



MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico

Hemoglobinas por Electroforesis Capilar. Resultados obtenidos del estudio de 6.268 muestras (mayo 2007-abril 2008)

 20 min.



La automatización en hematología empleada en el laboratorio clínico, puso en evidencia las alteraciones de los índices hematimétricos. El histograma revela con mayor frecuencia, microcitosis e hipocromía y otro tipo de alteraciones, corroborado por el examen microscópico del frotis de sangre periférica. Esto se tradujo en un aumento de las solicitudes de estudios de la Hb por electroforesis. El objetivo de este trabajo es demostrar la cantidad de alteraciones cualitativas y cuantitativas observadas en muestras estudiadas por electroforesis capilar (EC) desde de mayo de 2007 a abril de 2008 en Laboratorio Génesis-MANLAB. La electroforesis capilar es un método que permite una mejor separación de las diferentes Hb anómalas (más que la HPLC), además cuantifica las fracciones con exactitud. Es el

único método que permite la separación de las Hb C y Hb E, de la Hb A₂.



Osatinsky, Raquel*; Aguet, María N***; Valdata, Claudio**;
Mussini María V***

* Jefa Área Proteínas, Hemoglobinas
Prof. Asociada al Dpto. de Biología, U. A. J. F. Kennedy

** Director Técnico

*** Bioquímicas

Génesis – MANLAB

Marcelo T. de Alvear 2362, CABA



E-mail:

raquel.osatinsky@genesis-manlab.com.ar



Introducción

La molécula de hemoglobina (Hb) está formada por dos pares de cadenas de

globina, unidas cada una de ellas a un grupo Hem. Es un tetrámero de 64,5 Kd. constituido por dos pares de cadenas (alfa, beta, gamma o delta). La unión del grupo Hem dentro del bolsillo de la estructura molecular en cada cadena de globina es vital para la capacidad de transporte del oxígeno, estabilizando a la molécula de Hb.

En el adulto se encuentra la Hb A (adulta normal constituida por dos cadenas alfa y dos cadenas beta: $\alpha_2 - \beta_2$) la Hb F (fetal: $\alpha_2 - \gamma_2$) y la Hb A₂ ($\alpha_2 - \delta_2$) La síntesis de las cadenas alfa está dirigida por dos pares de genes alfa: α_1 y α_2 , en el cromosoma 16. La síntesis de las cadenas β y δ está dirigida por genes únicos β y δ , en el cromosoma 11. La síntesis de la cadena γ está dirigida por dos genes: G y A, también en el cromosoma 11.

Existen variantes de Hb genéticamente determinadas que ocurren en forma natural (se conocen más de 750). La



Para nosotros **lo más importante** es mantener altos niveles de **calidad** en la inyección y el moldeo, lo cual nos hace uno de los mejores proveedores en **Tubos de Extracción de Sangre** en cualquiera de los siguientes materiales y características: DE POLIPROPILENO, DE PMMA, DE POLIESTIRENO, CON TAPONES RÍGIDOS Y PERFORABLES.

Además le ofrecemos la mayor variedad existente en **insumos para su empresa de salud**. No dude en consultarnos y verá que tenemos el mejor precio, calidad y servicio del mercado.

**Siempre, siempre...
el mejor servicio y la mejor calidad**

Av. Scalabrini Ortiz 127 - C. A. B.A.
Tel.: (011) 4854-0749 / 7337 (Líneas rotativas)
Cel.: 15-4429-0822 ventas@insumosbiomedicos.com

mayoría no sintomáticas, otras con síntomas y signos clínicos que varían de manifestaciones mínimas a muy severas, algunas incompatibles con la vida. Todos los síndromes clínicos que se presentan por alteraciones de la síntesis de la Hb, se conocen como hemoglobinopatías.

Las hemoglobinopatías constituyen un desorden hereditario monogénico autosómico recesivo. La mayoría son portadores heterocigotas asintomáticos o con sintomatología muy leve. Las más conocidas son las alfa y beta talasemias (anormalidades cuantitativas, por alteración de la síntesis de las cadenas de la globina). Pueden presentarse asociadas a otras hemoglobinas anómalas (S, D, D, Lepore y otras denominadas estructurales y/o cualitativas, por el cambio de un aminoácido por otro en una de las cadenas de la globina).

