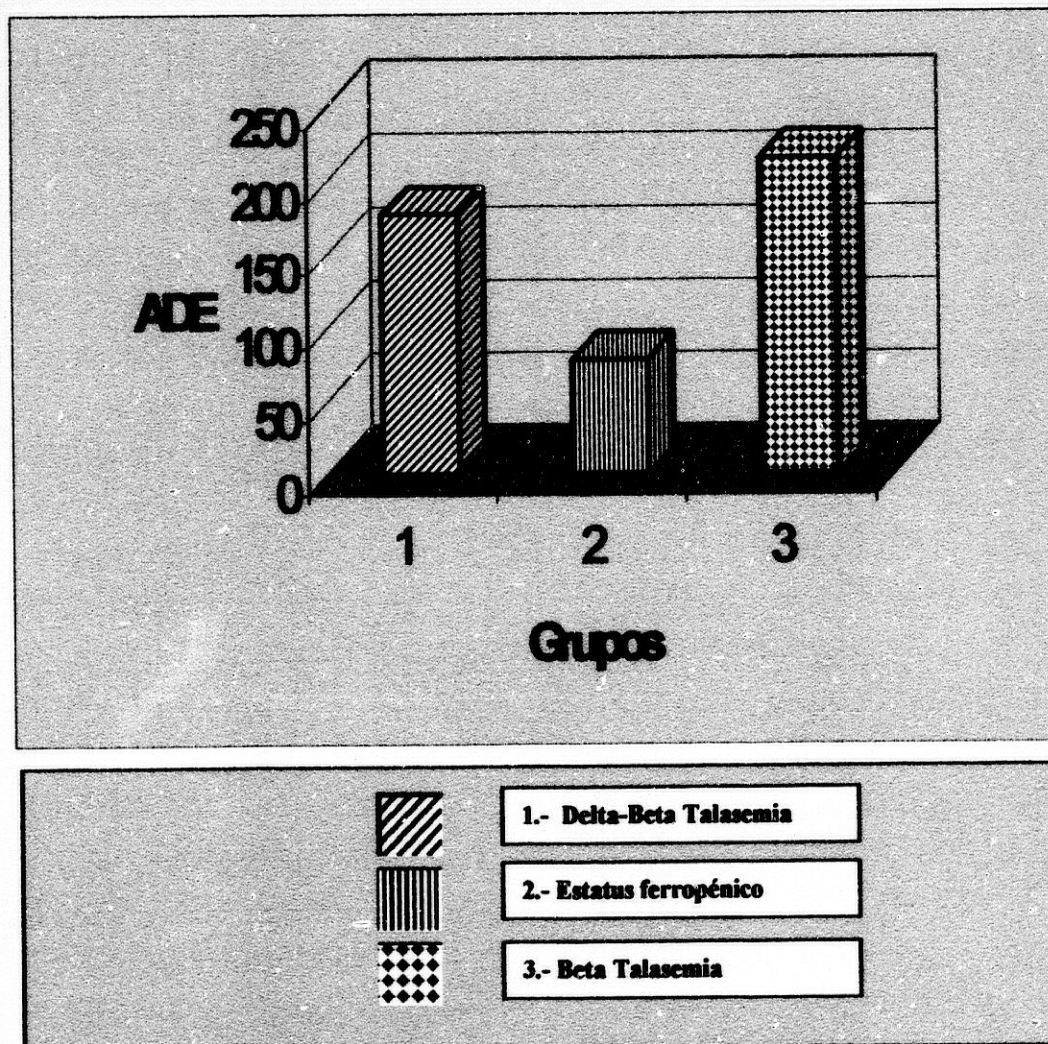
Variable ADE

FIGURA 11

## Variable SIDEREMIA

Análisis de la Varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	815179	407589	443	,0
intra grupos	797	732890	919		
Total	799	1548069			

Grupo	n	media	Desv std	Intervalo de confianza del 95%		
1	180	97	35	92	TO	102
2	269	29	21	27	TO	32
3	351	97	33	93	TO	100
Total	800	74	44	71	TO	77

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls.

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		2	1	3
Media	ANEM			
29	Grp 2			
97	Grp 1	*		
97	Grp 3	*		

- 1.- Delta-Beta Talasemia
- 2.- Status ferropénico
- 3.- Beta-Talasemias

TABLA 12

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## Variable SIDEREMIA

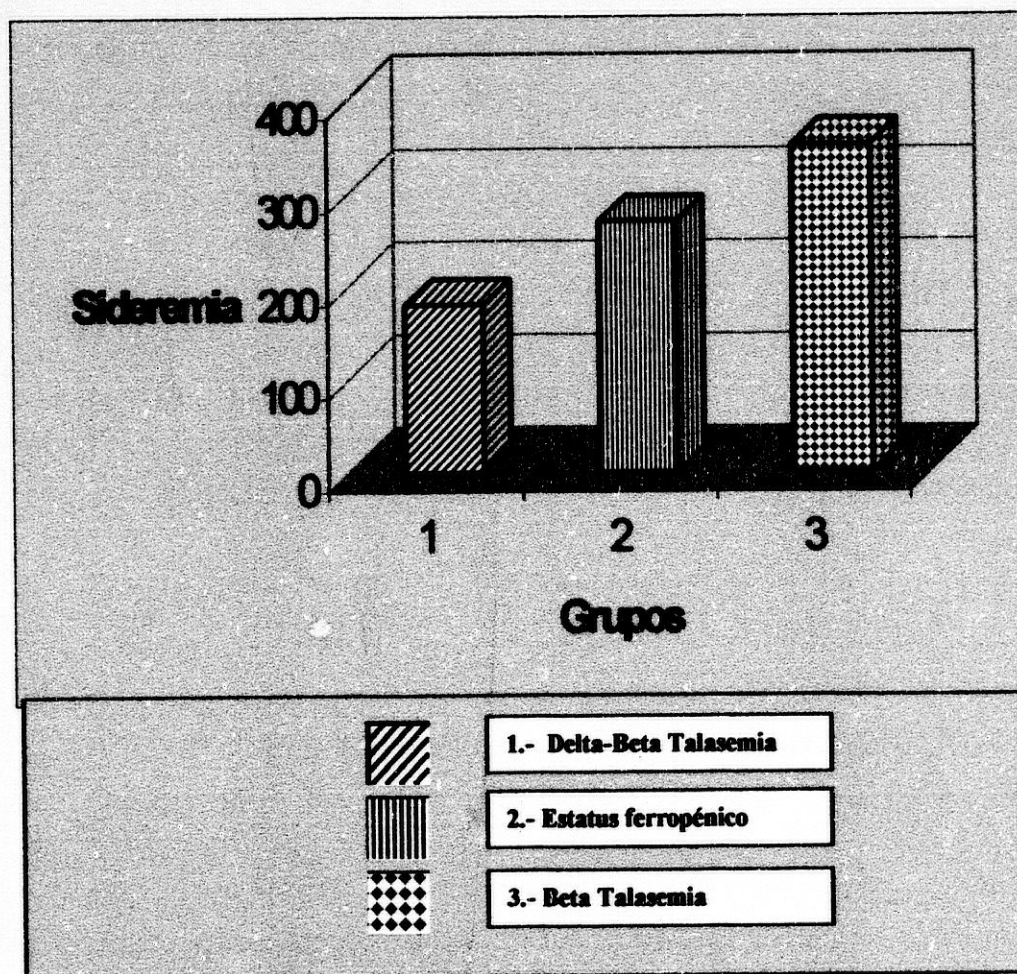


FIGURA 12

## Variable FERRITINA

Análisis de la Varianca					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre Grupos	2	549648	274824	26	,00
Intra Grupos	271	2768424	10215		
Total	273	3318072			

Grupo	n	Media	Dev. Std.	Intervalo de Confianza del 95%		
1	151	293205	91539	278486	TO	307924
2	142	310473	117879	290917	TO	330029
3	181	278582	79173	266970	TO	290195
Total	474	292794	96727	284064	TO	301524

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		2	1	3
Medida	ANEM			
9	Grp 2			
94	Grp 1	*		
106	Grp 3	*		

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 13

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## Variable TRANSFERRINA

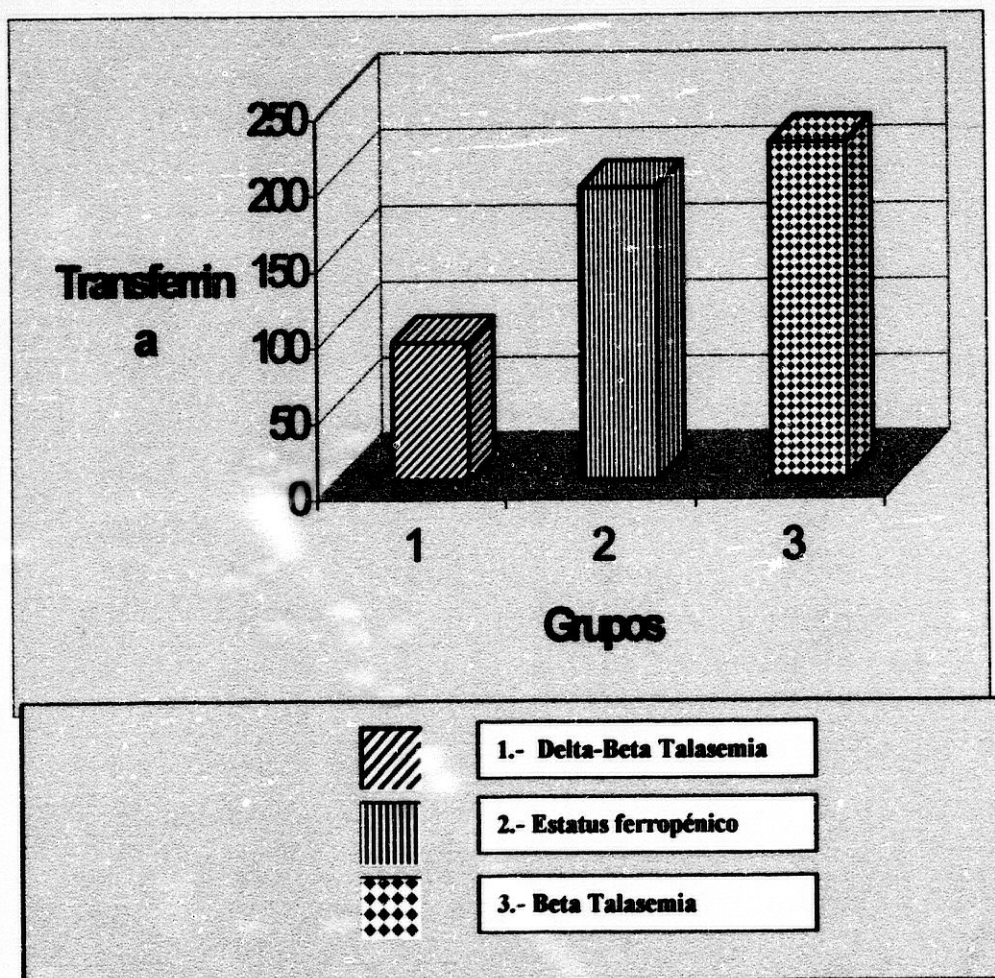


FIGURA 14



## Variable RETICULOCITOS

Análisis de la Varianza					
	G.L.	Cuadrados	Cuadrados	F	P
Entre grupos	2	17594637557	8797318779	6	,0
Intra grupos	576	8	1413955060		
Total	578	8			

Grupo	n	Media	Dev.Std.	Intervalo de confianza del 95%		
1	167	63920	30759	59220	TO	68619
2	166	56204	48254	45809	TO	60599
3	246	66114	33391	61921	TO	70308
Total	579	61780	37940	58683	TO	64877

## Análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
		2	1	3
Media	ANEM			
53204	Grp 2			
63920	Grp 1	*		
66114	Grp 3	*		

1.- Delta-Beta Talasemia

2.- Status ferropénico

3.- Beta-Talasemias

TABLA 15

Los asteriscos indican entre que grupos se presenta la diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## Variable RETICULOCITOS

