

**6º CICLO INTERNACIONAL DE CONFERENCIAS DE LA CALIDAD, CIUDAD
DE MÉXICO**

27-29 DE JUNIO 2012

Mesa Redonda de Discusión

“Herramientas diagnósticas para hemoglobinopatías”

Coordinadora: Dra. en C. Bertha Ibarra Cortés (MX)

Participantes:

1. Juan David Alzate Duque (CO)
2. Claudia Patricia Alvarez Alvarez (CO)
3. QFB Rogelio Duran Montoya (MX)
4. QFB Patricia Martínez Cruz (MX)
5. Ing.BQ Luz del Alva Herrera Pérez (MX)
6. Sofia Sanchez, Asistente BIO RAD (MX)

Introducción.

En el laboratorio, la identificación y caracterización de las hemoglobinopatías es difícil, ya que muchas veces los pacientes van de un médico a otro o de un servicio a otro, antes de diagnosticarles una hemoglobinopatía. Tanto en México como en América Latina sí representan un problema médico; y en particular en las

zonas con raíces africanas es un problema de salud pública. Esto se sustenta en que hay coincidencias en poblaciones de determinadas regiones, como son por ej., en Colombia y en México, en el primero se han reportado frecuencias de heterocigotos para hemoglobina S de 3 a 4% y en México en algunas regiones se han observado frecuencias tan elevadas como 12.8.

Se ha demostrado que la técnica de HPLC es muy sencilla y estamos convencidos de que es una herramienta excelente y poderosa para el diagnóstico de las hemoglobinopatías por lo que sería deseable contar con esta herramienta de trabajo de manera rutinaria para hacer un diagnóstico más rápido.

De acuerdo a los estudios realizados en América Latina, las hemoglobinopatías clínicamente importantes son: **1)** los síndromes drepanocíticos, que incluyen al homocigoto para hemoglobina S o anemia drepanocítica (o de células falciformes); los heterocigotos compuestos para hemoglobina S y talasemia beta; hemoglobina S y delta-beta talasemia; hemoglobina S y hemoglobina D; hemoglobina S y hemoglobina C entre las combinaciones más frecuentes; **2)** la talasemia beta, en sus diferentes versiones: talasemia mayor (particularmente el homocigoto para dos mutaciones de tipo beta-0) observada en menor proporción; talasemia intermedia (heterocigoto compuesto para mutaciones beta-0 y beta-+); y la talasemia menor que es la forma que se observa con mayor frecuencia (heterocigoto para mutaciones de tipo beta-0 o beta-+). Se ha observado además en casi todas las poblaciones estudiadas la talasemia alfa, así como otras variantes estructurales con o sin manifestaciones clínicas.

En nuestro laboratorio hemos encontrado que en pacientes con sospecha de hemoglobinopatías, aproximadamente el 20 % tienen algún tipo de hemoglobinopatía y de ellas, 59 % corresponden a talasemia beta, 27.7% de síndromes drepanocíticos, 8.7 % de talasemia alfa y 4.6% de otras variantes de la hemoglobina.

En esta mesa redonda, analizamos y consensamos las características que puede presentar un individuo, o un paciente en quien se debe realizar la búsqueda de una hemoglobinopatía y encontramos que las principales son:

- Si al hacer el tamizaje de un hemolizado por HPLC o electroforesis de hemoglobina se observa un pico (o una banda) con características anormales.
- Si un paciente presenta anemia aguda o crónica con valores normales de hierro.
- Si se observan índices eritrocitarios anormales como: volumen globular o corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), número de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito. Estos valores dependen de la edad y el género. En nuestra experiencia personal, hemos observado que los pacientes con talasemia tienen incrementado el número de glóbulos rojos en relación a los valores de hemoglobina. Mientras que los pacientes con deficiencia de hierro, además de hemoglobina baja, tienen el número de glóbulos rojos bajo.

- Si la morfología eritrocitaria es anormal. Algunas veces al analizar el frotis sanguíneo se observan células drepanocíticas, o en blanco de tiro, lo que sugiere la presencia de hemoglobina S o de talasemia.
- Si el paciente presenta cianosis o ictericia conjuntival o generalizada.
- Si existen antecedentes familiares de hemoglobinopatía.
- Finalmente es importante considerar el origen étnico sobretodo ante la presencia de anemia crónica.

