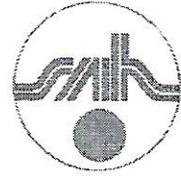


# Detección e identificación de hemoglobinopatías

Beatriz Erramouspe,  
Beatriz Iparraguirre



ACTUALIZACIÓN  
EN  
LABORATORIO

Sección Hematología, Hospital Francés

HEMATOLOGIA, Vol. 4 N° 3: 125-129  
Setiembre-Diciembre, 2000

## INTRODUCCION

Las hemoglobinas (Hbs) son tetrámeros compuestos por dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas no  $\alpha$ . Las Hbs normales del adulto son: A ( $\alpha_2 \beta_2$ ), A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ) y F ( $\alpha_2 \gamma_2$ ).

Como las cadenas  $\alpha$  son comunes para las Hbs fetales y adultas, las anomalías que alteran la síntesis o estructura de dichas cadenas pueden afectar tanto al feto como al adulto, mientras que las alteraciones de las cadenas  $\beta$  sólo se evidencian después de varios meses de vida, coincidiendo con la disminución de síntesis de cadenas  $\gamma$ . La síntesis de cadenas  $\delta$  comienza al final del segundo trimestre de gestación y alcanza su proporción normal al año de vida. La Hb A constituye la casi totalidad de la Hb adulta normal, mientras que las Hbs F y A<sub>2</sub> están presentes en pequeña proporción, por lo que los trastornos que afectan la síntesis de cadenas  $\delta$  y  $\gamma$  tienen escasa repercusión en el adulto.

Las cadenas de globina están codificadas por 2 genes  $\alpha$  ( $\alpha_2, \alpha_1$ ), un gen  $\beta$ , un gen  $\delta$  y 2 genes  $\gamma$  ( $\gamma^A, \gamma^G$ ).

Las alteraciones de los genes de globina pueden ser por **deleción** o por **mutación**. Los cuadros clínicos pueden corresponder a **síndromes talasémicos** (síntesis disminuída de alguna cadena de globina estructuralmente normal), **hemoglobinopatías propiamente dichas** (alteración de la estructura primaria de alguna cadena de globina) o **hemoglobinopatías talasémicas** (síntesis disminuída de alguna cadena de globina estructuralmente anormal). Hay más de 400 variantes estructurales descritas, siendo las más frecuentes S, E, C y D.

Los **síndromes talasémicos** figuran entre los trastornos hereditarios más comunes y aunque, preva-

lecen en poblaciones de la cuenca del Mediterráneo, del SE asiático y Africa, pueden encontrarse en diferentes grupos poblacionales. En nuestro país constituyen la forma más frecuente de hemoglobinopatías, lo cual se explica teniendo en cuenta el alto aporte inmigratorio de países de la cuenca del Mediterráneo.

Para el estudio de las hemoglobinopatías se deben tener en cuenta :

### 1) Criterios generales:

- Noción de frecuencia y manifestaciones atípicas de una patología frecuente.
- Estudio simultáneo del paciente, su familia y un control normal.
- Evitar el estudio de un paciente transfundido.

### 2) Datos clínicos:

- Procedencia geográfica del paciente y sus antecesoros.
- Miembros afectados en una familia y patrón de herencia.
- Evidencia de hemólisis.
- Incremento de la hemólisis o de la anemia por infecciones intercurrentes o drogas oxidantes.
- Crisis dolorosas abdominales, óseas, esplenomegalia, litiasis vesicular, cianosis, poliglobulia.

### 3) Valores e índices hematimétricos y morfología de hematíes.

### 4) Pruebas específicas.

## A) SINDROMES TALASEMICOS

Aproximadamente un 3% de la población mundial es portadora de  $\beta$  talasemia. Se caracteriza por una síntesis reducida ( $\beta^+$ ) o ausente ( $\beta^0$ ) de las cadenas de

$\beta$  globina. Los portadores heterocigotas (talasemia menor) presentan una anemia leve o ausente, VCM bajo, morfología eritrocitaria característica (hipocromía, microcitosis, punteado basófilo, dianocitos) y patrón de hierro normal. Los homoci-gotas o doble heterocigotas (talasemia mayor) presentan una anemia severa dependiente de transfusión y con sobrecarga de hierro.

- 1) Electroforesis de Hb en acetato de celulosa  
buffer TEB, pH 8.4 - 8.9  
coloracion: Ponceau S.
- 2) Electroforesis de Hb en acetato de celulosa  
buffer fosfato 0,1M pH 7.0
- 3) Cuantificación de Hb A<sub>2</sub>.
- 4) Cuantificación de Hb F.
- 5) Distribución intracelular de la Hb F.
- 6) Cuerpos de Heinz.
- 7) Resistencia osmótica de los hematíes.
- 8) Perfil de hierro.
- 9) Velocidad de síntesis de cadenas.
- 10) Estudio molecular de los genes de globina para identificación de la mutación.

