
MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Electroforesis de Hemoglobinas.

Estudio descriptivo de los resultados obtenidos analizando 37.608 muestras

 15 min.


El examen de hemoglobina (Hb) es una prueba sanguínea que se ordena con frecuencia y casi siempre se hace como parte de un conteo sanguíneo completo. La presencia de algún defecto de tipo hereditario en la hemoglobina que tiene como consecuencia una estructura anormal en una de las cadenas de la globina se denomina hemoglobinopatía. En el siguiente trabajo profesionales del Área de Proteínas – Hemoglobinas de Laboratorio Manlab nos presentan un estudio descriptivo de los resultados obtenidos de las electroforesis de Hb de 37608 pacientes realizado entre los años 2006 y 2015.



Osatinsky, R.*;
Fainberg, G.**

Área Proteínas-Hemoglobinas.- Manlab
*Jefa y Consultora del Área; ** Bioquímica



E-mail: raquel.osatinsky@manlab.com.ar



Introducción

Las hemoglobinopatías son desórdenes hereditarios monogénicos, autosómicos recesivos, algunos son autosómicos dominantes, como algunas formas inestables. Están distribuidos en todo el mundo como consecuencia de las migraciones y

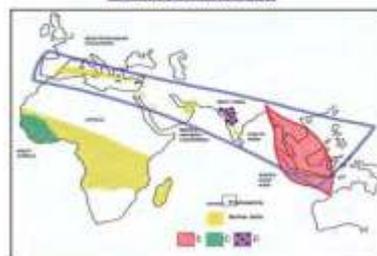
entrecruzamientos poblacionales. Los portadores (heterocigotas), generalmente son sanos. Las formas severas se manifiestan sobre todo en niños nacidos de padres portadores. Un documento de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008 informa que un 7% de la población mundial es portadora de una hemoglobinopatía (síndromes talasémicos y hemoglobinopatías estructurales, asociados o no), planteando que los organismos de salud de cada país deberían realizar estudios poblacionales para conocer la prevalencia de éstas patologías. De nuestro país y de los países latinoamericanos hay muy pocos datos.



Distribución mundial de nacimientos con desórdenes de la hemoglobina (x 1000 vivos)



DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS

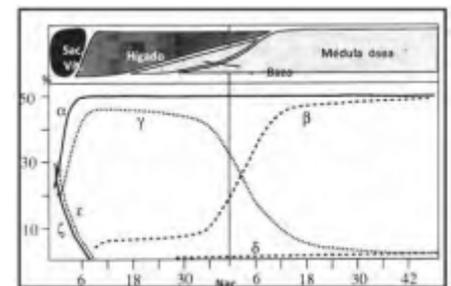


La molécula de Hb está formada por dos pares de cadenas de globina unidas a un grupo hem. Se sintetizan seis cadenas diferentes. Tres son embrionarias transitorias. En la vida post-natal permanecen las cadenas: α , β , γ , δ . En el adulto se encuentran: Hb A (Adulta normal - $\alpha_2\beta_2$); Hb F (Fetal - $\alpha_2\gamma_2$) y Hb A₂ - ($\alpha_2\delta_2$).

La síntesis de las cadenas α está dirigida por dos pares de genes α , $\alpha 1$ y $\alpha 2$, en el cromosoma 16. La síntesis de las cadenas β y δ , por genes únicos β y δ , en el cromosoma 11. La síntesis de la cadena γ , está dirigida por dos genes: $G\gamma$ y $A\gamma$, también en el cromosoma 11.



Figura 3.- Desarrollo de las cadenas de globina de la hemoglobina



Todos los síndromes clínicos que se presentan por alteraciones de la síntesis y/o estructura de las cadenas de la Hb, se conocen como: HEMOGLOBINOPATÍAS. Constituyen un defecto genético como consecuencia de la estructura anormal de una o más de las cadenas de globina. Puede deberse a la sustitución de un amino ácido

por otro como en las Hb S y Hb C; a la delección de una porción de la secuencia de aminoácidos como en la Hb Gun Hill; a una hibridación anormal entre dos cadenas como en la Hb Lepore, o a una elongación anormal de una cadena de globina como en la Hb Constant Spring.

Las alteraciones pueden ser cualitativas o cuantitativas. Las cualitativas son las estructurales, se caracterizan por sustituir uno o más aminoácidos de la cadena involucrada o por una mutación. Las variantes más frecuentes por alteración de la cadena β son las Hb S-C-D^{Punjab}-E y muchas otras. Las cuantitativas son las talasemias porque está alterada la síntesis de las cadenas de la globina. Cuando se afecta la cadena α tenemos las α talasemias y en el caso de las cadenas β , las β talasemias.

