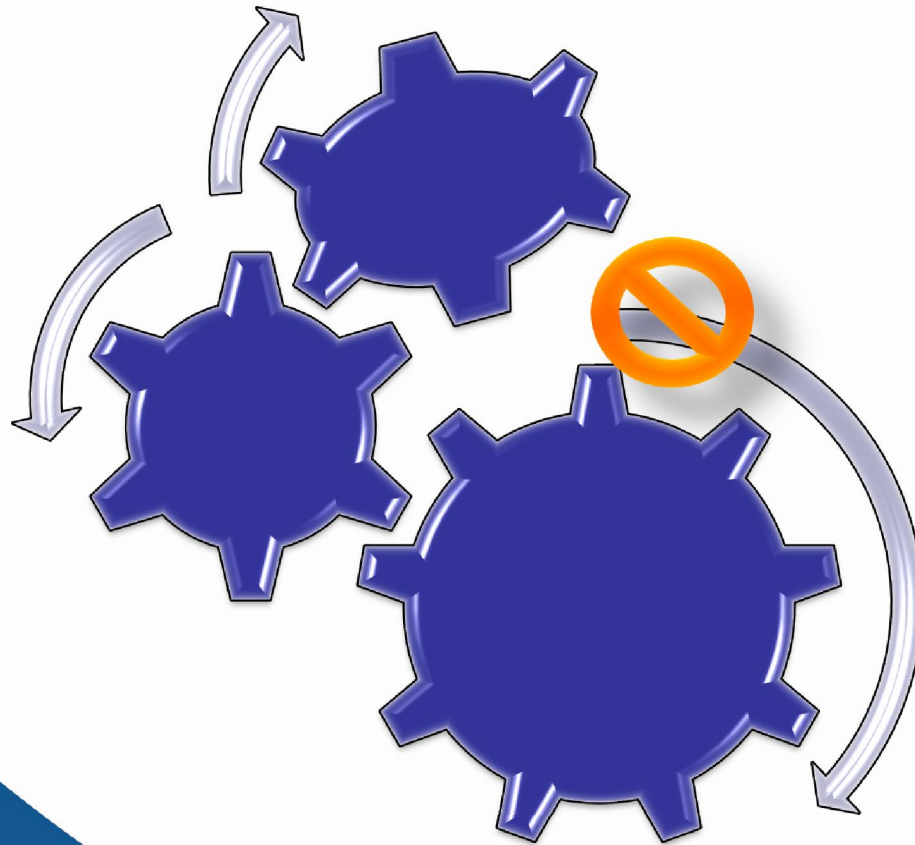


Diagnóstico de Hemoglobinopatías

Electroforesis Capilar
Sebia

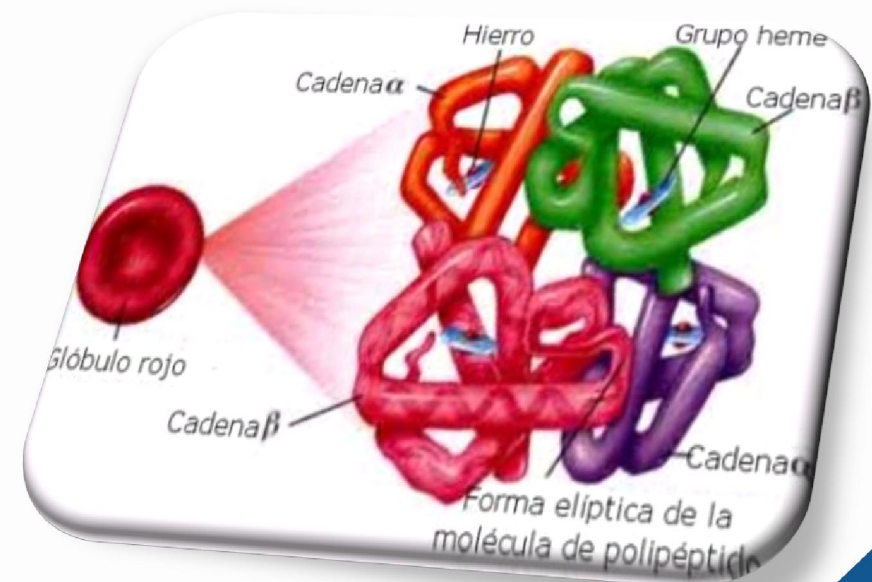


INTEGRIDAD DEL HEMATIE



Hemoglobina - Estructura

- Molécula compleja:
 - 4 cadenas polipéptidicas, idénticas 2 a 2. Cada una ligada al hemo, que es un núcleo tetrapirrólico (porfirina) ligado a un átomo de hierro.
 - Hemo común a todas las Hb.