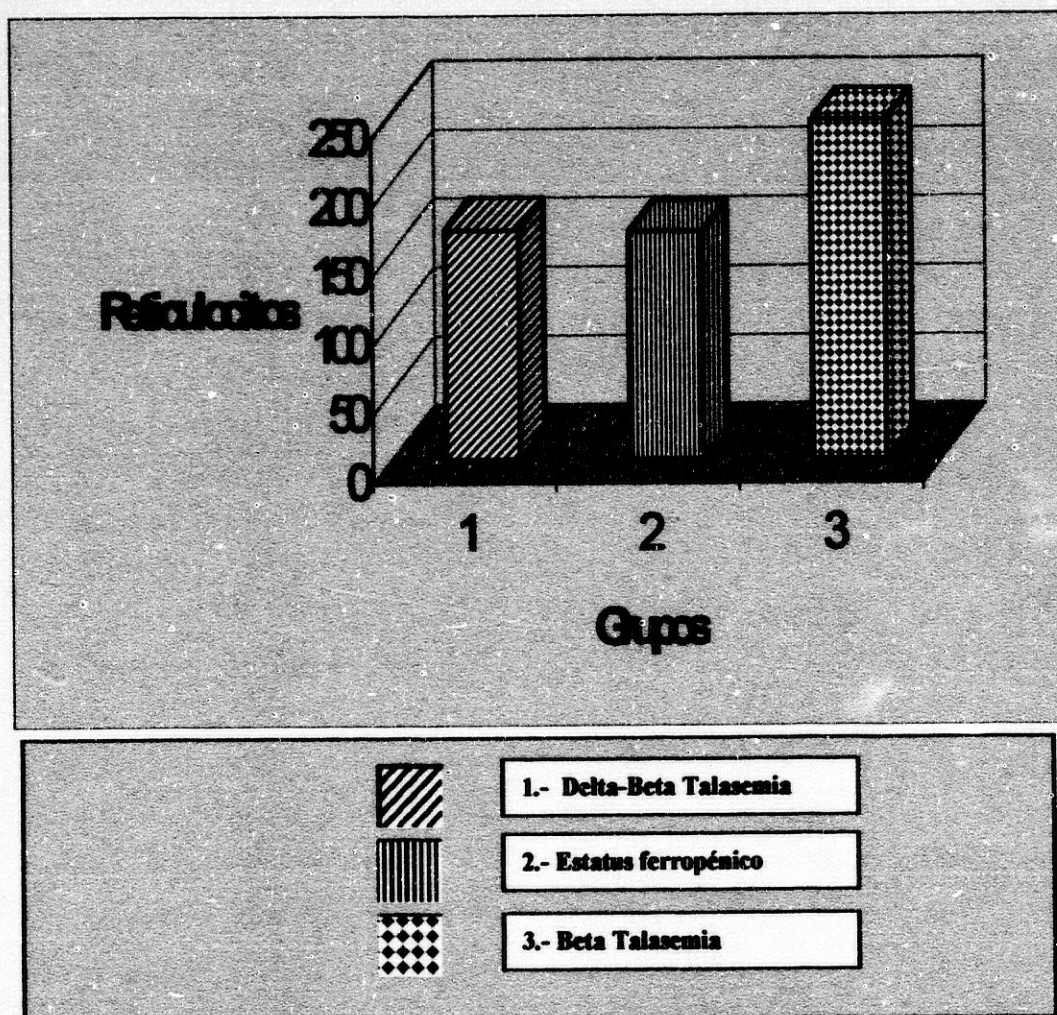


FIGURA 15

### 5.4.1. DISCRIMINACION DE LOS RASGOS TALASÉMICOS (BETA Y DELTA-BETA)

OBSER.	PREDICCIÓN		% CORRECT
	0	1	
0	123	42	74.55
1	15	186	92.54
			84.43

Variable	Coeficiente	S.E.	Significación	R	Exp(Coefic)
vcm	-,1247	,0287	,0000	-,1833	,8827
ADE2	-,6943	,0744	,0000	-,4111	,4994
Constante	19,8019	2,6143	,0000		

TABLA 16

5.4.2.- DISCRIMINACIÓN ENTRE RASGOS TALASÉMICOS (BETA Y DELTA-BETA) Y FERROPENIA.

OBSER.	PREDICCIÓN		% CORRECT
	0	1	
0	156	14	91.76
1	11	493	97.82
			96.29

Variable	Coeficiente	S.E.	Significación	R	Exp(Coefic)
Hb	,4.53	,1126	,0003	,1199	1,4998
Hematies	1,68 E-06	3,960E-07	,0000	,1446	1,0000
VCM	-,2815	,0571	,0000	-,1711	,7547
HCM	,1858	,0766	,0153	,0714	1,2041
Sideremia	,1085	,0133	,0000	,2920	1,1146
Cte.	-2,6876	3,5703	,4516		

TABLA 17

## DISCUSIÓN

## 6.1.- PARÁMETROS SOCIO-DEMOGRÁFICOS

Nuestro estudio ratifica la notable incidencia de talasemias heterocigotas en el área estudiada (0,17%), como por otra parte cabía esperar por su ubicación geográfica en la cuenca mediterránea.

Igualmente se constata una gran incidencia de delta-beta talasemias (0,06%), dato que ya constataron en el área de Valencia y Murcia los trabajos de GEHBTA en 1986, Vaya y cols en 1983 y Linares M, 1990.

La incidencia de estatus ferropénicos es de un 0,09%.

El perfil demográfico de los diferentes grupos de microcitosis en el área estudiada es:(Tabla 3,4; figura 3,4) es:

Perfil beta talasémico: Mujer de 30 años.

Perfil delta-beta talasemia: Mujer de 31 años.

Perfil ferropenia: Mujer de 47 años.

## 6.2.- PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS.

Es evidente que aun existiendo diferencias en los parámetros hematimétricos tanto entre pacientes con rasgos talasémicos (beta y delta-beta) y ferropenias como entre los dos grupos de síndromes talasémicos, se observa un solapamiento importante entre los valores de cada una de las variables consideradas individualmente. Es por ello por lo que la utilización aislada de un único parámetro no permitirá encuadrar con total seguridad a un paciente en un grupo concreto de microcitosis.

En la valoración de una prueba diagnóstica o de un sistema de detección, tan importante como la sensibilidad del método, lo es su especificidad. En este sentido interesa considerar la naturaleza de la prueba o método en estudio. La primera posibilidad es que esta ofrezca un diagnóstico con unas consecuencias directas sobre la conducta a seguir frente al paciente. En este caso, tan importante es la especificidad como la sensibilidad de la prueba, debiendo ser ambas parejas. La segunda posibilidad es que se trate de un método grosero de detección cuyo resultado será confirmado por otra prueba más determinante que deberá ser realizada posteriormente en función del resultado de la primera, en este caso la sensibilidad debe primar sobre la especificidad. En nuestro estudio, no podemos considerar el análisis discriminante basado en parámetros hematimétricos individuales como una prueba diagnóstica definitiva. Por tanto debemos buscar una serie de pruebas que garanticen ante todo, una alta sensibilidad con la especificidad más alta posible.

#### 6.2.1.-VALOR DISCRIMINANTE DE LOS PARÁMETROS HEMATIMÉTRICOS INDIVIDUALES.

##### 6.2.1.1.- RECUENTO DE HEMATÍES.

El análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ), encontró diferencias en el recuento eritrocitario entre los tres grupos de pacientes estudiados. Estas diferencias eran estadísticamente significativas en el recuento de hematíes entre los dos tipos de talasemias heterocigotas con el grupo de pacientes ferropénicos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre e los grupos beta-talasemia y delta-beta talasemia (tabla 5, figura 5).

##### 6.2.1.2.- HEMOGLOBINA

El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los dos grupos de talasemia heterocigota y el grupo de pacientes ferropénicos. No sucede lo mismo entre los dos grupos talasémicos que incluso en nuestro estudio llegan a presentar la misma media de Hb (tabla 6, figura 6).

### 6.2.1.3.- HEMATOCRITO

El test de Student muestra para esta variable las mismas características que la anterior, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de talasemia y el grupo de ferropenias, siendo igualmente la cifra media más baja la del grupo ferropénico (tabla 7, figura 7).

### 6.2.1.4.- VCM

Al contrario que reflejan otros trabajos, en nuestro estudio al aplicar el análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de microcitosis. Es decir existen diferencias significativas entre el grupo de ferropenias y los dos grupos de talasemias heterocigotas y entre los grupos de beta y delta-beta talasemia, siendo la media más baja el del grupo beta-talasémico y el más alto el del grupo ferropénico (tabla 8, figura 8).

### 6.2.1.5 HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM)

El Student- Newman-Keuls mostró diferencias significativas entre el grupo de las ferropénicas con los otros dos grupos de síndromes talasémicos. No se encontraron diferencias entre los dos grupos de talasemias, siendo la media superior encontrada, la del grupo ferropénico y la inferior la del grupo beta-talasémico (tabla 9 , figura 9).

### 6.2.1.6 CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (CHCM).

También esta variable, solo encontró diferencias significativas entre el grupo de pacientes ferropénicos y los grupos de síndromes talasémicos heterocigotos. La media superior fue del grupo delta-beta talasémico y la inferior del grupo ferropénico (tabla 10, figura 10).



### 6.2.1.7 AMPLITUD DE DISTRIBUCIÓN ERITROCITARIA (ADE).

La utilización del ADE para diferenciar entre talasemias heterocigotas y ferropenias ha mostrado en nuestro estudio una pobre reproductividad. Esto se debe fundamentalmente al importante porcentaje de sujetos con el diagnóstico de delta-beta talasemia, dentro de nuestro grupo de síndromes talasémicos, ya que como hemos comentado al principio, y podemos confirmar en nuestros resultados, la delta-beta talasemia heterocigota cursa con valores elevados de ADE muy próximos a los de la anemia ferropénica.

Nuestro análisis "post hoc" de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos delta-beta talasemia y ferropénico con las beta-talasemias pero no se observaron diferencias entre las beta delta y el grupo ferropénico. La media superior correspondió al grupo de las ferropenias y la inferior al grupo beta-talasémico (tabla 11, figura 11).

## 6.3.- PARÁMETROS ESPECIALES

### 6.3.1.- SIDEREMIA

El análisis estadístico, como cabía esperar, encuentra diferencias significativas entre los dos grupos de síndromes talasémicos y el grupo de pacientes ferropénicos. Asimismo la media del grupo ferropénico fue la más baja (tabla 12, figura 12).

### 6.3.2.- FERRITINA

Se observan diferencias en las medias de los tres grupos siendo significativas las diferencias de los grupos talasémicos heterocigotos con el grupo de ferropénicas. En esta variable tampoco se observan diferencias significativas entre los dos grupos talasémicos. Igualmente la media más baja fue la del grupo ferropénico siendo la más alta la del grupo beta-talasémico (tabla 13, figura 13).

### 6.3.3.- TRANSFERRINA

El análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls, encontró diferencias significativas entre el grupo ferropénico y los dos grupos talasémicos. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de talasemias. El valor de la media más alto fue el del grupo de ferropenias, siendo la media más baja la del grupo beta-delta talasemia (tabla 14, figura 14).

### 6.3.4.- RETICULOCITOS

También en esta variable las diferencias (análisis "post-hoc" de Student-Newman-Keuls) entre los dos grupos de talasemias y el grupo de ferropenias, fueron estadísticamente significativas. Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos talasémicos siendo la media más baja la del grupo ferropénico y la más alta la del grupo beta-talasémico (tabla 15, figura 15).

## 6.4.- PARÁMETROS COMBINADOS.

### 6.4.1.- PARÁMETROS DISCRIMINATIVOS ENTRE BETA Y DELTA-BETA TALASÉMIAS.

Existen pocos estudios que comparen los parámetros hematimétricos entre pacientes con ambos tipos de talasemias heterocigotas. Podemos destacar el trabajo de Vayá A y cols (1983), que estudia 200 pacientes con rasgo talasémico en edades comprendidas entre 3 y 70 años, 98 tipo beta y 102 delta-beta. Estos autores encuentran valores significativamente superiores en la delta-beta talasemia para la Hb, Hto., VCM y HCM. Por el contrario Gimferrer y Baiget (1979) y Linares M (1990), no encuentran diferencias significativas en ningún parámetro hematimétrico entre los dos grupos. En nuestro trabajo, se encuentran diferencias significativas aunque únicamente en los parámetros VCM y ADE en los que se observan valores significativamente superiores en la delta-beta talasemia.