Objetivo

Realizar un estudio descriptivo de los resultados obtenidos en las electroforesis de Hb que nos llegan al laboratorio. Se procesan

diariamente un promedio de 40/50 muestras; en nueve años (de Mayo de 2006 a Abril de 2015) hacen un total (N) de 37.608 muestras procesadas; observamos en muchos casos que al solicitar datos del paciente, no siempre contamos con ellos, razón por la cual consideramos que los resultados que se observen al final no indiquen prevalencia ni frecuencia de las distintas hemoglobinopatías, sí tienen un valor informativo sobre ésta patología que está considerada entre "las raras". La idea es mostrar nuestra experiencia de más de nueve años de trabajo, con datos porcentuales de la población que nos llega (niños y adultos) sin realizar discriminación de los grupos. Son muestras de derivación de laboratorios. Los pacientes generalmente consultan por presentar anemia crónica, que no responden al tratamiento con hierro o con sospecha de ser portador talasémico, por provenir de una familia de ascendencia italiana. Por lo tanto los resultados que se muestran tienen un sesgo importante que no invalida el trabajo realizado y el objetivo del mismo: señalar la importancia de adjuntar a las solicitudes de

estudio los siguientes datos: la edad (imprescindible); diagnóstico presuntivo, hemograma; ferremia, transferrina, saturación de la siderofilina y ferritina.

Consideraciones

Trabajamos con muestra de sangre total extraída con anticoagulante EDTA. La muestra debe ser procesada en un término no mayor 5/6 días, manteniendo la misma en heladera entre 4°-10°C. Se realiza electroforesis capilar (EC) con el equipo Capillarys 2 Flex-Pearcing, totalmente automatizado; la hemólisis de los glóbulos rojos lo realiza el equipo. El buffer es alcalino. En el monitor se observa la curva; el fondo de la pantalla está dividido en 15 zonas para facilitar la identificación de los picos de las Hb anómalas.

En Septiembre de 2007, durante el 41º Congreso de la Sociedad Brasileira de Patología Clínica y Medicina Laboratorial, presentamos un trabajo con los datos correspondientes a un año (Mayo 2006 - Abril

BD Vacutainer® Líder en Soluciones Preanalíticas

Las jeringas **BD A-Line**, para la toma de muestra de sangre arterial, se encuentran prellenadas con heparina de litio balanceada con calcio, garantizando la calidad de la muestra y evitando la formación de coágulos.



Para contactarse, llámenos al
0800-444-55BD (23) o escribanos
a: vacutainer@bd.com



2007) con un N de 3.981 muestras. Las mismas se procesaron con un equipo Hydrasis - Sebia sobre soporte de agarosa. Analizamos en el mismo los valores de la Hb A2 y de la Hb F en distintos rangos que nos permitieran diferenciar los probables portadores talasémicos, los datos pueden observarse en la tabla N° 1 y 2.



Tabla 1: En la parte superior de la tabla se observan los valores de la Hb A2 agrupadas por rango: <2,00 valor debajo del normal, sospecha de probable portador de α talasemia // de 2,00 – 3,5 VN // de 3,60 – 6,90 valor elevado, sospecha de portador de β talasemia // > 7,00 probable dato erróneo, se sugiere repetir. El parte inferior de la tabla están los valores HbF: < de 2,00 VN // de 2,10 a 4,5 valor elevado, probable portador de β talasemia // de 4,60 a 10,00, valor muy elevado probable portador de β talasemia // de 11,00 – 19,00 y > de 19,00 probable portador de Persistencia, de Hb Fetal en el Adulto.

Resultados obtenidos sobre n = 3981

HbA2 % < 2,00	2,00 – 3,5	3,6 – 6,9	> 7,00
36,50 (n=1453)	49,48 (n=1970)	49,48 (n=1970)	49,48 (n=1970)

HbA2 % < 2,00	2,1 – 4,5	4,6 – 10	11- 18	> 18
97,89 (n=3897)	0,58 (n=23)	1,31 (n=52)	0,15 (n=6)	0,07 (n=3)

Estudio realizado sobre gel de agarosa periodo 2006 – 2007 – Hydrasis Sebia

El cambio de método, de trabajar con soporte de agarosa a la electroforesis capilar, nos permitió verificar una mayor precisión en la separación de la Hb A de la Hb F y en comprobar que por capilaridad se detectan la presencia de pequeños picos, en algunos casos corresponden a síntesis de algunas cadenas de la globina; en ocasiones y de acuerdo a los signos y síntomas clínicos

puede sospecharse la presencia de alguna Hb inestable, no siempre detectable por electroforesis.