#### Electroforesis de Hb en acetato de celulosa

A pH alcalino buffer TEB pH 8.4-8.9 muestra la proporción de Hb A<sub>2</sub> y detecta la presencia de hemoglobinopatías talasémicas (Hbs Lepore, E, Constant Spring, etc.).

La electroforesis en buffer fosfato pH 7.0 permite diferenciar Hb H y Hb Bart's de otras Hbs rápidas que migran en forma similar a pH alcalino.

#### Cuantificación de Hb A<sub>2</sub>

*Elución de la fracción electroforética y cuantificación por espectrofotometría.* La cuantificación de A<sub>2</sub> por densitometría no es recomendada por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH).

*Columnas de DEAE celulosa:* es una resina de intercambio aniónico con diferente absorción de las Hbs A y A<sub>2</sub>, lo que permite eluir las, separarlas y cuantificarlas con un buffer de pH adecuado.

#### Cuantificación de Hb F

*Desnaturalización alcalina.* Se basa en la mayor resistencia de la Hb F a la desnaturalización alcalina comparada con otras hemoglobinas.

*Técnica de Singer.* Técnica de desnaturalización alcalina de 1 minuto con NaOH 0.083M y neutralización con solución a media saturación de sulfato de amonio. Es una técnica simple y rápida pero sobrestima valores bajos de Hb F. Valor normal: hasta 2%.

*Técnica de Betke.* Convierte el hemolizado en cianmetahemoglobina, aumenta el tiempo de desnaturalización con NaOH 1.2N a 2 minutos y neutraliza con solución saturada de sulfato de amonio. Es el método de rutina para valores bajos de Hb F (menores de 10%). Valor normal: hasta 1%.

*Cromatografía* (intercambio catiónico en HPLC): es el método de referencia.

#### Distribución intracelular de Hb F por elución ácida (Kleihauer)

Fue diseñada para detectar eritrocitos fetales en sangre materna luego de una hemorragia transplacentaria. Se basa en la elución diferencial de las Hbs F y A de células fijadas con etanol 80% e incubadas en buffer citrico-fosfato a pH 3.4 - 3.1. La Hb F es más resistente a la elución, permaneciendo en el eritrocito.

La distribución intracelular ha sido usada para diferenciar  $\delta\beta$  talasemia heterocigota, con una distribución heterocelular, de PHHF (persistencia hereditaria de Hb F), pancelular.

#### Cuerpos de Heinz

Estos cuerpos de inclusión se encuentran en portadores de  $\alpha$  talasemia (Hb H, Hb Bart's, etc. en forma de mórula) y en individuos esplenectomizados (únicos periféricos).

*Técnica:* Dos partes de sangre y una de azul brillante de cresilo al 1% en solución fisiológica se incuban a 37°C entre 30 minutos y 2 horas. Pueden ser detectados en precursores nucleados de médula ósea por la misma técnica. En  $\alpha$  talasemia 1/100-10000 hematíes contienen cuerpos de inclusión.

#### Resistencia osmótica de los hematíes

Esta prueba estudia la resistencia de los hematíes a la lisis en soluciones hipotónicas. Depende de la relación superficie/volumen. En talasemias hay un aumento de la resistencia osmótica por disminución de volumen y es útil la determinación de RO a 0.40g/l ClNa (Valor normal: 50-95%) como prueba de orientación.

#### Estudio molecular de los genes de globina

El diagnóstico de talasemia puede ser completado o confirmado con el estudio molecular del gen de globina.

- 1) *Oligonucleótido Especifico de Alelo (ASO):* hibridización del oligonucleótido normal y/o mutado aplicado sobre el producto de amplifica-

ción por PCR (reacción en cadena con polimerasa) del gen de  $\beta$  globina.

- 2) **Enzimas restrictivas:** aplicación al producto de amplificación por PCR del gen de  $\beta$  globina de endonucleasas restrictivas con ulterior electroforesis y coloración con bromuro de etidio.
- 3) **D.G.G.E (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis):** se realiza electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante de urea de homo y heterodímeros obtenidos por desnaturalización del producto de amplificación del gen de  $\beta$  globina por PCR. Se agregan clamps químicos para estabilizar covalentemente los productos de PCR doble cadena por simple irradiación ultravioleta. Es una técnica de screening.
- 4) **S.S.C.P. (Single Strand Conformation Polymorphism):** cualquier alteración de la secuencia nucleotídica determina una modificación de la conformación de la molécula de cadena simple (obtenido por amplificación por PCR y desnaturalización) causando un cambio de la movilidad electroforética. Es una técnica de screening.
- 5) **Southern Blot.**
- 6) **Secuenciación.**