Hemoglobina - Estructura

- La parte proteica responsable del tipo de hemoglobina se denomina globina, principalmente: α , β ,

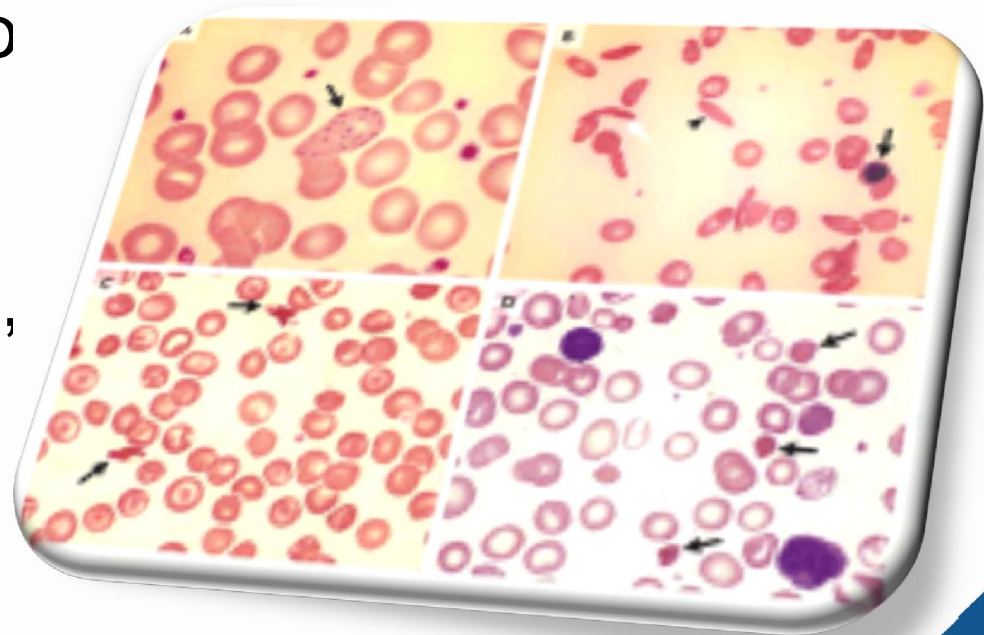
y δ .

- Normalmente:

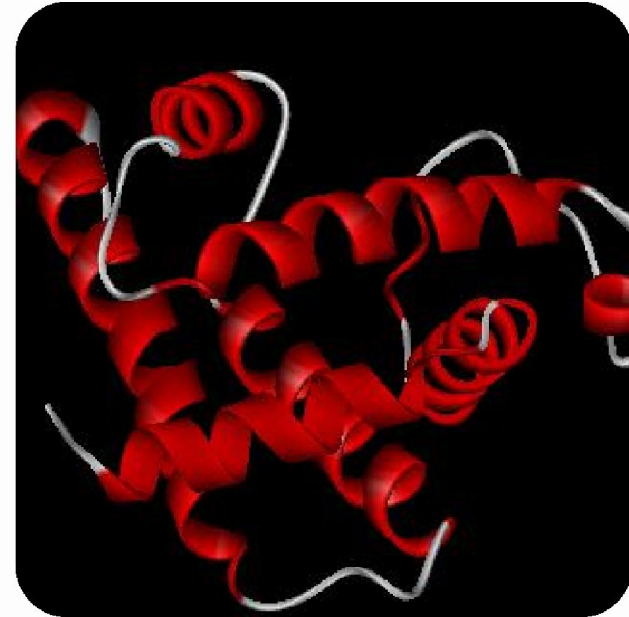
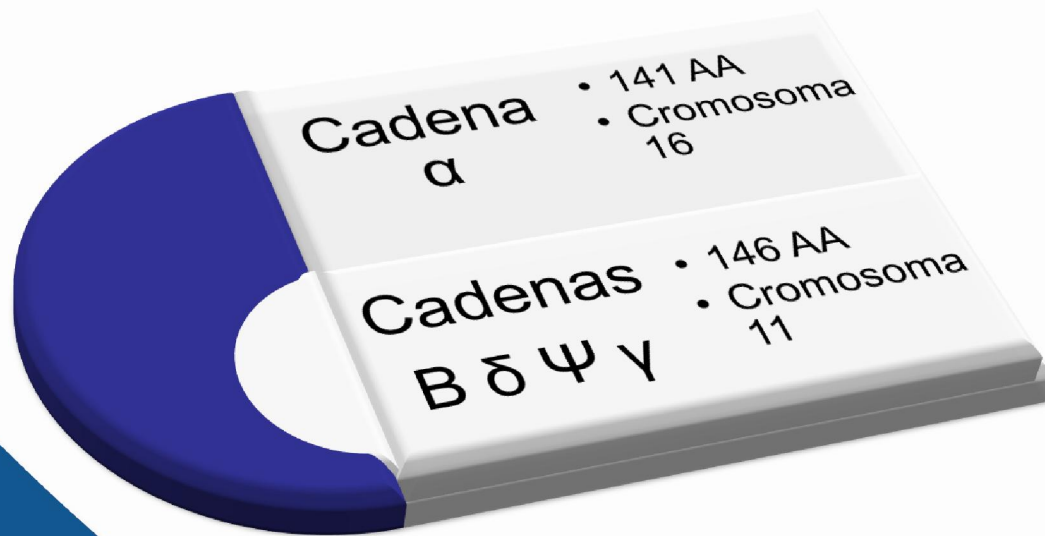
Hb A: $2\alpha 2\beta$

Hb A2: $2\alpha 2\delta$

Hb Fetal: $2\alpha 2\gamma$



HB: Composición y síntesis



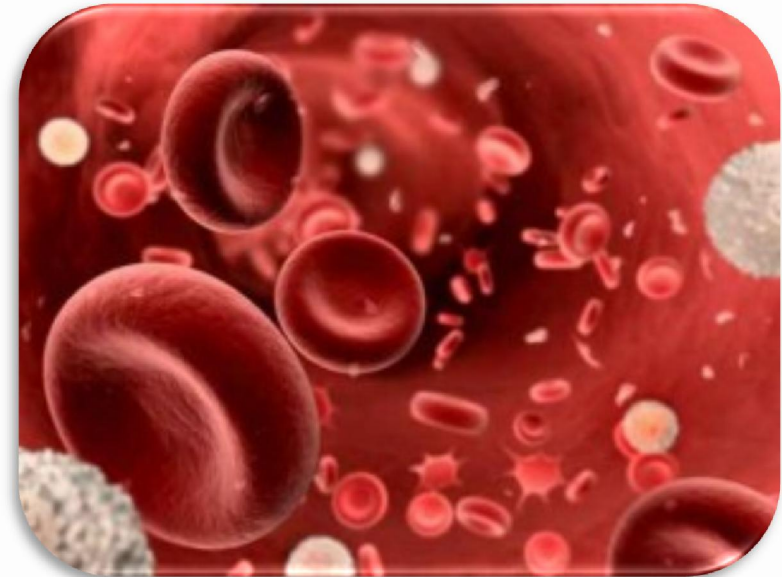
HB: Estructura Espacial

- Naturaleza y secuencia de aminoácidos que forman las cadenas.
- Uniones de los AA dan forma a la molécula, estabilidad y propiedades.