Tabla 2: Hb anómalas encontradas: 9 heterocigotas para probables Hb A + Hb S // 3 heterocigotas para probables Hb A + Hb C // 21 pacientes probables portadores de Hb Lepore y 6 probables heterocigotas para Hb H; Hb I e Hb K.

Se encontraron también Hb anómalas:
9 Hb A / S
3 Hb A / C
21 Hb A / Lepore
6 Hb A / con Hb de movilidad rápida : H, I, K ?

En Noviembre de 2009 presentamos en el marco de XIX Congreso de la SAH, realizado en Mar del Plata los datos correspondientes a un período de un año sobre un N de 6.268 muestras procesadas, en las tablas N° 3, 4, 5 y 6 se presentan los datos correspondientes y en la tabla N° 7 se encuentran los valores obtenidos con ambos métodos (para comparar) que demuestran una mayor sensibilidad de la EC para el estudio de las hemoglobinopatías.



Tabla 3: Sobre un total de 6.268 casos estudiados por electroforesis capilar, en 5.107 (81,5 %), no se observan Hb anómalas; en 52 (0,8%) se encuentran heterocigotas para Hb anómalas; en 912 (14,6%) se observa Hb A2 elevada; en 94 (1,5%) se observa HbF aumentada y en 103 (1,6%) se observa Hb A2 y Hb F elevadas.

Estudios de Hb por EC: 2008 – 2009		
Resultados obtenidos sobre un N= 6.268		
Hb	N=	(%)
Sin picos anómalos	5.107	81,5
Hb anómalas	52	0,8
Hb A2 elevada	912	14,6
Hb Fetal elevada	94	1,5
HbA2 y HbF elevadas	103	1,6
Total	6.268	100



Tabla 4: Se observa los datos de los distintos rangos y los porcentajes correspondientes de los probables portadores talasémicos estudiados por electroforesis capilar.

Rangos Hb Fetal	N=	(%)
Menor a 0,2	4.778	76,1

de 0,2 – 1,0	1.267	20,2
de 2,0 – 4,9	161	2,6
de 5,0 – 10,0	42	0,7
Mayor de 10	20	0,4



Tabla 5: Datos de los valores de Hb A2 estudiados por electroforesis capilar, rangos y porcentajes compatibles con probables portadores talasémicos.

Rangos Hb A2	N=	(%)
Menor de 2	344	5,5
Entre 2 – 3,5	4.909	78,3
Mayores de 3,5	1.015	16,2
Total	6.268	100



Tabla 6: Hb anómalas encontradas.- Tomando como 100% el n° total los porcentajes obtenidos en este caso son 60,1 % para heterocigota Hb A + Hb S; 15,4 % para probable portador de Hb A más Hb Lepore; 7,7 % para probable heterocigota de Hb A + Hb C y un 15,4 % para otras Hb patias.

Hb Anómalas	N =	(%)
Hb A + Hb S	32	61,5
Hb A + Hb Lepore	8	15,4
Hb A + Hb C	4	7,7
Otras Hb	8	15,4
Total	52	100



Tabla 7: Datos comparativos de ambos estudios, los realizados sobre soporte de agarosa con los de la electroforesis capilar.

2006 / 07 n= 3.981 en gel de agarosa	HbA ₂ 13,87 % n= 552 ; HbF 1,94 % n= 81
2008 / 09 n= 6.268 electroforesis capilar	HbA ₂ 16,2 % n= 1.015 ; HbF 3,3 % n= 203

En las tablas se pueden observar los datos obtenidos en dos períodos distintos (2006 - 2007 y 2008 - 2009) empleando dos métodos diferentes, el primero con soporte de agarosa y el segundo por electroforesis capilar. En la tabla N° 7 están las cifras comparativas de los dos trabajos.

Desde 2006 hasta la fecha se sigue trabajando con EC. Cada semestre evaluamos los resultados y analizándolos, consideramos que éste trabajo descriptivo puede ayudar a aquellos profesionales no especialistas a una mejor interpretación de los mismos.