La talasemia constituye un defecto genético caracterizado por una producción cuantitativamente baja y/o nula de una o más cadenas de globina. Puede afectar a cualquiera de las cuatro cadenas (α , β , δ , ϵ), o en algunos pacientes, a una combinación de cadenas α , β . Nunca se afectan las cadenas γ y simultáneamente. Estas alteraciones producen un desbalance en la síntesis de las cadenas de globina y una inadecuada producción de eritrocitos.

La automatización en hematología empleada en el laboratorio clínico, puso en evidencia las alteraciones de los índices hematimétricos. El histograma revela con mayor frecuencia, microcitosis e hipo-

cromía y otro tipo de alteraciones, corroborado por el examen microscópico del frotis de sangre periférica. Esto se tradujo en un aumento de las solicitudes de estudios de la Hb por electroforesis.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es demostrar la cantidad de alteraciones cualitativas y cuantitativas observadas en muestras estudiadas por electroforesis capilar (EC) en nuestro laboratorio, de mayo de 2007 a abril de 2008. La EC es un método que permite una mejor separación de las diferentes Hb anómalas (más que la HPLC), además cuantifica las fracciones con exactitud. Es el único método que permite la separación de las Hb C y Hb E, de la HbA2.

Las muestras estudiadas son sesgadas por cuanto son derivadas de otro laboratorio por solicitud médica, al presentar alterados el hemograma y frotis de sangre periférica, además del examen clínico realizado por el médico solicitante. O simplemente, son pacientes asintomáticos levemente anémicos y que no responden al tratamiento con hierro.

Consideramos que los resultados obtenidos son significativos, expresan la probable existencia de heterocigotas asintomáticas para alfa y beta talasemia y/o hemoglobinopatías asociadas a ellas, en pacientes adultos no diagnosticados.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 6.268 muestras de

sangre total extraída con EDTA, remitida a un laboratorio de derivación especializado. Las mismas fueron procesadas dentro de las 24 hs de recibidas en un Capillarys 2 Sebia con reactivo alcalino. Se emplearon calibradores y controles de calidad para las Hb A, Hb A₂ y Hb patológicas. La EC se realizó de acuerdo a las instrucciones establecidas en el instructivo del equipo.

Se emplea sangre total, separando el plasma por decantación; la solución hemolizante se coloca en el rack portatubos (donde van los tubos primarios con su código de identificación), al que se le agrega un fragmento dilutor, para diluir la muestra que será tomada por los capilares para el fraccionamiento electroforético. Todo este proceso es totalmente automatizado.

La separación electroforética se realiza en 4 minutos y la migración de las variantes de Hb se visualizan en la pantalla del monitor, que presenta 15 zonas bien definidas para la correcta identificación electroforética de las distintas variantes de Hb. Como el Capillarys 2 de Sebia tiene 8 capilares, se pueden estudiar 7 muestras diferentes (el 1º tubo del rack contiene la solución hemolizante) en forma simultánea. El resultado es cuantitativo, la sensibilidad es tal que se detecta hasta un 0.1% de Hb F, por dar un ejemplo.

Los valores de referencia (VR) para Hb A₂ es de 2.00 a 3.5%, el de Hb F menor de 2%.

Resultados y Discusión

Sobre un N= 6.268 no se observaron

Simposio de Medicina Genómica y Farmacología GENESIS -MANLAB presentará el INFINITI, único equipo con tecnología de microarrays diseñado para Diagnóstico



Este año, Génesis-MANLAB, liderando el camino hacia una Medicina Personalizada, incorpora un nuevo equipo de Autogenomics.

Por eso, queremos anunciarles, que en abril de 2010 se hará un "Simposio de Medicina Personalizada y Farmacogenética" donde se presentarán las bases teóricas de ésta disciplina y su aplicación en las distintas áreas de la farmacología. También, se hará una presentación de esta tecnología innovadora en el campo de la Medicina Personalizada.

En dicho Simposio, contaremos con la presencia de oradores extranjeros con amplia experiencia en esta área de la medicina.

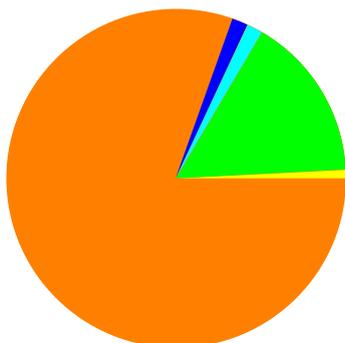
anormalidades en 5.107 (81.5%). Con Hb A₂ elevada N= 912 (14.6 %); con Hb F elevada N= 94 (1.5%), con Hb A₂ y Hb F elevadas N= 103 (1.6%) y con presencia de Hb anómalas (las estructurales) N= 52 (0.8%). (Ver Cuadro 1 y Gráfico 1).