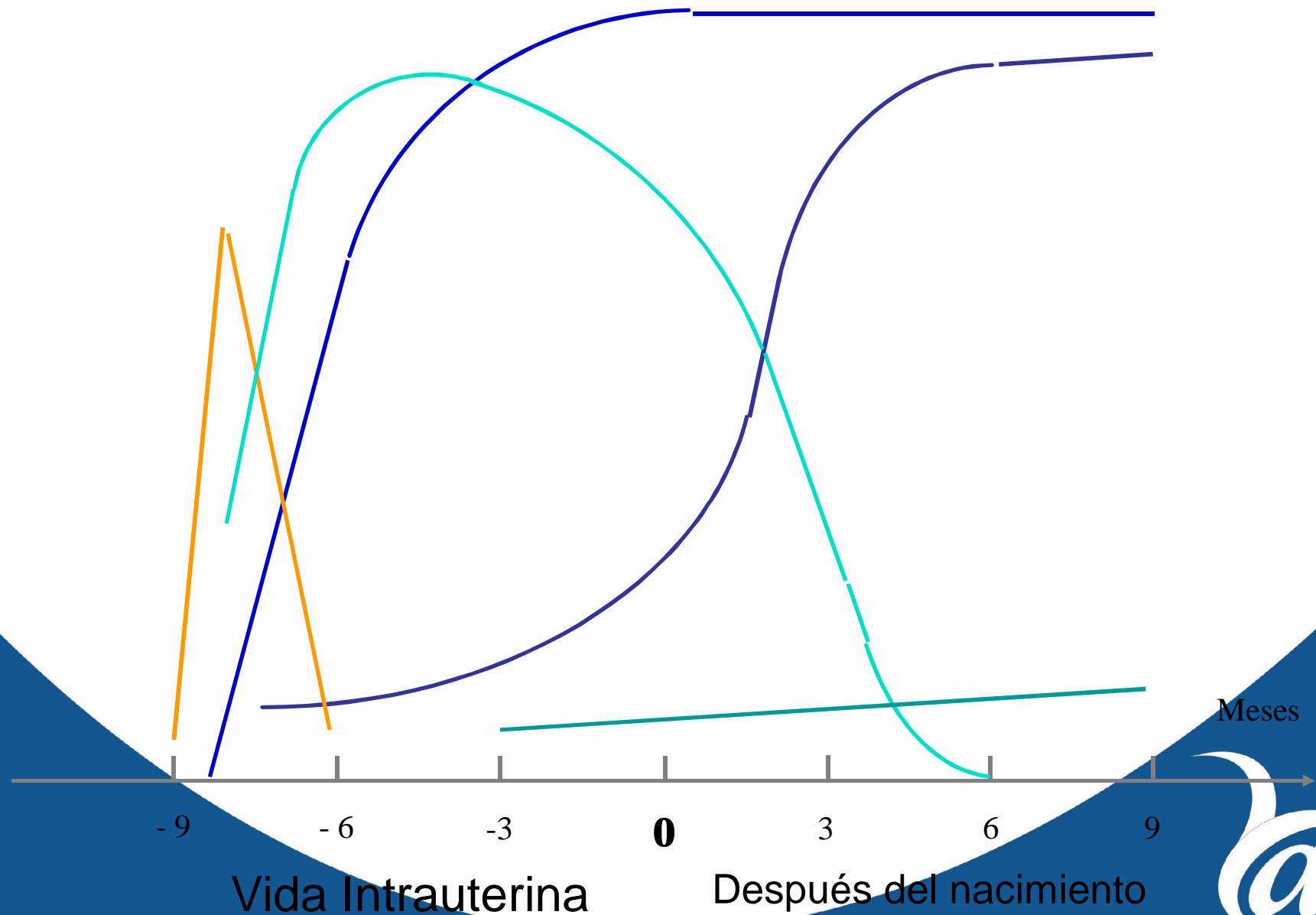


Propiedades Químicas y enzimáticas

- Unión con el oxígeno.
- Transporte de CO₂.
- Unión con CO₂:
carboxihemoglobina.
- Oxidación de Hb:
metahemoglobina.