Haciendo un resumen de todos los datos obtenidos en el período que va de Mayo de 2006 a Abril de 2015, sobre un total de 37.608 muestras procesadas los datos más relevantes serían:



Electroforesis de Hb	N	(%)
Hb anómalas	423	1,1
Probables β talasemias	7.866	20,9
Probables α talasemias	13.077	34,8
Sin alteraciones	16.242	43,2
Total	37.608	

Conclusiones

El ejercicio de la bioquímica y el sistema de salud en nuestro país tiene características distintas al del resto de los países latinoamericanos. Aquí el paciente es “cautivo” de una obra social o de una medicina pre-paga, razón por la cual debe elegir entre los prestadores que “le corresponden”. No es así si la atención se realiza en los hospitales públicos. Éste tópico no lo discutiremos porque no es el objetivo el trabajo. Sí queremos señalar que es la razón porque las solicitudes de electroforesis de Hb llegan al laboratorio bioquímico clínico general y luego recién es derivado al médico especialista, o no, según los casos, y si no forma parte de un centro o instituto, vuelve a requerir los servicios del bioquímico para completar los estudios.

Sintetizando todo lo expuesto queremos señalar lo siguiente:

1) En nueve años estudiamos **37.608 muestras**.

2) **16.242 no presentaron alteraciones (43,2 %)**, podríamos considerarlas normales.

3) En **423 encontramos formas heterocigotas de Hb anómalas (1,1 %)**, la mayoría se corresponden con las Hb A+Hb S; Hb A+Hb Lepore; Hb A+Hb C ; que son más habituales hallarlas en nuestro país y varias Hb de movilidad rápida como las Hb H, J, N y K que muy pocas veces se observan.

El porcentaje observado no es elevado, sin embargo amerita que éstos pacientes sean estudiados con sus grupos familiares, averiguar a las etnias que pertenecen. Observar en la figura N°2, la distribución geográfica de las hemoglobopatías y asociarlas a las migraciones hacia nuestro país.

4) **7.866 agrupadas como probables portadores de β - talasemias (20,9%)**; donde los valores Hb A2 y/o Hb F están elevadas por encima de los valores de referencia y muchas muestras que presentaban elevación de Hb A2 y Hb F.

Las β - talasemias son las más conocidas y estudiadas. Tener un 20,9% en éste trabajo, aún a pesar del sesgo del mismo es una cifra elevada. Si observan la figura N°1 del informe de la OMS de 2008, en nuestro país, la cifra es muy baja. En estudios realizado en

1963 por la Dra. R. Osatinsky en el Servicio de Hematología del Hospital Ramos Mejía en conjunto con el Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez, con un grupo poblacional de niños en edad escolar, se obtuvo como resultado que un 4 % eran portadores talasémicos, la mayoría asintomáticos.

En el primer trabajo realizado en nuestro laboratorio (2006-2007) se obtuvo un 14% de probables portadores talasémicos. Es decir que en la actualidad ese porcentaje estaría en aumento y las autoridades de la salud deberían estudiar los costos – beneficios y realizar estudios poblacionales para mejorar la atención de ésta enfermedad.

5) **13.077 agrupadas como probables α - talasemias (34,8%)**; aquellas que presentaban Hb A2 disminuida (VR: 2,00), considerando las que tenían menos de 1,6%. Ésta expresaría una disminución de la síntesis de las cadenas α de la globina y ameritarían un estudio molecular.

A todos éstos pacientes deberían estudiarse con sus respectivos grupos familiares, realizarles las contrapruebas que están descritas tanto para talasémicos como para aquellos portadores de Hb estructurales, finalizando con los estudios moleculares para certificar la alteración o mutación que pueda haber ocurrido.

Según la OMS, las α -talasemias son



Sistema QIAxcel®

tecnolab



Electroforesis Capilar para Ácidos Nucleicos

Obtenga resultados en menor tiempo

- Analiza en menos de 3 minutos fragmentos de ADN/ARN

Estandarice y optimice el flujo de trabajo

- Sustituye al sistema tradicional de geles
- Documenta virtualmente los resultados
 - Contiene cartuchos listos para usar
 - Analiza hasta 96 muestras por cartucho
 - Obtiene resultados consistentes en concentraciones tan bajas como 0.1 mg/ul

Consultas y asesoramiento info@tecnolab.com.ar

las más comunes y más distribuidas entre la población mundial. Como generalmente son asintomáticas y no presentan las alteraciones comunes a las β -talasemias, pasan desapercibidas, hasta que se asocian a pacientes con alteraciones de la síntesis de las cadenas de las globinas y/o se manifiestan con sintomatologías leves y recién son estudiadas. Obtener un 34,8 % de probables portadores de α -talasemia, cifra muy elevada a pesar del sesgo del trabajo, es un índice a tener en cuenta para avanzar en el estudio de los portadores.