El hecho de que entre los sujetos homocigotos de ambos tipos de talasemias existan diferencias evidentes en el curso clínico y grado de anemia podría hacer preveer que esta situación se extrapolaría a las formas

heterocigotas, ocasionando mayores diferencias entre los parámetros hematimétricos de ambos grupos. Sin embargo, dado que en condiciones normales el descenso de Hb es ligero en el rasgo talasémico, parece lógico que no podamos detectar diferencias significativas entre ambos tipos de talasemias en sujetos adultos. Por el contrario, este equilibrio podría variar si estudiáramos únicamente la población infantil, en la que al igual que en niños sanos, los afectos de rasgo talasémico presentan cifras de Hb inferiores a sus homónimos adultos. En vista de lo que puede estar justificado que ante unas circunstancias que condicionan una anemización algo mayor, se afecten en diferente grado ambos subtipos de talasemia, lo que explicaría las cifras superiores de Hb y HCM encontradas en niños con delta-beta talasemia heterocigota con respecto a los afectos del tipo beta. Podría sospecharse que, frente a otras circunstancias como embarazos o infecciones severas que condicionan una mayor anemización en estos pacientes, se observaría diferente afectación entre ambos tipos de talasemia, aunque carecemos de datos objetivos para poder afirmarlo.

Hay que resaltar las diferencias ya apuntadas por otros autores en los valores de ADE entre las beta y delta-beta talasemia heterocigota ( Miguel y cols 1988 y Linares M, 1990). Esta disparidad entre ambos tipos de talasemias, es difícil de explicar. Si las diferencias en los valores de ADE fueran únicamente expresión de un diferente grado de dishemopoyesis, sería de esperar que esta se reflejase también con diferencias en los valores de Hb o recuento eritrocitario entre ambos tipos de talasemia, hecho este que no se constata en el estudio. Por otro lado, la escasa o nula correlación entre ADE y grado de anemia en los pacientes adultos con microcitososis, también iría en contra de esta hipótesis.

La correlación entre ADE y recuento reticulocitario propuesta por otros autores no ha podido ser constatada en nuestro estudio.

Así mismo hay que destacar las diferencias significativas encontradas, como se ha visto anteriormente en las medias de los valores de VCM entre los tres grupos de microcitososis, incluyendo por tanto, diferenciación entre beta y delta-beta talasemia.

La combinación de parámetros hematimétricos y especiales de mayor poder discriminante en nuestro estudio, ha sido:

- ADE
- VCM

VARIABLES combinadas que alcanzan un porcentaje diagnóstico del 74,6% en las delta-beta talasemias, de un 92,5% de las beta-talasemias y con un 84% de porcentaje de diagnóstico conjunto del total de las talasemias. Siendo el análisis del Chi-cuadrado altamente significativo (0,0001).

Una vez obtenidos estos resultados que reflejan el poder discriminatorio del VCM y del ADE, hemos diseñado mediante regresión logística, una ecuación que nos permite calcular la probabilidad del diagnóstico de beta talasemia o delta-beta talasemia a partir de las pruebas hematimétricas habituales.

$$p^{B-Tal} = \frac{1}{1 + e^{-(19,8 - 0,125 VCM - 0,694 ADE)}}$$

0 = Delta-beta talasemia

#### 6.4.2.- DISCRIMINACIÓN ENTRE RASGOS TALASÉMICOS (BETA v DELTA BETA) Y FERROPENIAS.

La aplicación aislada de un análisis discriminante a cada uno de los parámetros hematimétricos y especiales evaluados, permite obtener una función discriminante entre estos dos grupos, estadísticamente significativa para el recuento de hematíes, la Hb, VCM, el HCM y la sideremia. No sucede así con el CHCM y el ADE. Entre los parámetros hematimétricos, el recuento de hematíes y la Hb, son los que presentan mayor capacidad discriminante. En cuanto a los parámetros especiales, es la sideremia el de mayor valor discriminativo entre ferropénias y síndromes talasémicos (quizás debido a que durante muchos de los años que incluye el estudio, no eran pruebas de habitual realización).

El análisis discriminante combinando los parámetros arriba mencionados, permitirá obtener una mejoría discriminante con respecto a su utilización individual. Se deberán utilizar en combinación, aquellos parámetros que de forma aislada hayan mostrado un mayor poder discriminante.

La combinación de los parámetros enumerados anteriormente, permite alcanzar unos porcentajes diagnósticos de 91,7% para los síndromes talasémicos y un 97,8 % para el estatus ferropénico dando un conjunto de un 96 % de discriminación. Ofreciendo un Chi-cuadrado altamente significativo (0,0303).

Utilizando todas las variables de mayor poder discriminatorio, hemos diseñado, mediante regresión logística una fórmula que nos permite calcular la probabilidad del diagnóstico a partir de pruebas hematimétricas habituales y especiales.

$$p^{TAL} = \frac{1}{1 + e^{(-2,89 + 1,08 H + 0,406 Hb + 0,109 Sider + 0,139 HCM - 0,272 VCM)}}$$

$$H = \frac{\text{Hematies}}{10^6}$$

(0 = sdr.ferropénicos)

Podemos afirmar que la utilización de todos estos parámetros que hemos analizado previamente, nos va a ofrecer una orientación diagnóstica suficientemente acertada. Sin embargo, no deberemos concluir un diagnóstico definitivo de rasgo talasémico únicamente en base a los resultados de estas variables discriminantes. La sospecha deberá confirmarse mediante el estudio de las hemoglobinas.

En definitiva, la utilidad de estos parámetros discriminantes será:

- Permitir dirigir el estudio de anemia, indicándonos que pacientes son subsidiarios de un estudio de hemoglobina.

- Facilitar la realización de un posible estudio epidemiológico sobre una muestra de población importante, ya que mediante un simple hemograma, determinación automatizada, sencilla y de coste razonable, obtenemos una aproximación bastante exacta de la incidencia de rasgo talasémico.

#### 6.5.- PROYECCIÓN ESTADÍSTICA DE LA INCIDENCIA DE MICROCITÓISIS.

Se ha realizado un análisis estadístico de series temporales con distribución estacional, contrastando la predicción para los años 1994 y 1995. En este análisis se demuestra una estacionalidad máxima en el diagnóstico durante el primer semestre del año (hecho que concuerda aproximadamente con la frecuencia estacional en la utilización de los servicios sanitarios), observándose una excelente reproductividad en los datos referidos a la beta-delta talasemia, siendo esta menor en las beta-talasemias y más baja en las ferropenias. La explicación de estos hallazgos probablemente se deba a que los diagnósticos en ciertos periodos de tiempo no han correspondido con la previsible incidencia real (problemas de registro, alteraciones en la transcripción, bajas laborales...) y que a medida que ha transcurrido el tiempo y los años estudiados se aproximan al actual se constata una mayor sensibilidad.

Así mismo en la proyección realizada para 1997, se observa las mismas características estacionales que se han encontrado en los últimos cinco años.

## CONCLUSIONES

1.- La incidencia de los síndromes talasémicos heterocigotos en el área 09 de la Comunidad Valenciana en del 0,16 %, constatándose al mismo tiempo la notable presencia de portadores de delta-beta talasemia (0,09 %).

2.- El perfil demográfico de las microcitosis en el área estudiada es :  
(tabla 2, figura 2)

	Incidencia área 09	Edad	Sexo
Beta-talasemia	0,1%	30	M
Delta-beta talas	0,06%	31	M
Ferropénia	0,09%	47	M

3.- El análisis de la reproductividad de los parámetros y métodos discriminantes, en nuestro estudio, ofrece los siguientes resultados:

- VCM y el AD, son los dos únicos parámetros discriminantes en los que se ha demostrado diferencias estadísticamente significativas en el diagnóstico comparativo de los dos grupos de talasemias heterocigotas (beta y delta-beta).

- El recuento de hematíes, la Hb, el VCM, el HCM y la sideremia son los parámetros que han demostrado mayor poder discriminante para diferenciar los síndromes talasémicos (beta y delta-beta) de los síndromes ferropénicos.

4.- El análisis de la combinación de parámetros discriminantes en nuestro estudio da como resultado:





1.0



2.8



2.5



3.2



2.2



3.6



4.0



2.0



1.1



4.5



1.8



1.25



1.4



1.6

MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART

NATIONAL BUREAU OF STANDARDS  
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a  
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

1.- La incidencia de los síndromes talasémicos heterocigotos en el área 09 de la Comunidad Valenciana en del 0,16 %, constatándose al mismo tiempo la notable presencia de portadores de delta-beta talasemia (0,09 %).

2.- El perfil demográfico de las microcitosis en el área estudiada es :  
(tabla 2, figura 2)

	Incidencia área 09	Edad	Sexo
Beta-talasemia	0,1%	30	M
Delta-beta talas	0,06%	31	M
Ferropénia	0,09%	47	M

3.- El análisis de la reproductividad de los parámetros y métodos discriminantes, en nuestro estudio, ofrece los siguientes resultados:

- VCM y el AD, son los dos únicos parámetros discriminantes en los que se ha demostrado diferencias estadísticamente significativas en el diagnóstico comparativo de los dos grupos de talasemias heterocigotas (beta y delta-beta).

- El recuento de hematíes, la Hb, el VCM, el HCM y la sideremia son los parámetros que han demostrado mayor poder discriminante para diferenciar los síndromes talasémicos (beta y delta-beta) de los síndromes ferropénicos.

4.- El análisis de la combinación de parámetros discriminantes en nuestro estudio da como resultado:

- La combinación del ADE y VCM alcanza unos porcentajes diagnósticos globales de un 84% en la discriminación entre los dos grupos de síndromes talasémicos (beta y delta-beta talasemia).

- La combinación de Hb, hematíes, VCM, HCM y sideremia alcanza unos porcentajes discriminatorios, de un 96% en el diagnóstico global entre síndromes talasémicos y síndromes ferropénicos.

5.- Se diseña mediante regresión logística las siguientes ecuaciones que nos permiten calcular la probabilidad del diagnóstico a partir de pruebas hematimétricas habituales y especiales:

. Ecuación discriminante entre beta y delta-beta talasemia

(0 = delta-beta talasemia)

. Ecuación discriminante entre síndromes talasémicos y síndromes ferropénicos

(0 = sdr.ferropénicos)

6.- Se realiza un análisis de series temporales con distribución estacional que muestra en el estudio comparativo de los años 1994 y 1995 una excelente reproductividad en las beta-delta talasemias, menor en las beta y más baja en las ferropénias, constatándose una estacionalidad máxima en el primer semestre de cada año y preveyendo una tendencia similar para el año 1997.

**BIBLIOGRAFÍA.**

Adams JG III, Coleman MB. Structural hemoglobin variants that produce the phenotype of Thalassemia. *Semin Hematol* 1990; 27:229.

Adams, JG III, Boxer LA., Baehner RL, y cols. Hemoglobin Indianapolis ((B 112) (g14)arginine):an unstable  $\alpha$ chain variant producing the phenotype of severe  $\beta$ Thalassemia. *J.Clin Invest* 1979; 63:931.

Adisson Gm, Beamish Mr, Haes Cn. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects in patients with iron deficiency and iron overload. *J.Clin Pathol* 1972; 25: 326-331.

Afifi Am. High transfusion regimen in the management of reproduction wastage and maternal complications of pregnancy in thalassemia major. *Acta Haemat* 1974; 52: 331.

Aghai E, Shabbad E, Quitt M, Fromm P. Discrimination between iron deficiency and heterozygous beta-thalassemia in children. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 710-712.

Aksoy M, Bermek E, Almis G, y cols.  $\beta$ - thalassemia intermedia homozygous for normal hemoglobin A2.  $\beta$ - thalassemia. Study in four families. *Acta Haematol* 1982; 67:57.

Al-Rrefaie FN, Veys PA, Wilkes S, y cols. Agranulocytosis in a patient with thalassemia major during treatment with the oral iron chelator, 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. *Acta Haematol* 1993; 89-86.

Amselem S, Nunes V, Vidaud M, y cols. Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by the use of dot-blot analysis of amplified  $\beta$ -globin DNA. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 95-100.

Anastasi S, Caruso V, Magnano C, Leocata A. Complicanze endocrine nella thalassemia mayor. *Pediatr. Med Chir (Italy)* 1991 Jan-Feb; 13(1): 63-5.

Anselme S, Nunes V, Vidaud M. Y cols. Determination of spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *Amer J Human Genet* 1988; 43: 95-100.

Antonatikis SE, Kazazian HH Jr, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* 1985; 69:1.

Arcasoy A, Caudar AO. Changes of trace minerals (serum iron, zinc, copper and magnesium) in thalassemia. *Acta Haematol* 1975; 56: 341.

Arcasoy A., Cavdar A, Cin S, y cols. Effects of zinc supplementation on linear growth in beta-thalassemia (a new approach). *Am J Hematol* 1987; 24: 1127.