Posteriormente analizamos las herramientas necesarias para realizar el diagnóstico de las hemoglobinopatías y las clasificamos como: 1) básicas; 2) complementarias y 3) confirmatorias.

- 1) Las herramientas básicas incluyen el hemograma o citometría hemática (deben considerarse los índices hematológicos como cuenta de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM y la distribución del tamaño de los lóbulos rojos), morfología de los eritrocitos, recuento de reticulocitos y cinética de hierro.
- 2) Las herramientas complementarias, incluyen técnicas que permiten separar las proteínas de acuerdo a su carga eléctrica para y cuantificar los diferentes tipos de hemoglobinas, así como técnicas que se basan en otras propiedades fisicoquímicas como la estabilidad del tetrámero, la formación de metahemoglobina etc. Ejemplos de éstas serían: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), isoelectroenfoque, electroforesis capilar, electroforesis ácida y alcalina en acetato y en

agarosa, pruebas de estabilidad (si estoy tratando una hemoglobina inestable), cuantificaciones de metahemoglobina, pruebas de solubilidad o de inducción de drepanocitos, etc.

- 3) Las herramientas confirmatorias se basan en los estudios del ADN para identificar las mutaciones de los genes globínicos o de las regiones que regulan su expresión. Estas herramientas incluyen la amplificación de segmentos de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y su análisis por RFLP (Polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción), por el polimorfismo conformacional de cadena simple, por la electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes, por la amplificación refractaria específica de mutaciones (en esta técnica se utilizan iniciadores o “primers” con características muy particulares, que permiten identificar la mutación y por PCR-ASO, o sea amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando sondas específicas de la mutación, esta técnica se diferencia de la amplificación refractaria alelo específica en el tipo de iniciador. Otras herramientas más sofisticadas incluyen el análisis de alta resolución con curvas de fusión o HRM así como el análisis de mutaciones por microarreglos, ambas técnicas utilizan sondas específicas. Finalmente una herramienta que permite la visualización de y el esclarecimiento de muchos tipos de mutación es la secuenciación de ADN. Si embargo es importante mencionar que hay ocasiones en las que aún con secuenciación completa del gen, no se identifica la mutación, porque ésta puede estar

en otras regiones reguladoras que ya se conoce pueden modificar la expresión de los genes globínicos.

Flujogramas o algoritmos.

Para el análisis de diferentes tipos de hemoglobinopatías son muy útiles los flujogramas o algoritmos. Por ejemplo, para las talasemias es muy importante considerar el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y los valores de la hemoglobina A2 y de la hemoglobina fetal (Figura 1). Un individuo normal tiene VCM >78 fL, hemoglobina corpuscular media HCM >27 pg, hemoglobina A2 $<3\%$ y hemoglobina fetal normal (1-2%). Sin embargo, si encontramos microcitosis (VCM <78 fL), hipocromía (HCM <27 pg), hemoglobina A2 mayor de 3.5% y fetal en los niveles de 0.1 a 7%, puede ser un portador de talasemia beta; se hace el análisis para las diferentes mutaciones y se identifica como portador. No obstante, si, con las mismas características, la hemoglobina A2 es menor al 3.5%, o sea es baja o normal, se deben hacer estudios de la cinética de hierro para identificar si hay deficiencia, hacer la corrección y volver a estudiar. Si el hierro es normal se hace un análisis de los genes alfa globina y se pueden identificar aquí los portadores de talasemia alfa; pero, puede ser que sean portadores de talasemia alfa y portadores de talasemia beta. Es decir, hay una condición en la que hay talasemia beta con hemoglobina A2 normal. Además, si los valores de hemoglobina fetal están elevados (A2 normal y valores de hemoglobina fetal entre 2 y 30%), es necesario cuantificar muy bien la