En nuestro laboratorio en el Dpto. de Genómica y Biología Molecular que dirige la Dra. María Silvia Pérez se realizan los estudios arriba mencionados.

Una última sugerencia, la importancia de saber la edad del paciente sobre todo cuando solicitan estudios a bebés menores de 6 meses. Normalmente la Hb F disminuye su síntesis a partir del nacimiento y llega a los valores de referencia después de dicha edad. Salvo que por indicación médica sea necesario. Insistir en conocer el origen étnico para facilitar la identificación en la movilidad del pico anómalo en la electroforesis; los porcentajes de los picos con una misma movilidad ayudan a discriminar la hemoglobinopatía. La relación médico-bioquímico es muy importante, así como la formación de un equipo multidisciplinario.



Bibliografía consultada

1. Beta - Thalassemia. Renzo Galanello and Raffaella Origa. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:11. <http://www.ojrd.com/content/5/1/11>
2. Hb A2 levels in normal, thalassaemia and haemoglobin E carriers by capillary electrophoresis. Hafiza A, Malisa MY, Khirotdin RD, Azlin I, Azma Z, Thong MC, Ali IM, Yeoh ZN, Mohd Ishak L, Mohd Radzi NR and Hussin NH. *Malaysian J Pathol* 2012; 34(2): 161-164.
3. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full?. Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ. *Blood* 2014, 23; 123(4): 481-5.
4. Association of α globin gene quadruplication and heterozygous β thalassemia in patients with thalassemia intermedia. Sollaino MC, Paglietti ME, Perseu L, Giagu N, Loi D, Galanello R. *Haematologica* 2009; Oct; 94(10): 1445-8.
5. Genetic Modifiers in Hemoglobinopathies. Rund D, Fucharoen S. *Curr Mol Med* 2008, Nov 8(7), 600-608.
6. Hemoglobin disorders: a look to the future. Nathan DG. *Blood*, Aug 8; 122(6), 859-60.
7. Hydroxyurea responsiveness in β -thalassemic patients is determined by the stress response adaptation of erythroid progenitors and their differentiation propensity. Pourfarzad F¹, von Lindern M, Azarkeivan A, Hou J, Kia SK, Esteghamat F, van Ijcken W, Philipsen S, Najmabadi H, Grosveld F. *Haematologica* 2013; May; 98(5):696-704.
8. Thalassemia. Alan R. Cohen, Renzo Galanello, Dudley J. Pennell, Melody J. Cunningham, and Elliott Vichinsky. American Society of Hematology. Educational Program. 2013
9. The α -Thalassemias. Frédéric B. Piel and David J. Weatherall, M.D. *N Engl J Med* 2014; 371: 1908-1916.
10. β -thalassemias: paradigmatic diseases for scientific discoveries and development of innovative therapies. Stefano Rivella. *Haematologica*. April 2015 100: 418-430.
11. Genetic Epidemiology and Preventive Healthcare in Multiethnic Societies: The Hemoglobinopathies. Piero C. Giordano, Cornelis L. Harteveld and Egbert Bakker. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014, 11(6), 6136-6146.
12. Guidelines for screening, diagnosis and management of hemoglobinopathies. Ghosh K, Colah R, Manglani M, Choudhry VP, Verma I, Madan N, Saxena R, Jain D, Marwaha N, Das R, Mohanty D, Choudhary R, Agarwal S, Ghosh M, Ross C. *Indian J Hum Genet* 2014 Apr; 20(2): 101-19.
13. Molecular Characterization of α - and β -Thalassaemia among Malay Patients. Nur Fatimah Mohd Yatim, Masitah Abd. Rahim, Kavitha Menon, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 8835-8845.
14. The α -Thalassemias. Frédéric B. Piel and David

J. Weatherall. *N Engl J Med* 2014; 371: 1908-16.

15. Updates of the Hb Var database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. Belinda Giardine, Joseph Borg, Emmanouil Viennas, Cristiana Pavlidis, Kamran Moradkhani, Philippe Joly, Marina Bartsakoulia, Cathy Riemer, Webb Miller, Giannis Tzimas, Henri Wajcman, Ross C. Hardison and George P. Patrinos. *Nucleic Acids Res* 2014, Jan 42.