Arribalzaga K, Ricard MP, Carrero DL, Sanchez J, Gonzalez A, Ropero P, Villegas A. Hb J Baltimore (beta 16(A13) Gy-->Asp) associated with beta(+) thalassemia in a Spanish family. *Hemoglobin*. 1996 Feb; 20(1): 79-84.

Arruda VR, Lima CS, Saad St, Costa FF. Successful use of hydroxyurea in beta-thalassemia major (letter). *N Engl J Med* 1997 Mar 27; 336(13):964.

Asbell, M.B. Orthodontic aspects of Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119: 662.

Avanzi G, Bacigalupo A, Strada P, y cols. Frozen red blood cell transfusion in patients with Cooley's disease. *Haematologica* 1983; 68:646.

Baigelt M. Hemoglobinopatias estructurales en España. *Sangre* 1985; 30: 899-904.

Baigelt M, Del Rio E, Domenech M, Casals T, Bozzo M, Gimferrer E. Escrutinio de hemoglobinopatias en sangre de cordón umbilical. *Biol Clin Hematol* 1981; 3: 251-256.

Baiget M, Gimferrer E, Fernandez I, y cols. Spanish delta-beta thalassaemia. Hematological studies and composition of the gamma chains in the homozygous patients. *Acta Haematol* 1983; 70: 341-344.

Barral Y, Rossity A., Cappelozza G, y cols. Beta-thalassemia in the Po delta: selection geography and population structure. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 121.

- Barry M, Flynn Dm, Letsky EA, Rison RA. Long-term chelation therapy in thalassemia major: effect on iron concentration liver histology, and clinical progress. *Br Med J* 1974; 1:16.
- Bartlett AN, Hafbrand AV, Kontoghiorghes GJ. Long-term trial with the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one, II. Clinical observations. *Br J Haematol* 1990; 76:301.
- Bastian HM. Hematologic disorders including sickle-cell syndromes, hemophilia and beta-thalassemia. *Acta haematol* 1980; 63: 37.
- Baty JM, Blackfan KD, Diamond LK. Blood studies in infants and in children. I. Erythroblastic anemia: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child* 1932; 443:665.
- Beaudry MA, Ferguson DJ, Pearse K, y cols. Survival of a hydropic infant with homozygous  $\alpha$ -thalassemia-1. *J Pediatr* 1986; 108:713.
- Bebulla P. Blod transfusion in beta thalassaemia major. *Transfus-Med* 1995 Dec; 5(4): 247-58.
- Belloy M. Thalassemies et drepanocytoses. *Soins (France)* 1992 Aug-Sep; (563-564): 47-49.
- Benz EJ Jr. The hemoglobinopathies. In Kelly W.N.; De Vita, V.T.;(eds): *Textbook of Internal Medicine* J.B. Lippincott, Philadelphia, 1988.
- Benz EJ Jr. The thalassemia syndromes lessons from molecular medicines index case. *Trans-An-Climatol-Assoc, Discussion* 35-36. 1995;107: 20-36.
- Berman BW, Ritchey AK, Jeckel JF, y cols. Hematology of beta thalassemia trait: age related developmental aspects and intrafamilial correlations. *J Pediatr* 1980; 97: 901.
- Bessman JD, Feinstein DI. Quantitative anisocytosis as a discriminant between iron deficiency and thalassemia minor. *Blood* 1979; 53: 288-293.
- Bessman JD. Automated blood counts and defferencials. A practical guide. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1986.
- Bessman JD; Johnson RK Erythrocyte volume distribution in normal and abnormal subjects. *Blood* 1975; 46: 369-379.



Beuzard Y. Thalassemie. Physiopathology. Rev Prat (France) 1991 May; 41(13): 1215-20.

Bianchi DW, Beyer EC, Stark AR, y cols. Normal long-term survival will  $\alpha$ - thalassemia. J Pediatr 1986; 1108:716.

Blau AC, Constantoulakis P, Shaw CM, Stamatoyannopoulos G. Fetal hemoglobin induction with butyric acid: efficacy and toxicity. Blood 1993; 81:529.

Bogna Pignatti C, Cohen A. Evaluation of a new method of administratio of the iron chelating agent deferoxamine. J Pediatr. 1997 Jan; 130(1): 86-8.

Bollekens JA, Forgeet BG. D $\beta$ - thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. Hematol Oncol Clin North AM 1991; 5:39.

Borgna-Pignatti C, Zonta L, Bomgo Y, y cols. Red bood cell indices in adults and children with heterozygous beta-thalassemia. Haematologica 1983; 68:149.

Borgna-Pignatti C, De Stefano P, Zonta L, y cols. Growth and sexual maturation in thalassemia major. J Pediatr 1985; 106:150-155.

Borgna-Pignatti C, Marradi P, Rugolotto S, Mardolongo A. Successful pregnancy after bone marrow transplantation for thalassaemia. Bone Marrow Transplat. 1996 Jul; 18(1): 235-6.

Borgna-Pignatti C. Bone marrow transplantation for the hemoglobinopathies. p.1551. In Greleaven J. Barrett J. Ceds: Bone Marrow Transplantation in Practice. Churchill Livingstone, Edimburgh 1992.

Borow KM, Propper R, Bierman FZ, y cols. The left ventricular end-systolic pressure dimension relation in patients with thalassemia major. Circulation 1982; 66:980.

Bourantas K, Economou G, Georgiou J. Administration of high doses of recombinant human erythropoietin to patients with beta-thalassemia intermedia: a preliminary trial. Eur J Haematol 1997 Jan; 58(1): 22-5.

Bowden DK, Hill AVS, Higgs DR, y cols. Different hematologic phenotypes are associated with the leftward ( $\alpha$  4.2) and rightward ( $\alpha$  3.7),  $\alpha$ - thalassaemia deletions. *J Clin Invest* 1987; 79:39.

Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of  $\alpha$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 1992; 18:104.

Bracey AW, Klein HG, Chambers S, y cols. Ex vivo selective isolation of your red blood cells using the IBM-2991 cell washer. *Blood* 1983; 61:1068.

Brittecham GM. Development of iron-chelating agents for clinical use. *Blood* 1992; 80: 369.

Brittenham GM, Koepke JA. Red blood cell volume distributions and the diagnosis of anemia. Help or hindrance. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 1146-1148.

Brochstein JA, Kirkpatrick D, Glardina PJ, y cols. Bone marrow transplantation in two multiply transfused patients with thalassaemia major. *Br J Haematol* 1986; 63: 445.

Bunn H.F, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Ed WB Sanders, Philadelphia 1986.

Bunn HF. Reversing ontogeny. *N Engl J Med* 1993; 3228:129.

Caffey J. Cooley's anemia: a review of the roentgenographic findings in the skeleton. *AJR*. 1957; 78:381,

Caffey J. Cooley's erythroblastic anemia: some skeletal findings in adolescents and young adults. *AJR* 1951; 65:547.

Calero F, Villegas A, Del Toro E, Maluenda MP, Espinos D. Incidencia de alfa-talasemia en sangre de cordón umbilical en recién nacidos. *Sangre* 1982; 27: 432 (resumen).

Camaschella C, Bertero MJ, Serra A, y cols. A benign form of thalassaemia may be determined by the interaction of triplicated  $\alpha$  locus and heterozygous  $\beta$ - thalassaemia. *Br J Haematol* 1987; 66:103.

Camaschella C, Cappellini MD. Thalassaemia intermedia. *Haematologica* 1995 Jan-Feb; 80(1): 58-68.

Camaschella C, Gonella S, Calabrese R, Vischia F, Roetto A, Graziadei G, Mazza U, Cappellini MD. Serum erythropoietin and circulating transferrin receptor in thalassaemia intermedia patients with heterogeneous genotypes. *Haematologica* 1996 Sep-Oct; 81(5): 397-403.

Cao A, Goossens M, Pirastu M. Beta-thalassaemia mutations in the Mediterranean populations. *Br J Haematol* 1989; 71: 309-312.

Cao A, Rosatelli MC, Leoni GB, y cols. Antenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia in Sardinia. *Ann NY Acad. Sci* 1990; 6112:215.

Cao-A, Galanello R, Rosatelli Mc. Genotype-phenotype correlations in beta-thalassaemias. *Blood-Rev* 1994 Mar; 8(1): 1-12.

Cao-A, Rosatelli Mg, Galanello R. Control of beta thalassaemia by carrier screening, genetic counselling and prenatal diagnosis: the sardinian experience. *Ciba-Found-Symp* 197: 137-51; Discussion 151-5, 1996.

Carnelli V, Teraoli S, Fossati G, Careddon G, Perr M, Pedrotti L, Mirra N. Nuove prospettive terapeutiche per la thalassaemia: i chelanti orali. *Pediatr Med Chir (Italy)* 1992 May-Jun; 14(3): 273-5.

Cazzola M, Ascari E. Red cell ferritin as a diagnostic tool. *Br J Haematol* 1986; 62:209-313.

Cazzola M, Borgna Pignatti C, Locatelli F, Ponchio L, Beguin Y, De Stefano P. A moderate transfusion regimen may reduce iron loading in beta-thalassaemia major without producing excessive expansion of erythropoiesis. *Transfusion* 1997 Feb; 37(2): 135-40.

Cividalli G, Sandeler SG, Yatziv S, y cols.  $\beta^0$ -thalassaemia complicated by autoimmune hemolytic anemia.

Cohen A, Witzleben C, Schwartz E. Treatment of iron overload. *Semin Liver Dis* 1984; 4:228.

Cohen A, Martin M, Scchwartz E. Depletion of excessive liver iron stores with desferioxamine. *Br J Haematol* 1984; 58:369.

Cohen A, Cohen IJ, Schwartz E. Scurvy and altered iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med* 1981; 304:158.

Cohen A, Gayer R, Mizanin J. Long term effect of splenectomy on transfusion requirements in thalassemia major. *Am J Hematol* 1989; 30: 254-256.

Cohen A, Markenson A, Schwartz E. Transfusion requirements and splenectomy in thalassemia major. *J Pediatr* 1980; 97:100.

Cohen A, Martin M, Mizanin J, et cols. Vision and hearing during deferoxamine therapy. *J Pediatr* 1990; 117:326.

Cohen A, Mizanin J, Schwartz E. Rapid removal of excessive iron using daily high-dose chelation therapy through in-dwelling central venous catheters. *J Pediatr* 1989; 115:151.

Cohen A, Mizanin J, Schwartz E. Treatment of iron overload in Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1985; 445:274.

Cohen AR, Schmidt JM, Martin MB, et cols. Clinical trial of young red cell transfusions. *J Pediatr Res* 1984; 104:865.

Coleman MB, Steinberg MH, Adams JG III. Hemoglobin Terre Haute arginine B106: a posthumous correction to the original structure of hemoglobin Indianapolis. *J Biol Chem* 1991; 266:55-98.

Colosimo A, Novelli G, Cavicchini A, Dallapiccola B. Detection of eight beta-thalassemia mutations using a DNA enzyme immunoassay. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26(2): 136-9.

Constantopoulos, A.; Matsaniotis, N. Hypertension, convulsion and cerebral hemorrhage in thalassemic patients after multiple blood transfusion cells. *Paediatr Acta* 1980; 35:269.

Cook JD. Clinical evaluation of iron deficiency. *Semin Hematol* 1982; 19: 6-18.

Cook JD, Lipschitz DA, Miles LE, Finch CA. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 1974; 27: 681-687.

Cooley TB, Lee P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatr Soc* 1925; 37:29.

Cooper DM, Hyman CB, Weiler-Ravell S, y cols. Gas exchange during exercise in children with thalassemia major and Diamond-Blakfan anemia. *Pediatr Res* 1985; 19:1215.

Cooper DM, Mansell AL, Weiner MA, y cols. Low lung capacity and hypoxemia in children with thalassemia major. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:639.

Corral E, Perez N, Gutierrez C, Marzouka E. Hidrops fetal no inmune asociado a talasemia familiar: Transfusión intravascular. *Rev Chil Obstet Ginecol (Chile)* 1994; 59(3): 224-30.

Cossu G, Manca M, Pirastu MG, y cols. Neonatal screening of beta-thalassemia by thin layer isoelectric focusing. *Am J Hematol* 1982; 13:149.

Cossu P, Toccafondi D, Vardau F, y cols. Iron overload and desferioxamine chelation therapy in beta-thalassemia intermedia. *Eur J Pediatr* 1981; 137:267.

Costa FF, Tavella MH, Zago MA. Deletion type  $\alpha$ -thalassemia among Brazilian patients with sickle cell anemia. *Rev Brasil Genet* 1989; 1:605-611.