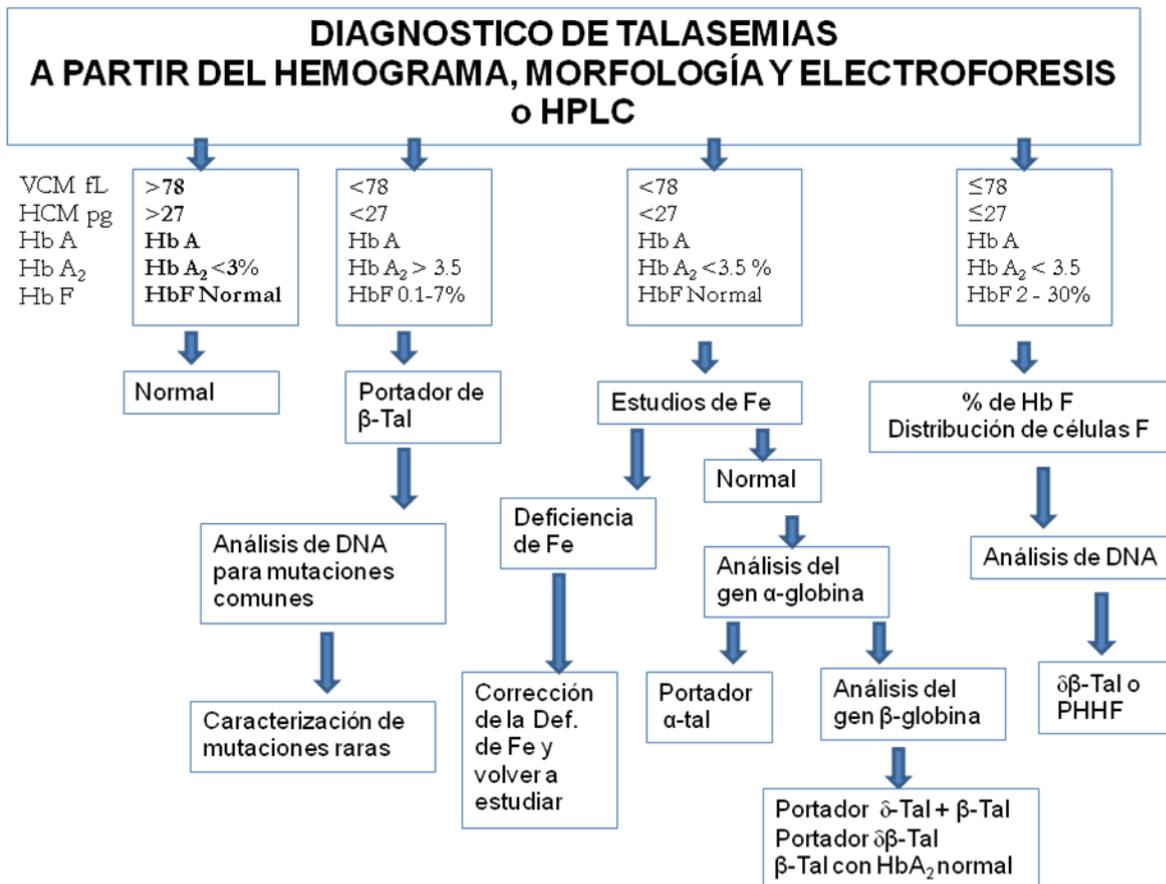
hemoglobina fetal, ver la distribución de las células fetales y hacer un análisis de ADN para definir el tipo de mutación para definir si se trata de una delta-beta talasemia o persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal.

Para la identificación de variantes comunes como la hemoglobina S, podemos partir de la observación de dos bandas, A y S, entonces, hay que realizar las pruebas de solubilidad (Figura 2). Si da positivo puede ser un heterocigoto para hemoglobina S o puede ser una combinación de hemoglobina S con talasemia beta+. Es muy importante hacer esta diferenciación entre la talasemia beta de tipo mas, porque hay una banda de hemoglobina A y las de tipo cero, solo se ve una banda de hemoglobina S. En el caso negativo hay que realizar electroforesis en agarosa a pH ácido, evaluar los índices de glóbulos rojos y buscar si la banda o pico con movilidad de hemoglobina S, que puede ser otra variante como la hemoglobina lepore, D o G. Se deben realizar pruebas confirmatorias, por estudios de biología molecular.