#### B) SINDROMES CON Hb S, C, D, E, G

- 1) Electroforesis de Hb en acetato de celulosa, buffer TEB, pH 8.4 - 8.9.
- 2) Cuantificación de Hb A<sub>2</sub>.
- 3) Drepanocitos.
- 4) Solubilidad de la Hb.
- 5) Cuantificación de la Hb anormal
- 6) Cuantificación de Hb F (desnaturalización alcalina).
- 7) Electroforesis en gel de agar, buffer citrato, pH 6.0 - 6.5
- 8) Separación de cadenas de globina, electroforesis en acetato de celulosa de hemolizados tratados con urea y  $\beta$  mercaptoetanol, buffer TEB -urea  $\beta$  mercaptoetanol, pH 8.9
- 9) Digestión trípica con separación de péptidos en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa.
- 10) Estudio molecular para identificación de la mutación.

#### Electroforesis de Hb en acetato de celulosa buffer TEB pH 8.4-8.9

Permite separar Hbs con diferente movilidad electroforética. No permite separar Hb S de D ni C de E. La cuantificación de la Hb anormal se realiza por elución y/o cromatografía en columna de DEAE celulosa y DEAE-Sephadex incluyendo cuantifi-

cación de Hb A<sub>2</sub> por la posibilidad de tratarse de un doble heterocigota para hemoglobinopatía estructural y  $\beta$  talasemia.

#### Drepanocitos

La inducción de drepanocitos con metabisulfito de sodio al 1% es indispensable para el diagnóstico de un síndrome drepanocítico. Se basa en la propiedad de la Hb S de polimerizar en condiciones de deoxigenación, deformando al eritrocito que adquiere la forma característica de hoz (falciformación).

Se coloca un gota de sangre y una de solución fresca de metabisulfito de sodio al 2% entre porta y cubre sellando los bordes. Se deja a temperatura ambiente unos 30 minutos y se observa al microscopio.

#### Solubilidad de la Hb

A altas concentraciones de buffer fosfato y en medio reductor (ditiotionito de sodio) la deoxihemoglobina S permanece insoluble y forma cristales tactoides produciendo turbidez.

#### Electroforesis de Hb en gel de agar buffer citrato pH 6.0-6.5

Es un complemento de la electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino, permitiendo separar Hbs S de D, C de E y S de G. En este método un factor importante de la movilidad electroforética es la solubilidad de la Hb. La Hb F, al ser más soluble, es también la más rápida. La Hb A corre detrás y bien separada de la Hb F.

#### Separación de cadenas de globina

La electroforesis de hemolizados tratados con urea y  $\beta$ -mercaptoetanol en acetato de celulosa (buffer TEB, urea -  $\beta$  mercaptoetanol pH 8.9) separa cadenas de  $\alpha$  y  $\beta$  globina. Si hay una mutación se desdobra la cadena a la cual pertenece. Ejemplo: en Hb S aparecen dos bandas,  $\beta^S$  y  $\beta^A$ , con distinta movilidad.

Se utiliza para determinar si se trata de una variante de cadena  $\alpha$  o de cadena  $\beta$ .

#### C) HEMOGLOBINAS INESTABLES

Mutaciones localizadas cerca o dentro del bolsillo del hem o sustituciones por prolina en segmentos helicoidales distorsionan la molécula de Hb. Las Hbs inestables son variantes estructurales de Hb que sufren desnaturalización dentro del eritrocito y pre-

cipitan formando inclusiones insolubles que son los cuerpos de Heinz.

La mayoría de las variantes no van acompañadas de cambios en la carga eléctrica de la molécula y por lo tanto no pueden ser detectadas por electroforesis en acetato de celulosa pH: 8.4 - 8.9

- 1) Cuerpos de Heinz.
- 2) Electroforesis de Hb en acetato de celulosa pH 8.4 - 8.9.
- 3) Pruebas de estabilidad de la Hb.
  - a) calor (buffer tris/CIH 0.15M pH 7.4 50°C).
  - b) precipitación por isopropanol (Carrell y Kay, Br, J, Haemat. 23,625,1972).
  - c) precipitación por PCMB (Huisman, Adv. Clin. Chem. 15,149,1972).
- 4) Afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub> (P50).
- 5) Separación de cadenas de globina.
- 6) Identificación de la mutación.

#### Cuerpos de Heinz

Representan el estado final de la degradación oxidativa de la hemoglobina. Se observan luego de la incubación con azul brillante de cresilo al 1% entre 2-24 hs. Para la observación en 24 hs se los incubaba en condiciones estériles a 37°C grados. Se encuentran en mayor proporción luego de la esplenectomía.

#### Estabilidad térmica

Debe practicarse con hemolizados frescos y procesando paralelamente un control normal. Consiste en incubar un hemolizado (aproximadamente al 1.0 %) durante 2 hs a 50°C buffer Tris-CIH 0.15 M pH 7.4. Es positiva sólo si aparece precipitado en el tubo problema. Es una prueba sensible pero poco específica. La temperatura y la concentración del hemolizado son críticos para evitar falsos positivos.