Coutinho Gomes MP, Costa MG, Braga LB y cols. Beta-Thalassemia Mutations In The Portuguese population. *Hum Genet* 1988; 78: 13-15.

Craver RD, Abermanis JG, Warriar RP, Ode DL, Hempe JM. Hemoglobin A2 levels in healthy persons, sickle cell disease, sickle cell trait, and beta-thalassemia by capillary isoelectric focusing. *Am J Clin Pathol* 1997 Jan; 107(1): 88-91.

Currarino G, Erlandson ME. Premature fusion of epiphyses in Cooley's anemia. *Radiology* 1964; 83:656.

Cutello S, Melon T. Serum concentration of haptoglobin and hemopexin in favism and thalassemia. *Acta Haematol* 1974; 52:65.

Charache S, Dover GJ, Moore RD, y cols. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F-production in patients with sickle cell anemia. *Bood* 1992; 79:2553.

Cherchi GH, Cossellu S, Pacifico L, Gallisai D, Ranucci A, Zanette S, y cols. Incidence and outcome of *Yersinia enterocolitica* infection in thalassemic patients. *Contrib-Microbiol-Immunol.* 1995; 13: 16-8.

Dacie J. The haemolytic anaemias. Part 2: The hereditary haemolytic anaemias. 3rd. Edn. Churchill Livingstone, 1988.

De Alarcon D, Donovan ME, Forbes GB, y cols. Iron absorption in the thalassemia syndromes and its inhibition by tea. *N Engl J Med* 1979; 300:5.

De Furia FG, Miller DR, Canale VC. Red blood cell metabolism and function in transfused  $\beta$ -thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1974; 232:3323.

De Las Nieves MA. Lesiones moleculares beta-talasémias en la provincia de Granada. Tesis Doctoral 1990; Universidad de Granada.

De Las Nieves MA; De Pablos, JM; Garrido, F. Alpha thalassaemia in a southern spanish population. *Br J Haematol* 1989; 73: 282-283.

De Maeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anemia in the world. *World Health Statistics Quarterly* 1985; 38: 2003-316.

De Mattia D, Pettini PL, Sabato V, Rubini G, Laforgia A, Schettini F. Oromaxillofacial changes in thalassemia major. *Minerva Peiatr* 1996 Jan-Feb; 48(1-2): 11-20.

De Pablos JM. Hemoglobinopatías estructurales en España. *Biol Clin Hematol* 1988; 10: 5-15.

Decchi GC, Scotti PG, Cambiagli G, y cols. Respiratory function tests in adolescents with  $\beta$ -thalassemia major. *Haematologica* 1982; 67:23.

Delfini C, Polchi P, Izzi T, y cols. Bone marrow donors other than HLA genotypically identical siblings for patients with thalassemia. *Exp Hematol* 1985; 113:1197.

DeLuca F, Melluso R, Sobrio G, y cols. Thyroid function in thalassemia major. *Arch Dis Child* 1980; 55-389.

Devirgillis S, Carnacchia G, Sanna G, y cols. Chronic liver disease in transfusion-dependent thalassemia: liver iron content and distribution. *Acta Haematol* 1981; 65:32.

Devirgillis S, Florelli G, Fargion S, y cols. Chronic liver disease in transfusion-dependent thalassemia Hepatitis B virus marker studies. *J Clin Pathol* 1980; 33:949.

Dewey KW, Grossman H, Canale VC. Cholelithiasis in thalassemia major. *Radiology* 1970; 96:385.

Dore F, Pardini S, Bonfigli S, Orggiano L, Murineddu M, Pistidda P, y cols. Diagnosi differenziale delle sindromi talassemiche. *Ann Ital Med Int(Italy)* 1992 Jan-Mar; 7(1): 34-31.

Dover GJ, Brusilow S, Samid D. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. *N Engl J Med* 1992; 27:569.

Dover GJ, Smith KD, Chang YE, y cols. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp 22.2. *Blood* 1992; 80:816.

Dozy AM, Kan YW, Embury SH.  $\alpha$ -Globin gene organization in blacks precludes the severe form of  $\alpha$ thalassaemia. *Nature* 1979; 280:605.

Dozy AM, Kan YW, Forman EN, y cols. Antenatal diagnosis of homozygous  $\alpha$ -thalassemia. *JAMA* 1979; 241:1610.

Editorial. Spinal cord compression in thalassemia. *Lancet*. 1982; 1:664.

Eldor A, Marclouf J, Lellouche F, Ben-Yashar V, Barenholz Y, Durst R, y cols. A chronic hypercoagulable state and life-long platelet activation in beta-thalassemia major. *Sotheast-Asian-J-Trop-Med-Public-Health*; 1993; 24 suppl 1: 92-5.

Elena MG, Fedele A, Gianino P, Giordanino S, Murro P, Tosi C, Vannelli S. Velocita di crescita dei bambini talassemici sottoposti a diversi protocolli di terapia chelante. *Minerva Pediatr (Italy)* 1992 En-Feb; 44(1-2): 41-2.

Ellis JT, Schulman Y, Smith Cch. Generalized siderosis with fibrosis of liver and pancreas in Cooley's (Mediterranean) anemia. *Am J Pathol* 1954; 30:287.

England JM, Bain BJ, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973; I: 1514.

England JM, Down MC. Red-cell-volume distribution curves and the measurement of anisocytosis. *Lancet* 1974; I: 701-703.

England JM, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait by routine blood-count. *Lancet* 1973; I: 449-452.

Engle MA. Cardiac involvement in Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119:694.

Erlandson ME, Walden B, Stern G, y cols. Studies on congenital haemolytic syndromes IV. Gastrointestinal absorption of iron. *Blood* 1962; 19:359.

Escudero LF. Reconocimiento de patrones. Ed Paraninfo Madrid 1977.

Fairbanks VF, Oliveros R, Brandabur JH, y cols. Homozygous hemoglobin E mimics  $\beta$ -thalassemia minor without anemia or hemolysis hematologic functional, and biosynthetic studies of first North American cases. *Am J Hematol* 1980; 8:109.

Fairbanks VF. Hemoglobinopathies and thalasseмии. De: Theime-Stratton Nueva York INC. 1980.

Fargion S, Taddes MT, Gabulti V, y cols. Early iron overload in beta-thalassaemia major when to start chelation therapy. *Aech Dis Child* 1982; 57:929.

Fei Y, Kitlar F, Harris HF, y cols. A search anomalies in the alpha, betha and gamma globin gene arrangements in normal black, Italian, Turkish and Spanish newborns. *Hemoglobin* 1989; 13: 45-65.

Fessas P. Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassaemia. *Blood* 1963; 21:21.



Fink H. Transfusion hemochromatosis in Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1984; 119:680.

Flynn MM Reppun TS Bhagavan NV. Limitations of red blood cell distribution width (RDW) in evaluation of microcytosis. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 445-449.

Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I. Detection of alpha globin disorders by simple PCR methodology (see comments). *Haematologica* 1996 Sep-Oct; 81(5): 387-96.

Forget BG, Pearson HA. Hemoglobin synthesis and the thalassemias. In Handin, R.E.; Lux, S.E.; Stossel, T. (eds): *Blood: Principles and Practice of Hematology*. J.B., Lippincott, Philadelphia, 1994 (in press).

Forget BG. Gene therapy. In Embury SE, Hebbel RP, Narta M, Steinberg MH, (eds): *The sickle hemoglobinopathies Science and Medicine*. Raven, New York, 1994 (In press).

Fosburg MT, Nathan DG. Treatment of Cooley's anemia. *Blood* 1990; 76: 435-444.

Fossat C, David M, Harle JR, Sainty D, Horschowski N, Verdout JJ, Mongin M. New parameters in erythrocyte counting. Value of histograms. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 11: 1150-1154.

Friedman S, Hamilton RW, Schwartz E.  $\beta$ -thalassemia in the American Negro *J Clin Invest* 1973; 52:1453.

Gabutti V, Piga A, Nicola P, y cols. Haemoglobina levels and blood requirement in thalassemia. *Arch Dis Child* 1982; 57:156.

Gertner JM, Broadus AE, Anast CS, y cols. Impaired parathyroid response induced hypocalcemia in thalassemia major. *J Pediatr* 1979; 95:210.

Giardina PJ, Hilgartner MW. Update on thalassemia. *Pediatr Rev* 1992; 13:55.

Gilman JG, Huisman THJ. DNA sequence variation associated with elevated G- $\gamma$ -globin production. *Blood* 1985; 66:783.

Gimferrer E, Baiget M. Datos hematológicos de 393 casos de talasemia heterocigota beta y delta-beta en el Hospital de la Santa Creu y Sant Pau de Barcelona. *Biol & Clin Hematol* 1979; 1: 251-262.

Gimferrer E, Marigo G, Rutllant ML, Viñas J. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1975; I: 114.

Giroto R. Aspects actuels des maladies génétiques de l'hémoglobine. *Nouv Rev Fr Hematol (Germany)* 1991; 33(2): 189-94.

Giroto R. Thalassémie. Physiopathologie et diagnostic. *Rev Prat (France)* 1994 Feb 15; 44(4): 522-8.

Giuzio E, Bria M, Bisconte MG, Caracciolo M, Quattieri A, Misasi M, y cols. Osteoporosis in patients affected with thalassaemia. Our experience. *Chir Organi Mov (Italy)* 1991 Oct-Dec; 76 (4) :369-74.

Glader BE, Look KA. Hematologic disorders in children from southeast Asia. *Pediatr-Clin-North-Am* 1996 Jun; 43(3):665-81.

Gomber S, Kela K, Abdul Rahiman CL. Hypertriglyceridaemia-thalassaemia syndrome. *Ann Trop Paediatr* 1996 Dec; 16(4): 359-60.

Gomez Rodriguez NK, Sanchez Burson JM, Atanes Sandoval A, Grana Gil J, De Tord Santos J, Galdo Ferababdez F. Osteoporosis como primera manifestación de la Beta-talasemia menor. *An Med Interna (Spain)* 1992 Jun; 9(6): 287-90.

Gonzalez-Redondo JM, Diaz-Chico JC, Malcorra-Aspiazu JJ, Balda-Aguirre MJ, Huisman THJ. Characterization of a newly discovered  $\alpha$ -thalassaemia-1 in two patients with Hb.H disease. *Br J Haemat* 1988; 70:459-463.

Gordts B, Rummens E, Demeirleir L, y cols. Yersinia pseudotuberculosis septicaemia in thalassaemia major. *Lancet* 1984; 1:41.

Grossman H, Dischl MR, Wincherter PH, Canali V. Renal enlargement in thalassaemia major. *Radiology* 1971; 100: 645.

Grupo de Estudio de Hemoglobinopatías y talasemias (GEHBTA). Análisis de un programa de microcitosis familiares atípicas. Base molecular de  $\alpha$ -talasemias. *Sangre* 1990; 435: 102-113.

- Grupo de Estudio de Hemoglobinopatias Talasemias (GEHBTA). Los sindromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. *Sangre (Barc)* 1986; 31: 609-613.
- Hamedani P, Hashmi Kz, Manji M. Iron depletion and anemia: prevalence, consequences, diagnostic and therapeutic implications in a developing Pakistani population. *Curr Med Res Opin* 1987; 10: 480-485.
- Hedge UM, Klumda S, Marsh GW, y cols. Thalassemia iron and pregnancy. *Br Med J* 1975; 13:509.
- Hermosa V, Mazo E, Carril J, Cordovilla JJ, Luceño A, Zaubuzarreta A. Estudio prospectivo sobre la prevalencia de ferropenia en la población adulta de Cantabria. *Med Clin (Barc)* 1986; 87: 135-140.
- Higgs DR.  $\alpha$ -Thalassemia. *Balliere's Clin Hemat* 1993; 6:117.
- Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha globin gene cluster. *Blood* 1989; 73: 1081-1084.
- Higgs DR. The molecular genetics of the  $\alpha$ -globin gene family. *Eur J Clin Invest* 1990; 2:340-347.
- High KA, Benz EJ Jr. The ABCs of molecular genetic a haematologist's introduction p. 25. In Hoffbrand AV. (de): *Recent Advances in haematology*. Churchill Livingstone- New York, 1.985.
- Hilgarther MW, Smith CH. Coagulation studies as a measure of liver function in Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119:631.
- Ho PJ, Wickramasinghe SN, Rees DC, Lee MJ, Eden A, Thein SL. Erythroblastic inclusions in dominant beta thalassemias. *Blood* 1997 Jan 1; 89(1): 322-8.
- Hoyt RW, Scarpa N, Wilmott RW, y cols. Pulmonary function abnormalities in homozygous  $\beta$ -thalassemia. *J Pediatr* 1986; 109:452.
- Huang S-Z, Wong C, Antonarakis SE, y cols. The same TATA box- $\beta$ -thalassemia mutation in chinese and US. blacks: another example of independent origins of mutations. *Hum Genet* 1986; 74:152.