Aún considerando el sesgo de las muestras, observamos que los resultados ponen en evidencia que nos encontramos con un alto porcentaje de pacientes con Hb A₂ elevada, es decir con una gran probabilidad de que sean portadores del Síndrome Talasémico.



Cuadro 1 y Gráfico 1

Hb	N=	%
No se observan bandas anómalas	5107	81.5
Hb anómala	52	0.8
Hb A ₂ aumentada	912	14.6
Hb Fetal aumentada	94	1.5
Hb A ₂ y Hb Fetal aumentadas	103	1.6
TOTAL	6268	



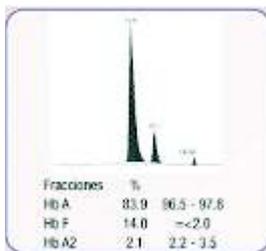
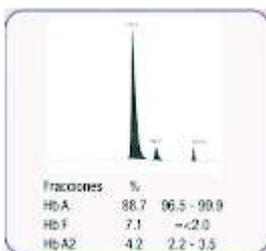
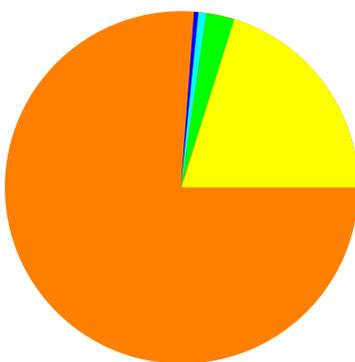
Analizando los porcentajes obtenidos de Hb F sobre el total de las muestras, se observa un N= 4.778 (76.1%) con valores menores de 0.2%, en el rango de 0.2 – 1.9% el N= 1.267 (20.2%). Es decir, que el mayor porcentaje de las muestras presentan VR normales. Sin embargo, en el rango de 2.0 – 4.9%, el N = 161 (2.6%) y en los valores de 5.0 – 10.0% el N= 42 (0.7%), el número de pacientes con Hb F elevada, considerando las edades de los mismos también es significativo. Si bien podemos suponer que la mayoría sean portadores talasémicos, se debe tener en cuenta que ciertos fármacos suelen provocar una elevación de Hb F. (Ver

Cuadro 2, Gráfico 2 y Figuras 1 y 2



Cuadro 2, Gráfico 2 y Figuras 1 y 2

Hb Fetales	N=	%
Menores a 0.2	4778	76.1
0.2 - 1.9	1267	20.2
0.2 - 1.9	161	2.6
0.2 - 1.9	42	0.7
Mayores a 10	26	0.4
TOTAL	6268	



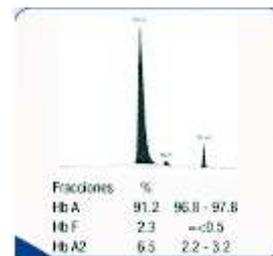
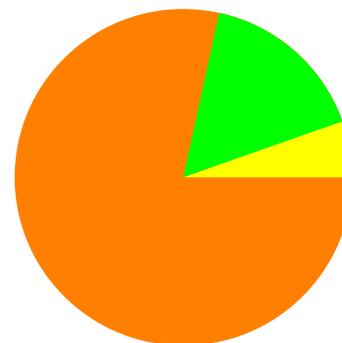
En los valores de la Hb A₂, consideramos tan solo tres rangos: los valores menores del 2%, N= 344 (5.5%), en los que se puede sospechar la posibilidad de ser portadores de alfa talasemias. Los que se encuentran entre 2.0 y 3.5%, cuyo N= 4.909 (78.3%) lo constituyen los pacientes con VR dentro de lo normal y los que presentan más del 3.5%, N= 1015 (16.2%),

cifra realmente importante que muestra la incidencia de portadores de beta talasemia. (Ver Cuadro 3, Gráfico 3 y Figura 3)



Cuadro 3, Gráfico 3 y Figura 3

Hb A ₂	N=	%
Menores a 0.2	344	5.5
Entre 2 - 3.5	4909	78.3
Mayores a 3.5	1015	16.2
TOTAL	6268	



La presencia de Hb anómalas, en la gran mayoría de los casos, fueron hallazgos de laboratorio. Pacientes a los que se les solicita una electroforesis de Hb porque son adultos, con anemia que generalmente no responden al tratamiento con hierro.