En la figura 3 se observa lo que discutimos también sobre, si solo se ve una banda anormal con movilidad de hemoglobina S, y un poco de hemoglobina fetal, entonces, nuevamente se hace la prueba de solubilidad. Si es positivo hay que confirmar que se trate solo de hemoglobina S con la electroforesis ácida, por esta prueba se pueden encontrar dos bandas y, en ese caso, hay que diferenciar si se trata de un portador de hemoglobina D, lepore o alguna otra variante; si solo se ve una banda, también se debe hacer un diagnóstico diferencial con talasemia beta, heterocigoto compuesto para hemoglobina S y talasemia beta. En el caso de una prueba de solubilidad negativa se tiene que investigar si se trata de un homocigoto

para hemoglobina D u otra variante que migre en esa posición, o heterocigoto compuesto en esa variante que puede ser D (la más común) con talasemia beta, y realizar pruebas confirmatorias.

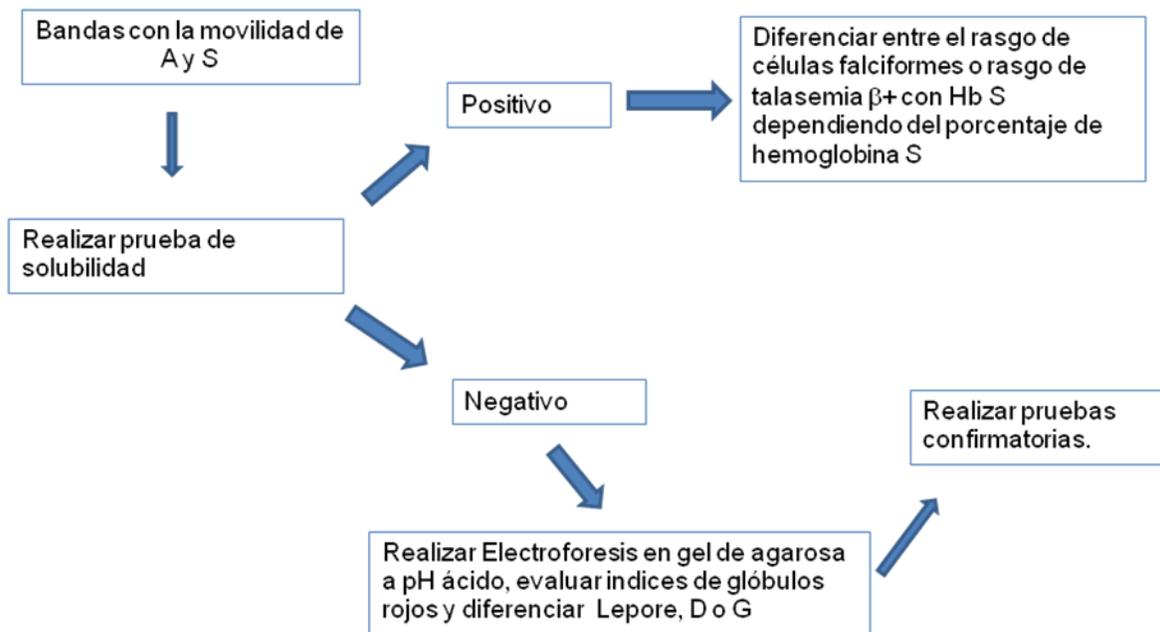
Este tipo de algoritmos hay que analizarlos muy bien pues nos van a ayudar a identificar estas patologías y de esta manera apoyar tanto a los médicos como a los pacientes para el manejo adecuado de la enfermedad.



Modificado de Clark BE, Thein SL. Clin Lab. Haemat 26:159 2004. Old JM. Scan J. Lab Invest 66:1 2006.

Figura 1. Flujograma para apoyar el diagnóstico de talasemias.