- Huisman THJ. The  $\beta$ -and- $\delta$ -thalassemia repository. *Hemoglobin* 1993; 17:479.
- Humphries RK, Ley T, Turner P, y cols. Differences in human  $\alpha\beta$  y  $\delta$  globin gene expression in monkey kidney cells. *Cell*. 1982; 30:173.
- Hyman CB, Landing B, Alfin-Stater R, y cols.  $\delta$ - $\alpha$ -Tocopherol, iron and lipofuscin in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1974; 232: 211.
- Ibarra B, Perea FJ, Hernandez-Córdova A. Aspectos Moleculares de las talasemias Alpha y Beta. *Arch Inest Med (Mexico)* 1990 Oct-Dec; 21(4): 357-61.
- Isseragrisil HC, Piankigagum A., Wasi P. Spinal cord compression in thalassemia: report of 12 cases and recommendations for treatment. *Arch Intern Med* 1981; 141:1033.
- Jacobs A. Serum ferritin and iron stores. *Fed Proc* 1977; 36: 2024-2027.
- Jandl JH, Greenberg MS. Bone marrow failure due to relative nutritional deficiency in Cooley's hemolytic anemia. *N Engl J Med* 1959; 266:461.
- Johnson CS, Tegos C, Bemtler E. Thalassemia minor: routine erythrocyte measurements and differentiation from iron deficiency. *An J Clin Pathol* 1983; 80: 31-36.
- Johnston FE, Krogman WM. Patterns of growth in children with thalassemia major. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119:667.
- Jurkiewicz MJ, Pearson HA, Furlow LY. Reconstruction of the maxilla in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1969; 165: 437.
- Kan JW, Todd D, Dozy AM. Haemoglobin Constant Spring synthesis in red cell precursors. *Br J Haematol* 1974; 28:103.
- Kanavakis E, Wainscoat JS, Wood WG y cols. The interaction of  $\alpha$ -thalassemia with heterozygous  $\beta$ - thalassemia. *Br J Haematol* 1982; 52:465.
- Karnard A, Poskitt TA. The automated complete blood cell count. Use of the red blood cell volume distribution width and mean platelet volumen in

evaluating anemia and thrombocytopenia. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1270-1272.

Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P, Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol* 1996 Oct; 53(2): 81-91.

Kattamis C, Touliatis N, Chaidis S, Matsoniotis N. Growth of children with thalassemia and effect of different transfusion regimens. *Arch Dis Child* 1970; 6:502.

Kaufman RE. Hydroxyurea: specific therapy for sickle cell anemia. *Blood* 1992; 79:2503.

Kavakli K, Nisli G, Cetingul N, Oztop S, Bilgic A, Ozacar T. Hepatitis B vaccination in children with thalassemia, hemophilia and cancer (letter). *Pediatr Infect Dis J* 1996 Dec; 15(12): 1140-1.

Kazazian HH Jr, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia. *Blood* 1988; 72: 1107-1116.

Kazazian HH Jr, Dowling CE, Hurwitz RL y cols. Dominant thalassemia-like phenotypes associated with mutations in exon 3 of the  $\beta$ globin gene. *Blood* 1992; 79:3014.

Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990; 27:2209-228.

Kazazian HH. The thalassemia syndromes. Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990; 27: 209-228.

Kederle H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119:758.

Keens TG, O'Neal MH, Ortega JA y cols. Pulmonary function abnormalities in thalassemia patients on a hypertransfusion program. *Pediatrics* 1980; 65:1013.

Keevil BG, Maylor PW, Rowlands D. A rapid anion exchange high-performance liquid chromatography method for the measurement of Hb A2 in whole blood. *Ann Clin Biochem* 1996 May; 33(Pt 3): 253-6.

Kim YR, Ornstein L. Isovolumetric sphering of erythrocytes for more accurate and precise cell volume measurement by flow cytometry. *Cytometry* 1983; 3: 419-427.

Koler RD, Rigas DA. Genetics of haemoglobin H. *Ann Hum Genet* 1961; 25:95.

Kontoghiorghes GJ, Sheppard I. Simple synthesis of the potent iron chelators 1-alkyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-ones. *Inorg. Chim. Acta* 1987; 136:111.

Kreimer-Birnbaum M, Pinkerton PH, Bannerman RN. Urinary dipyrroles: their occurrence and significance in thalassemia and other disorders. *Blood* 1966; 28:933.

Kulozik AE, Thein SL, Wainscoat JS y cols. Thalassaemia intermedia: Interaction of the triple  $\alpha$ globin gene arrangement and heterozygous  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 1987; 66:109.

Laor E, Garfunkel A, Koyoumdjisky-Kaye E. Skeletal and dental retardation in  $\beta$ -thalassemia major. *Hum Biol* 1982; 54:85.

Laso FJ, Mateos F, Ramos R, Herrero F, Perez Avellano JL, Gonzalez-Buitrago JM. Amplitud de distribución del tamaño eritrocitario en el diagnóstico diferencial de una anemia microcítica. *Med-Clin (Barc)* 1990; 94: 1-4.

Lawson JP, Ablow RC, Pearson HA. Premature fusion of the primal humeral epiphyses in thalassemia. *AJR*. 1983; 140:239.

Lawson JP, Ablow RC, Pearson HA. The ribs in thalassemia II. The pathogenesis of the changes. *Radiology* 1981; 140: 656.

Lawson JP, Ablow RC, Pearson HA. The ribs in thalassemia I. The relationship of therapy. *Radiology* 1981; 140:656.

Lawson JP, Ablow RC, Pearson HA. The ribs in thalassemia Y. The relationship of therapy. *Radiology* 1981; 140:656.

Lefrere JJ, Girot R. HIV. infection in polytransfused thalassemic patients. *Lancet* 1987; 2:686.

Leonardi R, Verzi P, Caltabiano M. Indagine epidemiologica sulla prevalenza della carie dentale in giovani soggetti affetti da talassemia major. *Stomatol Mediterr (Italy)* 1990 Apr-jun; 10(2):133-6.

Ley TJ, Desimone J, Anagnou NP, y cols. 5-Azacytidine selectively increases  $\alpha$ globin synthesis in a patient with B<sup>+</sup>-thalassemia. *N Engl J Med* 1982; 307:1469.

Ley TJ. The pharmacology of hemoglobin switching of mice and men. *Blood* 1991; 77:1146.

Li CK, Chan HB, Chiu WK, Chow CB. Survival of an infant with homozygous  $\alpha$ -thalassemia, abstracted. *Pediat Res* 1990; 27: 266 A.

Licarelli G, Galiberti M, Polchi P, y cols. Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Engl J Med* 1990; 322:417-421.

Liebhaber SA, Cash FE, Cornfield DD. Evidence for post-translational control of Hb C synthesis in an individual with Hb C trait and  $\alpha$ -thalassemia. *Blood* 1988; 71:502.

Liebhaber SA, Kan YW.  $\alpha$ -Thalassemia caused by an unstable  $\alpha$ -globin mutant. *J Clin Invest* 1983; 71:461.

Linares M. Utilización de parámetros hematimétricos para la detección de talasemias heterocicotas beta y delta-beta. Tesis Doctoral 1990. Universidad de Valencia.

Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as a index of iron stores. *N Engl J Med* 1974; 290: 1213-1216.

Livingston FB. *Abnormal Hemoglobins in Human Populations*. Aldine, Chicago 1967.

Logothetis J, Loewenson RB, Augoustari O, y cols. Body growth in Cooley's anemia (homozygous beta-thalassemia) with a correlative study as to other aspects of the illness in 138 cases. *Pediatrics* 1972; 50:92.

Longinotti M, Dore F, Oggiano L, Paedini S, Postidda P, Guiso L, y cols. Vedute attuali sulla talassemia intermedia. *Recenti Prog Med (Italy)*, 1992 Apr; 83(4), p233-4.

Loukopoulos D, Hadji A, Papadakis M, y cols. Prenatal diagnosis of thalassemia and of the sickle cell syndromes in Greece. *Ann NY Acad Sci* 1990; 612:226.

Lowrey CH, Nienhvis AW. Treatment with azacitidine of patients with end-stage  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* 1993; 329:845.

Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, y cols. Bone marrow transplantation in adult thalassemia. *Blood* 1992; 80:1603.

Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, y cols. Marrow transplantation in patients with thalassemia responsive to iron chelation therapy. *N Engl J Med* 1993; 329:840.

Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, y cols. Marrow transplantation in patients with advanced thalassemia. *N Engl J Med* 1987; 316:1050.

Lucarelli G, Polchi P, Galimberte M, y cols. Marrow transplantation for thalassaemia following busulphan and cyclophosphamide. *Lancet* 1985; 1:1355.

Lucarelli G, Weatherall DJ. For debate: bone marrow transplantation for severe thalassaemia (1). The view from Psaro (2). To be or not to be. *Br J Haematol* 1991; 78:300.

Lucarello G, Galiberti M, Polch A, y cols. Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Engl J Med* 1990; 322: 417-421.

Lumby AL, Cooperman JM. Folic acid deficiency in thalassemia major. *Lancet* 1961; 2:490.

Llehaber SA, Kan YW. Differentiation of the mRNA transcripts originating from the  $\alpha 1$ - and  $\alpha 2$ -globin loci in normals and  $\alpha$ -thalassemia. *J Clin Invest* 1981; 68:439.

Madan N, Sikka M, Sharma S, Rusia U. Frequency of coincident iron deficiency and beta-thalassaemia trait (letter). *J Clin Pathol* 1996 Dec, 49(12): 1021-2.

Maj M, Magni LA, Confalonieri C. Valutazione della compliance in pazienti talassemici afferenti ad un ambulatorio D.H. strutturato. *Peditr Med Chir (Italy)* 1995 Jan-Feb; 17(1):49-51.



Mak IT, Weglicki WB. Characterization of iron-mediated of iron mediated peroxidative injury in isolated hepatic lysosomes. *J Clin Invest* 1985; 75-58.

Malamos B, Fessas P, Stamatoyannopoulos G. Types of thalassemia-trait carriers as revealed by a study of their incidence in Greece. *Br J Haematol* 1962; 8:5.

Marcus RE, Wonke B, Bantock HM, y cols. A prospective trial of your red cells in 48 patients with transfusion-dependent thalassemia. *Br L Haematol* 1985; 60:153.

Marti HR, Fischer S, Killer D, Bürg W. Can automated haematology analysers discriminate thalassemia from iron deficiency. *Acta Haemat* 1987,78: 180-183.

Masala A, Meloni T, Gallisai D, y cols. Endocrine functioning in multitransfund prepubertal patients with homozygous  $\beta$ - thalassemia. *J Clin Endocrin Metab* 1984; 56:667.

Masera G, Terzoli S, Avanzin A, y cols. Evaluation of the supertransfusion regimen in homozygous beta-thalassemia children. *Br J Haematol* 1982; 52:114.

Matsaniotis N, Kattamis C, Laskari S, y cols. When should at-risk patients with thalassaemia be boosted with hepatitis B vaccine. *Lancet* 1987; 1:1321.

Mazza U, Saglio G, Calagaris F, Camaschella C, Neretto G, Gallo E. Clinical and haematological data in 254 cases of betha-thalassaemia trait in Italy. *Br J Haematol* 1976; 33: 91-99.

Mc Clure S, Custer E, Bessman JD. Improved detection of early iron deficiency in nomanemic subjects. *Jama* 1985; 253: 1021-1023.

Mc. Donagh Kt, Nienhuis AW. The thalasseмии. p.783. In Nathan, DG., Oski, FA.:(eds): *Hematology of Infacy and Childhood*. 4th De. WB. Sanndres. Philadelphia 1993.

Mentzer WC. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973; I: 882.

Mentzer WG Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassemia trait. *Lancet* 1973; 1:882.

Merkel PA, Simonson DC, Amiel S, y cols. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with thalassemia major treated by hypertransfusion. *Engl J Med* 1988; 318:809.

Metaxatou-Mavromati AD, Antonopoulou HK, Laskani SS, y cols. Developmental changes in Hb F levels during the first two years of life in normal and heterozygous beta-thalassemia infants. *Pediatrics* 1982; 69:734.