Si consideramos el N = 52 como si fuera un 100% (para expresarlo mejor en un gráfico), los resultados serían: Hb S N= 32 (61.5%), Hb Lepore N= 8 (15.4%), Hb C N= 4 (7.7%) y otras Hb, como variantes de Hb A y algunas no identificadas N= 8 (15.4%).

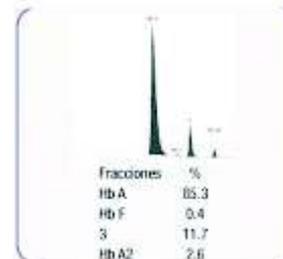
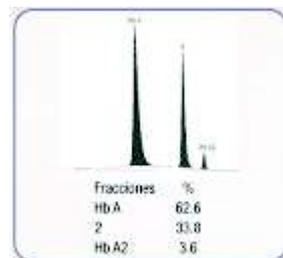
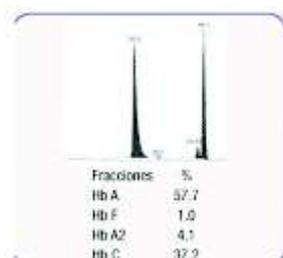
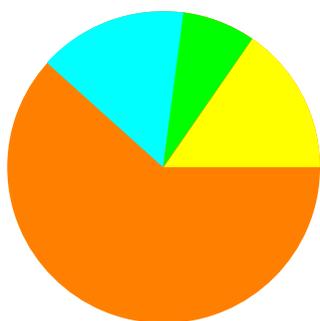
La presencia de Hb S es bastante frecuente así como la Hb Lepore, también la Hb C, en la mayoría de los casos se encuentran asociadas con elevaciones de Hb A₂ y también con elevaciones de Hb F, es decir que son dobles heterocigotas para

talasemia y la Hb estructural que acompañe. (Ver Cuadro 4, Gráfico 4 y Figuras 4,5 y 6)



Cuadro 4, Gráfico 4 y Figuras 4, 5 y 6.

Hb Anómalas	N=	%
Hb S	32	61.5
Hb Lepore	8	15.4
Hb C	4	7.7
Otras Hb	8	15.4
TOTAL	52	



Conclusiones

Observando los datos obtenidos y aún tratándose de muestras sesgadas, los resultados expresan la posibilidad de que una gran parte de la población sean portadores talasémicos y/o de tener alguna Hb anómala, con la implicancia que significa en el área de la salud.

Las muestras procesadas corresponden a individuos adolescentes, y jóvenes, entre 8 y 22 años; y a adultos, entre 35 y 80 años.

Tratándose de derivaciones de un laboratorio bioquímico a otro de mayor complejidad, no siempre es factible contar con datos clínicos y parámetros de laboratorio. Ante la presencia de datos alterados y/o presencia de Hb anómalas siempre es consultado el profesional derivante sobre los antecedentes de dichos pacientes. En la mayoría de los casos, refieren anemias crónicas sin diagnosticar,

$$S = P - E$$

S = Satisfacción
P = Percepción de la calidad
E = Expectativa previa

hacemos lo que nadie hace percepciones y expectativas

La satisfacción de un cliente es el resultado de las percepciones recibidas a lo largo de la recepción del servicio, menos las expectativas que el cliente tenía al entrar en contacto con la prestación del servicio.

Los laboratorios están para satisfacer a los pacientes.
A todos y siempre!

Ante un paciente ansioso, un médico que depende de un resultado... para tomar una decisión terapéutica.

MANLAB responde al 90%
de sus pedidos en **menos de 24hs.**

Tenemos pasión por la calidad.

Tenga todo, todos los días.



Los **bioquímicos**
saben mucho de fórmulas

en otros cuentan con antecedentes familiares que coinciden con los datos obtenidos por nuestro laboratorio.

Tener un 16.2% de Hb A₂ elevada por encima de los VR, es un dato para tener muy en cuenta. En un trabajo presentado en 2003, sobre estudios de Hb realizados a pacientes anémicos sin diagnóstico y efectuados sobre gel de agarosa, el resultado fue de un 13.8%. En ese mismo trabajo, el dato sobre Hb F mayor de 2% fue de 0.58% y empleando EC obtuvimos un 2,6%. Si bien es cierto que son dos poblaciones distintas, en ambos se trata de individuos del mismo rango etario y que presentan anemias, la mayoría sin diagnosticar. Debe señalarse que la EC es un método de alta sensibilidad, reproducibilidad, cuantitativo y totalmente automatizado, brindando de esta manera resultados seguros. Para el médico especialista, estos datos son de vital importancia porque contribuyen a un diagnóstico certero de la enfermedad.