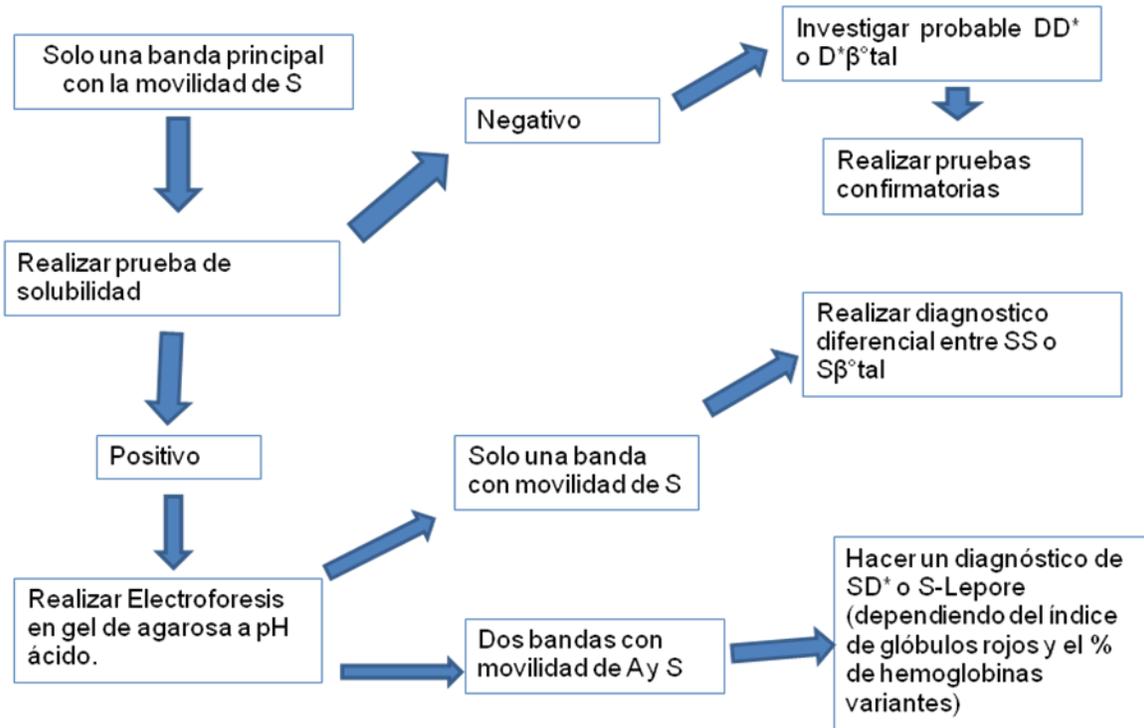
FLUJOGRAMA QUE MUESTRA ELECTROFORESIS o HPLC CON DOS BANDAS (O PICOS) DE HEMOGLOBINAS A y S



Modificado de "Variant Haemoglobins: A Guide to Identification. Barbara J. Bain; Barbara J. Wild; Adrian D. Stephens; Lorraine Phelan. Wiley-Blackwell. 2012."

Figura 2. Flujograma para apoyar el diagnóstico de variantes de la hemoglobina con movilidad electroforética similar a la de la hemoglobina S.

FLUJOGRAMA QUE MUESTRA ELECTROFORESIS CON UNA SOLA BANDA PRINCIPAL CON LA MOVILIDAD DE HEMOGLOBINA S



Modificado de " Variant Haemoglobins: A Guide to Identification. Barbara J. Bain; Barbara J. Wild; Adrian D. Stephens; Lorraine Phelan. Wiley-Blackwell. 2012."

Figura 3. Flujograma para apoyar el diagnóstico de anemia drepanocítica.

Bibliografía de consulta.

1. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haematol 26:159-76, 2004
2. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest 67: 71–86, 2007.
3. Steinberg MH. Pathophysiology of hemoglobin and its disorders in: Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Steinberg M, Forget B, Higgs DR, Weatherall DJ Eds. Cambridge Med, 2nd edition, 2009.

4. Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection & characterization. Indian J Med Res 134:538-46, 2011
5. <http://www.globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter.2013.01.07>

La Dra. en C. Bertha Ibarra Cortés, está en la División de Genética, del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, perteneciente al Centro Médico Nacional Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Guadalajara, Jalisco, México.