Michel G, Orsini A, Thuret I, Lena D, Perrimond H. Quelle place pour la transplantation medullaire dans le traitement des thalasseemies majeures. *Pediatric (Bucur) (France)* 1990; 45(11): 749-51.

Miguel A, Linares M, Miguel A, Miguel-Borja JM. Red cell distributios width analysis in differentiation between iron deficiency and thalassenia minor. *Acta Haemat* 1988; 80: 59.

Milman N, Cohn J. Serum ferritin and iron status of children in the Faroe Islands. *Eur J Pediatr* 1984; 142: 89-92.

Milner PF, Clegg JB, Weatherall DJ. Haemoglobin H disease due to a unique haemoglobin variant with elongated  $\alpha$ chain. *Lancet* 1971; 1:729.

Modell B, Berdoukas V. *The clinical Approach to Thalassaemia*. Grune & Stratton Orlando, FL 1984.

Modell B. Total management of thalassemia. *Arch Dis Child* 1977; 52:489-500.

Modell CB, Beck J. Long-term desferrioxamine therapy in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1974; 323:201.

Mohandas N, Kim YR, Tycko D, Orlyk J, Wyatt J, Groner W. Accute and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood* 1986; 68: 506-513.

Molchanova TP, Huisman TH. The importance of the 3' untranslated region for the expression of the alpha-globin genes. *Hemoglobin*. 1996 Feb; 20(1): 41-54.

Mulligan RCP. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260:926.

Muñoz Villa A, Madero Lopez L; Hernandez Rodriguez M. Metabolismo del hierro durante el desarrollo puberal. *Sangre* 1987; 32: 175-185.

Muralitharan S, Srivastava A, Shaji RV, Nathai M, Srivastava VM, Dennison D, Lu CY, Krishnamoorthy R. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia mutations using the reverse dot blot technique. *Natl Med J India* 1996 Mar-Apr; 9(2): 7-1.

Nagel RL, Roth EF Jr. Malaria and red cell genetic defects. *Blood* 1989; 74:1213.

Nathan DG, Gunn RB. Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am J Med* 1966; 41:815.

Newton KL, Mc Neeley G, Novick M. Extramedullary hematopoiesis presenting as a pelvic mass in a patient with  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Jama* 1983; 205:2178.

Nienhls Aw. Safety of intensive chelation therapy. *N Engl J Med* 1977; 296:114.

Nisli G, Kavakli K, Vergin C, Oztop S, Cetingul N. Recombinant human erythropoietin trial in thalassemia intermedia. *J Trop Peiatric* 1996 Dec; 42(6): 330-4.

O'Brien RT, Pearson HA, Spencer RP. Transfusion induced decrease in spleen size in thalassemia major. *J Pediatr* 1972; 81:105.

O'Brien RT. The effect of iron deficiency on the expression of hemoglobin. *H Blood* 1973; 41:853.

Obene-Frempon GK, Rappaport E, Schwartz E. Thalassemia syndromes: recent advances. *Hematol. Oncol Clin North Am* 1987; 1:503.

Ojwang PJ, Nakatsuji T, Gardiner MB, y cols. Gene deletion as the molecular basis for the Kenya-G $\gamma$ -HPFH condition. *Hemoglobin* 1983; 7:115.

Olive M, Mora A, Ballve M, Cortes C, Cabarrocas E. Síndromes talasémicos y anestesia. *Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación (Spain)* 1992 May-Jun; 39(3): 166-9.

Olivieri NF, Brittenham GH. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997 Feb 1; 89(3): 739-61.

Olivieri NF, Berriman AM, Tyer BJ y cols. Reduction in tissue iron stores with a new regimen of continuous ambulatory intravenous deferoxamine. *Am. J Hematol* 1992; 41:61.

Olivieri N, Raymond-Buncic J, Chow E. Visual and auditory neurotoxicity in patients receiving subcutaneous deferoxamine infusions. *N Engl J Med* 1986; 314:869.

Olivieri NF, Brittenham GM. Iron chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997 Feb 1; 89(3): 739-61.

Olivieri NF, Koren G, Matsui D, y cols. Reduction of tissue iron stores and normalization of serum ferritin during treatment with the iron oral chelator II in thalassemia intermedia. *Blood* 1992; 79:2741.

Orkin SH, Goff SC. Nonsense and frameshift mutations in  $\beta$ -thalassemia detected in cloned  $\beta$ globin genes. *J Biol Chem* 1981; 256:9782.

Orkin SH, Goff SC. The duplicated human  $\alpha$ globin genes: their relative expression as measured by RNA analysis. *Cell* 1981; 24:345.

Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, y cols. Abnormal RNA processing due to the exon mutations of BE-globin gene. *Nature* 1982; 300:768.

Oron Karni V, Filon D, Eund D, Rachmilewitz E, Oppenheim A. Prenatal diagnosis based on simultaneous DNA analysis for alpha and beta globin genes (letter). *Am J Hematol* 1996 Nov; 53(3): 203-4.

Ottolenghi S, Giglione B, Taramelli R, y cols. Molecular comparison of delta-beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin DNAs: Evidence of a regulatory urea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 2347-2351.

Papavasiliou C, Sandilos P. Effect of radiotherapy on symptoms due to heterotopic marrow in  $\beta$ -thalassemia. *Lancet* 1987; 1:13.

Pearson HA, Benz EJ Jr. Thalassemia syndromes. p.439. In Miller Dr., Baehner, RL., McMillan CW.(eds): *Smith's. Blood Diseases of Infancy and Childhood*. 5th Ed. C.V.Mosby. St. Louis, 1.984.

Pearson HA, Guiliotis DK, O'Brien RT, y cols. Thalassemia in Greek Americans. *J Pediatr* 1975; 86:917.

Pearson HA, O'Brien RT, McIntosh S. Screening for thalassemia trait by electronic measurements of mean corpuscular volume. *N Engl J Med*, 288:351.

Pellicer A. Frequency of thalassemia in a sample of Spanish population. *Am J Hum Genet* 1967; 19: 695-699.

Peres MJ, Carreiro MH, Machado MC, Sixas T, Picanco I, Lavinha J, Martins MC. Neonatal screening of hemoglobinopathies in a population rearing in Portugal. *Acta Med Port* 1996 Apr-Jun; 9(4-6): 135-9.

Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, y cols. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin gene expression in the  $\beta$ globin disorders. *N Engl J Med* 1993; 328:81.

Peterson CM, Graziano JH, Grady RW, y cols. Chelation studies with 2,3-dihydrobenzoic acid in patients with  $\beta$ -thalassemia major. *Br J Haematol* 1976; 33:477.

Pintor C, Cella SG, Manso P, y cols. Impaired growth hormone (GH) resposto GH-releasing hormone in thalassemia major. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 2:263.

Piomelli S, Danoff SJ, Becker MH, y cols. Prevention of bone malformation and cardiomegaly in Cooley's anemia by early hypertransfusion regimen. *Ann NY Acad Sci* 1969; 165:427.

Piomelli S, Karpatkin MH, Arzaniam M, y cols. Hypertransfusion regimen in patients with Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1974; 232:186.

Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, Weatherall DJ. Iron absorption and loading in beta-thalassemia intermedia. *Lancet* 1979; 2:819.

Pippard MJ, Wainscoat JS. Erythrokinetics and iron status in heterozygous  $\beta$ -thalassemia and the effect of interaction with  $\alpha$ -thalassemia. *Br J Haematol* 1987; 66:123.

Pirastu M, Ristaldi MS, Cao A. Prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia based on restriction endonuclease analysis of amplified fetal DNA. *J Med Genet* 1989; 26:363-367.

Pistevou Gompaki K, Skaragas G, Paraskevopoulos P, Kotsa K, Repanta E. Extramedullary haematopoiesis in thalassaemia: results of radiotherapy: a report of three patients. *Clin Oncol R Coll Radiol* 1996; 8(2): 120-2.

Prasad AS, Diwany M, Gabre M, y cols. Biochemical studies in thalassemia. *Ann Intern Med* 1965; 62-87.

Propper RD, Shurin SB, Nathan DG. Reassessment of the use of desferrioxamine B in iron overload. *N Engl J Med* 1976; 294:1421.

Propper RD, Button LN, Nathan DG. New approaches to the transfusion management of thalassemia. *Blood* 1980; 55:55.

Propper RD, Cooper B, Rufo RR, y cols. Continuous subcutaneous administration of deferoxamine in patients with iron overload. *N Engl J Med* 1977; 297:418.

Propper RD, Nathan DG. Desferrioxamine and the pump. In Zaino E.C., Roberts. RH (eds): *Chelation Therapy in Chronic Iron Overload. Symposia Specialists Miami, FL* 1977.

Propper RD. Neocytes and neocyte-erythrocyte exchange. *Prog Biol Rev* 1982; 88:227.

Puchades MA, Vives S, Corrons JLI, Aguilar JLI, Manrubia E. Análisis genotípico de 20 familias con microcitosis congénita sin expresividad electroforética. *Sangre* 1989; 34: 389 (Resumen).

Rachmilewitz EA, Goldfarb A, Dover G. Administration of erythropoietin to patients with  $\beta$ -thalassemia intermedia: a preliminary trial. *Blood* 1991; 78:1145.

Rachmilewitz EA, Lubin BBH, Shohet SB. Lipid membrane peroxidation in  $\beta$ -thalassemia major. *Blood* 1976; 47:495.

Rachmilewitz EA, Shifter A, Kahane I. Vitamin E deficiency in  $\beta$ -thalassemia major. Changes in hematological and biochemical parameters following a therapeutic clinical trial with alpha-tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1979; 32:1850.

Rao VB, Bannerjee MK, Shewale LH, Panthaki MH, Bandodkar SB. Detection of haemoglobin variants for the diagnosis of beta thalassaemia & other haemoglobinopathies using anion exchange high performance liquid chromatography. *Indian J Med Res* 1996 Dec; 104:365-73.

Ratip S, Petro M, Old JM, Wonke B, porter JB, Modell B. Relationship between the severity of beta-thalassaemia syndromes and the number of alleviating mutations. *Eur J Haematol* 1997 Jan; 58(1): 14-21.

Rebulla P. Blood transfusion in beta thalassaemia major. *Transfus-Med* 1995 Dec; 5(4): 247-58.

Roberts GT, El Badawi SB. Red blood cell distribution width index in some hematologic diseases. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 222-226.

Rodgers GP, Dover GJ, Noguchi C et al. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N Engl J Med* 1990; 322:1037.

Rodgers GP, Dover GJ, Uyeska N, et al. Augmentation by erythropoietin of the fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1993; 328:73.

Romão L, Olm G, Martins MC, Rodrigues V, Coutinho-Gomes MP, Lavinha J. Unusual molecular basis of hemoglobin H disease in the Azores Islands (Portugal). *Hemoglobin* 1990; en prensa.

Rosatelli C, Tuveri T, Scalias MT, et al. Prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia by oligonucleotide analysis in Mediterranean populations. *J Med Genet* 1989; 25:762-765.

Rosatello C, Falch AM, Scalas MT et al. Hematological phenotype of the double heterozygous state for alpha and beta thalassemia. *Hemoglobin* 1984; 8:25.

Rubio E, Fillat B, Martinez T. Análisis de la varianza. *Jano* 1986; 30: 2049-2056.

Rund D, Oron Karni V, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Oppenheim A. Genetic analysis of beta thalassemia intermedia in Israel: diversity of mechanisms and unpredictability of phenotype. *Am J Hematol* 1997 Jan; 54(1): 16-22.

Rund D, Rachmilewitz E. Thalassemia major: 1995 older patients, new therapies. *Blood-Rev* 1995 Mar; 9(1): 25-32.

Saiki RK, Chanh CA, Levenson CH, y cols. Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988; 319:357.

Savona-Ventura C, Bonello F. Beta-thalassemia syndromes and pregnancy. *Obstet-Gynecol-Surg* 1994 Feb; 49(2): 129-37.

Sbyrakis S, Karagiorga-Lagana M, Voskaki I, y cols. A simple index for initiating transfusion treatment in thalassaemia intermedia. *Br J Haematol* 1987; 67:479.

Schrier SL. Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Ann Rev Med* 1994; 45: 211-8.

Schuman JB, Taiser CL, Peloquin R y cols. The erythropoietic response to pregnancy in  $\beta$ -thalassemia minor. *Br J Haematol* 1973; 25:249.

Schwartz E, Atwater J. Alfa-thalassemia in the American Negro. *J Clin Invest* 1972; 51:412.