Otro punto a destacar como conclusión de este trabajo son los valores menores del 2% de la Hb A₂. La bibliografía internacional hace hincapié en éste punto ya que considera que la alfa talasemia es más común y frecuente a nivel mundial, que la beta talasemia, pero como es silente o asintomática no presenta parámetros bioquímicos alterados. Los valores de Hb A₂ por debajo del 2% serían un llamado de atención para buscar una probable mutación en las cadenas alfa de la globina.

El diagnóstico de la misma debe realizarse por métodos de biología molecular, que en nuestro laboratorio se resuelven en el área correspondiente.

La confirmación de portadores de alfa y beta talasemia, que no puedan diagnosticarse clínicamente y con los estudios habituales de laboratorio cuentan actualmente con una herramienta como la biología molecular para llegar al diagnóstico definitivo de la enfermedad.

Bibliografía

- 1- Ryan Kate, et. al. 2010. Significant haemoglobinopathies: guidelines for diagnosis- BJH February
- 2- Thein SL 2000. Beta Thalassaemia. Fifth Congress of the European Haematology Association. Educational Book (Ed. AR Green) Birmingham p.132-137
- 3- Thien S.L. 2005. Pathophysiology of Thalassaemia- a Guide to Molecular therapies. American Society of Hematology- Hematology
- 4- Wild BJ, and Bain BJ. Dacie and Lewis Practical Haematology. 2006. Investigation of abnormal haemoglobins and thalassaemia -10th Ed. Churchill Livingstone- Elsevier- p.271-310
- 5- Osatinsky R, Joseph A. 2003. Incidencia de beta talasemia en una población de pacientes con anemia crónica. XVI Congreso Argentino de Hematología (Poster recomendado por el comité Científico Evaluador). Mar del Plata . Argentina, 31 de octubre- 3 de noviembre.
- 6- Muncie HL, Jr, and Campbell JS.- 2009.- Alpha and Beta Thalassaemia. Am.Fam. Phy. 80; 15; 339-344
- 7- Lukens JN, 2004- Abnormal hemoglobins- Wintrobe's clinical Hematology 11° Ed. p. 1247-1262
- 8- Premawarthena A, Fisher CA, Wheatherall DJ et al.- 2005 A novel molecular basis for beta thalassaemia intermedia poses new questions about it's pathophysiology. Blood 106(9): 3251-3255
- 9- Kazaxian HH and Boehem CD- 1988- Molecular basis and prenatal diagnosis of beta thalassaemia- Blood 72(4) 1107-1116
- 10- Marengo-Rowe AJ. 2007. The thalassemsias and related disorders. Proc(Bay)Univ.Med.Cent. 20; 27-31
- 11- Rund D and Fucharoen S. 2008. Genetic Modifiers in Hemoglobinopathies. Current Molecular Medicine 8; 600-608.
- 12- Rund D and Rachmilewitz E- 2005- Beta thalassaemia- NEngJMed. 353: 1115-46
- 13- Higgs DR, Thien SL, Wood WG. 2001- The molecular pathology of the thalassemsias- In Weatherall DJ ed. Blackwell Science- The thalassaemia syndromes 4th Ed Oxford England p. 133-91
- 14- Van Delft P, Lenters E, Giordano PC, et al.

2009. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic population.- Int.Jnl.Lab .Hem.-Blackwell Publishing
- 15- Hsiao Phin Joanna Voon and Jim Vadolas.- 2008.- Controlling -globin: a review of -globin expression and impact on - thalassaemia.- Haematologica 93 (12): 1868-1876
- 16- Tomé Alves R, Marchi Salvador D, Bonini Domingos CR, et al. 2000. Hemoglobinas AS/ Alfa talassemias- importancia diagnóstica. Rev Bras Hematol Hemoter 22(3)
- 17- Thien SL and Menzel S.- 2009 Discovering the genetics underlying fetal haemoglobin production in adults.- BJH 145 ; 455-467
- 18- Schechter Alan N.- Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Review. Blood 2008; 112: 3927-3938
- 19- Osatinsky R, Valdata C. 2008. Identificación de hemoglobinopatías por electroforesis capilar.- Revista Bioanálisis