#### Precipitación con isopropanol (Carrell y Kay)

El isopropanol desestabiliza la molécula de Hb pero en las concentraciones que se utilizan en las pruebas es tolerada por la Hb normal. Es una prueba sensible y rápida.

El hemolizado debe ser preparado en el momento de usar con una concentración entre 7.0 y 10 g/dl. Lavar los hematies 3 veces con solución fisiológica. Hemolizar con agua destilada y con tetracloruro de carbono para eliminar estroma, centrifugar 10 minutos a 3000 rpm. y utilizar el sobrenadante.

En baño a 37°C colocar 2 tubos conteniendo 2 ml de isopropanol 17% en Tris-CIH 0.1M pH: 7.4 y equilibrar a 37°C. Agregar 0.2 ml de hemolizado fresco

al control y a la muestra. El control normal permanece claro mientras la presencia de hemoglobina inestable determina opalescencia entre 5-10 min. y formación de precipitados a los 20 min.

Precauciones: La concentración de isopropanol 17% y la temperatura de 37°C son críticas, el pH no debe caer por debajo de 7.2. El hemolizado debe ser fresco. La presencia de metahemoglobina puede dar falsos positivos. El tipo de anticoagulante no es crítico.

#### D) HEMOGLOBINAS M

Son variantes estructurales en las cuales el hierro se encuentra invariablemente en estado férrico y no puede ser reducido química ni enzimáticamente. Se han descrito 5 variantes, 3 de cadena β y 2 de cadena α. Se manifiestan por cianosis, en la mayoría de los casos sin anemia ni esplenomegalia.

Migran anormalmente a pH 7.1 y presentan un espectro de absorción que difiere de la metaHb A.

#### E) HEMOGLOBINAS CON AFINIDAD ALTERADA POR EL O<sub>2</sub>

Son variantes estructurales que por diferentes mutaciones determinan cambios en la afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub>. Las que tienen aumento de afinidad por el O<sub>2</sub> se manifiestan por eritrocitosis, mientras que las de baja afinidad presentan pseudoanemia o cianosis.

La electroforesis de Hb muestra banda anormal en menos de la mitad de los casos. El diagnóstico se basa en los exámenes funcionales de la curva de disociación de O<sub>2</sub> (P<sub>50</sub>) y en el estudio familiar.

#### CONCLUSIONES

Los métodos presentados en esta actualización sólo permiten orientar (salvo excepciones como la Hb S) el diagnóstico de una hemoglobinopatía estructural. La confirmación diagnóstica debe realizarse a través de una combinación de análisis que incluyen digestión tróptica con separación de péptidos en HPLC en fase reversa, análisis de los aminoácidos y secuenciamiento nucleotídico de ADN. Estos estudios están aún limitados a unos pocos laboratorios especializados.

El diagnóstico de un síndrome talasémico resulta de un conjunto de datos clínicos y de laboratorio, con especial énfasis en el estudio familiar, a fin de proceder al consejo genético y prevención de la talasemia mayor. El diagnóstico molecular se reserva solamente para cuadros de diagnóstico dudoso, estudios prenatales o epidemiológicos.

## SUMMARY

When a patient must be studied for a suspected hemoglobin abnormality, several approaches should be followed. The most important mean for establishing the relationship between a given abnormality and the clinical effect, assessing if the pathology is congenital, inherited, a "novo mutation" or even acquired, is a complete family study with a normal control, avoiding the workout of a transfused patient.

Through the clinical history the following information should be investigated: patient and ancestors geographical background, evidence of hyperhemolysis or increased hemolysis by oxidant drugs exposure or infection, antecedents of painful abdominal or bone crisis, splenomegaly, gallstones, cyanosis, erythrocytosis, etc.

Its recommended to conduct the following laboratory studies: 1) hematological evaluation with automated cell counter, careful observation of the red cell morphology and

reticulocyte count, 2) electrophoretic analysis, 3) quantification of Hb A<sub>2</sub>, 4) detection of Hb S and 5) detection of unstable hemoglobin variants.

**Key words:** Hemoglobinopathies, Laboratory diagnosis

## BIBLIOGRAFIA

- Weatherall DJ. The Thalassemias. **Methods in Hematology** 1983; 6: 1-13.
- Huisman THJ. The Hemoglobinopathies. **Baillière's Clinical Haematology** 1993; 6: 1.
- Huisman THJ, Carver MFH and Baysal E. A Syllabus of Thalassemia Mutations. 1997 **The Sickle Cell Anemia Foundation**, Augusta, GA, USA, 1997.
- Higgs DR. The Hemoglobinopathies. **Baillière's Clinical Haematology** 1993; 6: 117.