Schwartz E, Benz EJ Jr. Thalassemia syndromes. P.428. In Miller Dr. Baehner, RL (eds): *Smith's Blood Diseases of infancy and Childhood*. Dr. Ed. CV. Mosby, St Louis 1989.

Schwartz E. The silent carrier of  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* 1969; 281:1327.

Secchi GC, Scotti PG, Cambiagli G, y cols. Respiratory function tests in adolescents with  $\beta$ -thalassemia major. *Haematologica* 1982; 67:23.



Sen L, Goicoa MA, Nualart PJ, Ballart IJ, Palacios F, Diez RA, Estevez ME. Estudios inmunologicos en tatasemia mayor. Medicina (B. Aires) (Argentina) 1989; 49(2), p131-4.

Serhadri R, Colebatch JH, Gordon P. Long-term administration of desferrioxamine in - thalassemia major. Arch Dis Child 1974; 49:8.

Shaw PJ, Poynton CH, Barrett AJ. Timing of bone-marrow transplantation in thalassaemia major. Lancet 1985; 2:153.

Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red bood cells in thalassemia. Semin Hematol 1990; 27:70.

Shine I, Lal S. Strategy to delect beta-thalassaemia minor. Lancet 1977; I: 692-694.

Silvertroni E, Bianco I, Grazizni B, Carboni C, Valente M, Lerone M, D'arca SV. Screeninng of thalassaemia in intermediate schools in Lation (Italy) reults of four year's work. J Med Genet 1980; 17: 161-164.

Silvestroni E, Bianco I. A highly cost effective method of mass screening for thalassemia. Br Med J 1983; 286:1007.

Silvestroni E, Blanco I. Screaning for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. Am J Hum Genet 1975; 27:198.

Singh S, Khodr H, Taylor MI, Hider RE. Therapeutic iron chelators and their potential side-efferts. Biochem-Soc-Symp 1995; 61:127-37.

Sirchia G, Zanella A, Parravicini A, y cols. Red cell alloantibodies in Thalassemia major. Transfusion 1985; 25:110.

Smith CH, Sisson TRC, Floyd WH, y cols. Serum iron and iron-binding capacity of the serum children with severe Mediterranean (Cooley's) anemia. Pediatrics 1950; 5:799.

Soria NW, Tulian CL, Plassa F, Roth GA. Beta Thalassemia and hemoglobin types in Argentina: determination of most frequent mutations. Am J Hematol 1997 Feb; 54(2): 160-3.

Southern EM. Deteccion of specific sequeences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.M. Biol., 1975.

- Spritz RA, Jagadeeswaran P, Choudary PV y cols. Base substitution in an intervening sequence of a  $\beta^+$ -thalassemia human globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:2455.
- Stamatoyannopoulos G, Veith R, Al-Khatti A, Papayannopoulou T. Induction of fetal hemoglobin by cell-cycle-specific drugs and recombinant erythropoietin. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 12:21.
- Stanfield JB. Acute benign pericarditis in thalassaemia major. *Proc R Soc Med* 1962; 55:236.
- Stuart MJ. Platelet dysfunction in homozygous beta-thalassaemia. *Pediatr Res* 1979; 13:1345.
- Sturgeon P, Finch CA. Erythrokinetics in Cooley's anemia. *Blood* 1957; 12:64.
- Takehita K, Forget BG, Scarpa A, Benz EJ Jr. Intranuclear defects in  $\beta$ globin mRNA accumulation due to a premature accumulation translation termination codon. *Blood* 1984; 64:13.
- Tamagnini GP, Lope MG, Castanheira ME, y cols.  $\beta^+$ -thalassaemia Portuguese type: clinical haematological and molecular studies of a newly defined form of  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 1983; 54:189.
- Thakernhpol K, Fucharoen S, Boonyaphipat P, Srisook K, Sahaphong S, Vathanophas V, Stitnimankarn T. Liver injury due to iron overload in thalassaemia: histopathologic and ultrastructural studies. *Biometals* 1996 Apr; 9(2): 177-83.
- Thein SL. Dominant  $\beta^-$  thalassaemia: molecular basis and pathophysiology. *Br J Haematol* 1992; 80:273.
- Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, y cols. Bone marrow transplantation for thalassaemia. *Lancet* 1982; 2:227.
- Thomas RM, Skalicka AE. Successful pregnancy in transfusion-dependent thalassaemia. *Arch Dis Child* 1980; 55:572.
- Thomas S, Srivastava A, Jeyaseelan L, Dennison D, Chandy M. NESTROFT as a creaming test for the detection of thalassaemia & common

haemoglobinopathies an evaluation against a high performance liquid chromatographic method. *Indian J Med Res* 1996 Aug; 104:194-7.

Tolis GJ, Vlachopapadopoulou E, Karydis I. Reproductive health in patients with beta-thalassemia. *Curr-Opin-Pediatr* 1996 Aug; 8(4): 406-10.

Tolis GJ, Vlachopapadopoulou E, Karydis I. Reproductive health in patients with beta-thalassemia. *Curr Opin Pediatr* 1996 Aug; 8(4): 406-10.

Tondury P. Thalassemia today (editorial). *Scweiz Med Wochenschr* 1996 Nov 2; 126(44): 1865-6.

Townes TM, Behringer RR. Human globin locus activation region (LAR): rote in temporal control. *Trends Genet* 1990; 6:219.

Traeger Synodinos J, Kanavakis E, Vrettou C, Maragoudaki E, Michael T, Metaxotuo Mavromati A, Kattamis C. The triplicated alpha-globin gene locus in Beta-thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *Br J Haematol* 1996 Dec 1; 95 (3): 467-71.

Trecartin RF, Liebhaber SA, Chang JC, y cols.  $\beta^0$ -thalassemia in Sardinia in caused by a nouse mutation. *J Clin Invest* 1981; 68:1012.

Tycko DH, Metz MH, Epstein EA, Grinbaum A. Flowcytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. *Applied Optics* 1985; 24: 1355-1365.

Van Der Ploeg LHT, Konings A, Oort M, y cols.  $\gamma$ - $\beta$  thalassaemia studies showing that deletion of the  $\gamma$ -and- $\delta$ -genes influences  $\beta$ -globin gene expression in man. *Nature* 1980; 283:637.

Varela V, Abreu S, Rossetti LC, Targovnik H. Most frequent beta-thalassemia mutations in the argentinian population. *Sangre-Barc* 1996 Apr; 41(2): 137-40.

Vaya A, Carratala A, Martinez C, Aznar J. Hematological and clinical data in 200 cases of thalassaemia trait in Eastern. Spain. *Nouv Rev F Hematol* 1983; 25: 369-373.

Veith R, Galanello R, Papayannopoulou T, y cols. Stimulation of F-cell production in patients with sickle cell anemia treated with cytarabine or hydroxy-urea. *N Engl J Med* 1985; 313:1571.

Villegas A, Lopez Rubio M, Sanchez J, Gonzalez A, Perez Clausell C, Sal del Rio A, y cols. Primer caso de talasemia intermedia descrito en España debido a la interacción de tres genes alpha con beta talasemia minor. *Rev. Clin. Esp. (Spain)* 1993 Apr; 192(6), p268-70.

Villegas A, Alvarez-Sala JL, Martinez R. Método recomendado por el ICSH para la determinación de la hemoglobina fetal. *Sangre* 1983; 28: 796-800.

Villegas A, Ropero P, Gonzalez FA, Armada B, Marti E, Carrero MD, Sanchez J. Molecular heterogeneity of beta-thalassaemia in a Spanish population from the area centre of Spain (letter). *Eur J Haematol* 1996 Nov; 57(5): 389-91.

Vives Corrons J I. Hemoglobinopatias estructurales y talasemias. En Sanz-Sabrafen J. *Hematología clínica 2ª Ed.* Barcelona: Ediciones Doyma , 213-235, 1988.

Wainscoat JS, Kanavakis E, Wood WG, y cols. Thalassaemia intermedia in Cyprus: The interaction of  $\alpha$  and  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 1983; 53:411.

Wapnick AA, Lynch SR, Krawitz P, y cols. Effects of iron overload on ascorbic acid metabolism. *Br Med J* 1968; 3:704.

Wasi P, Disthasongchan P, Na-Nakorn S. The effect of iron deficiency on the levels of hemoglobins A2 and E. *J Lab Clin Med* 1968; 71:85.

Wasi P. Streptococcal infection leading to cardiac and renal involvement in thalassaemia. *Lancet* 1971; 1:949.

Weatherall DJ, Clegg JB, Wong HB. The haemoglobin constitution of infant with the haemoglobin Bart's hydrops foetallis syndrome. *Br J Haematol* 1970; 18:357.

Weatherall DJ, Clegg JB. *Thalassaemia Syndromes.* Oxford Blackwell Scientific. Publications 1981.

Weatherall DJ, Clegg JB. The  $\alpha$  chain termination mutants and their relation to the  $\alpha$ -thalassemia. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1975; 271:411.

Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassaemia Syndromes*. 3rd. Edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1981.

Weatherall DJ, Pippard MJ, Callender ST. Editorial retrospective: iron loading in thalassemia-5 years with the pump. *N Engl J Med* 1983; 308:456.

Weatherall DJ, Wainscoat JS. The molecular pathology of thalassaemia. In Hoffbrand AV de. *Recent Advances in Haematology*, vol. 4. Edinburgh, Churchill Livingstone 1985; 63-88.

Weatherall DJ. Biochemical phenotypes of thalassemia in the American Negro population. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119:450.

Weatherall DJ. Bone marrow transplantation for thalassemia and other inherited disorders of hemoglobin. *Blood* 1992; 80:1379.

Weatherall DJ. The genetics of the thalassemys. *Br Med Bull* 1969; 25:24.

Weatherall DJ. The Thalassemys. In: Williams WJ, Bentler E, Erslev AJ, Lichtman MA. *Hematology* 3<sup>a</sup> Ed. Nueva York: McCraw-Hill Inc. 493-521. 1983.

Weatherall DJ. The thalassemys. p.157. In Stamotoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Vermus HE (eds): *Molecular Basis of Blood Diseases*. 2nd. Ed. WB. Sanders, Philadelphia 1993.

Weatherall DJ. The treatment of thalassemia slow progress and new dilemmas. *N Engl J Med* 1993; 329:877.

Webster BH, Lammi AT. Thalassaemia and other haemoglobinopathies in general practice. *Aust-Fam-Physician* 1994 Aug; 23(8): 1485-90.

Westaway D, Williamson R. An intron nucleotide sequence variant in a cloned  $\beta^+$ -thalassaemia globin gene. *Nucleic Acids Res* 1981; 9:1177.

Whipple GH, Bradford WL. Mediterranean disease-thalassaemia (erythroblastic anemia of Cooley): associated pigment abnormalities simulating hemichromatosis. *J Pediatr* 1932; 9:279.

Wickramasinghe SN, Hughes M, Fucharoen S, y cols. The fate of excess  $\beta$ globin chains within erythropoietic cells in  $\alpha$ thalassaemia 2 trait  $\alpha$ thalassaemia I trait, haemoglobin H disease and haemoglobin Q-H disease an electrom microscope study. *Br J Haematol* 1984; 56:473.

Wiwnwe W, Wanachiwanawin W, Chinprasertsuk S, Siripanyaphinyo U, Mawas F, Fucharoen S, Wickramasinghe SN. Increase serum levels of macrophage colony-stimulatig factor (M-CSF) in alpha and beta thalassaemia syndromes: correlation anemia and monocyte activation. *Eur J Haematol*, 1996 Nov; 57(5): 364-9.

Wolfe L, Olivievi N, Saltan D, y cols. Prevention of cardiac disease by subcutaneous deferoxamine in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* 1985; 312:16.

Wolman IJ. Transfusion therapy in Cooley's anemia growth and health is related to long range hemoglobin levels: a progress report. *Ann NY Acad Sci* 1964; 119:736.

Wood WG, Weatherall DJ, Hart GM, y cols. Hematologic changes and hemoglobin analysis of beta thalassemia heterozygotes during the first year of life. *Pediatr Res* 1982; 16:286.

Yasunaga M, Fujiyama Y, Miyagawa A, Inoue T, Andoh A, Hodohara K, y cols. Thalassenia incidentally found by marked erythrocytosis due to an ochre mutation at codon 35 in a Japanese man. *Intern Med* 1995 Dec; 34(12): 1198-200.

Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. Hereditary haemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered* 1983; 33:125-129.

Zago MA, Costa FF. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:385-388.