SINTESIS DE LAS CADENAS DE GLOBINA



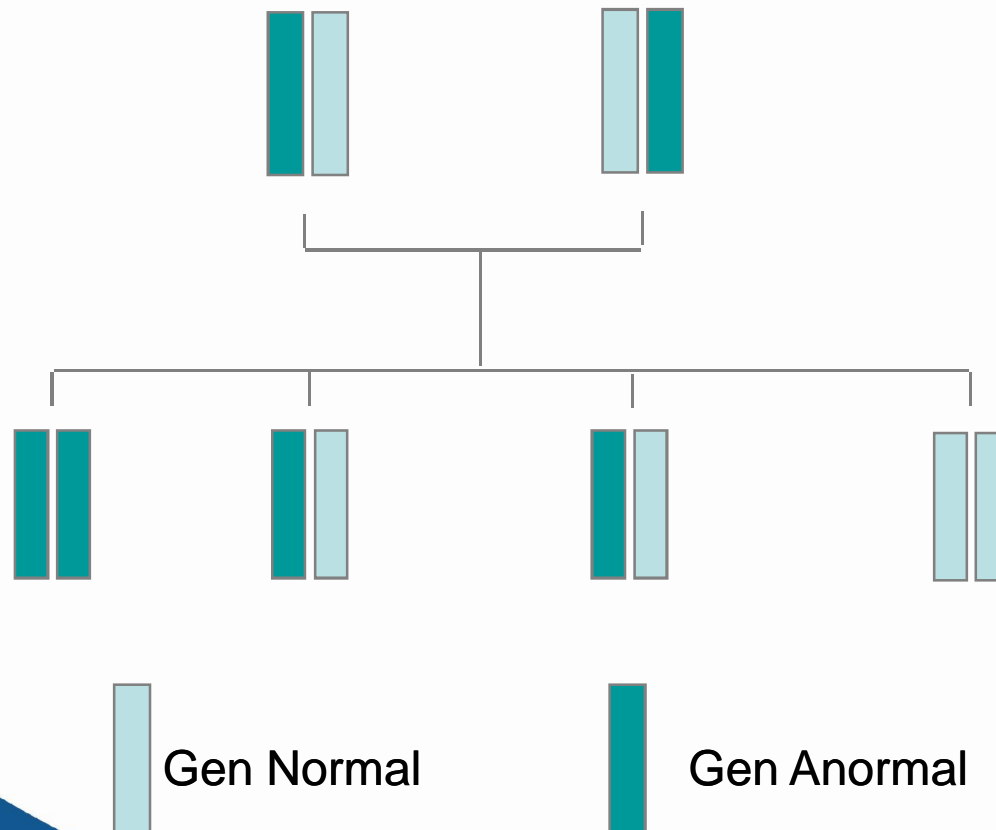
Hemoglobinopatías

- Alteraciones cualitativas o cuantitativas de la globina, secundarias a mutaciones genéticas cuya consecuencia puede ser:
- **Cuantitativas:** Síntesis o anomalías de regulación. → Talasemia
- **Cualitativas:** Anomalías estructurales, mutación o sustitución de uno o más aminoácidos llevando a modificación de la carga de la molécula de Hb → Hemoglobinopatías



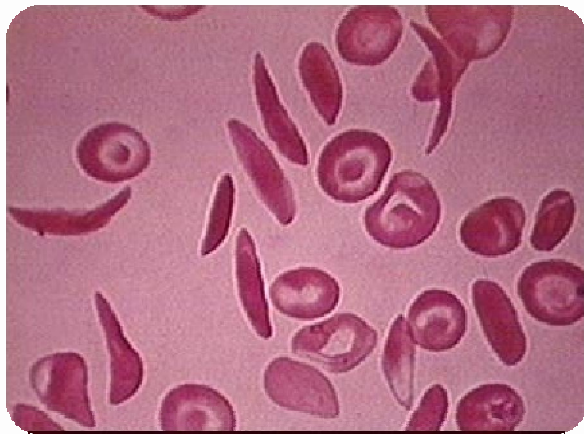
Hemoglobinopatías

Enfermedad Hereditaria con transmisión Autosómica Recesiva



Hemoglobinopatías

- Mutación a nivel de los genes que codifican una determinada cadena globinica.
- Las que afectan regiones esenciales de la molécula.

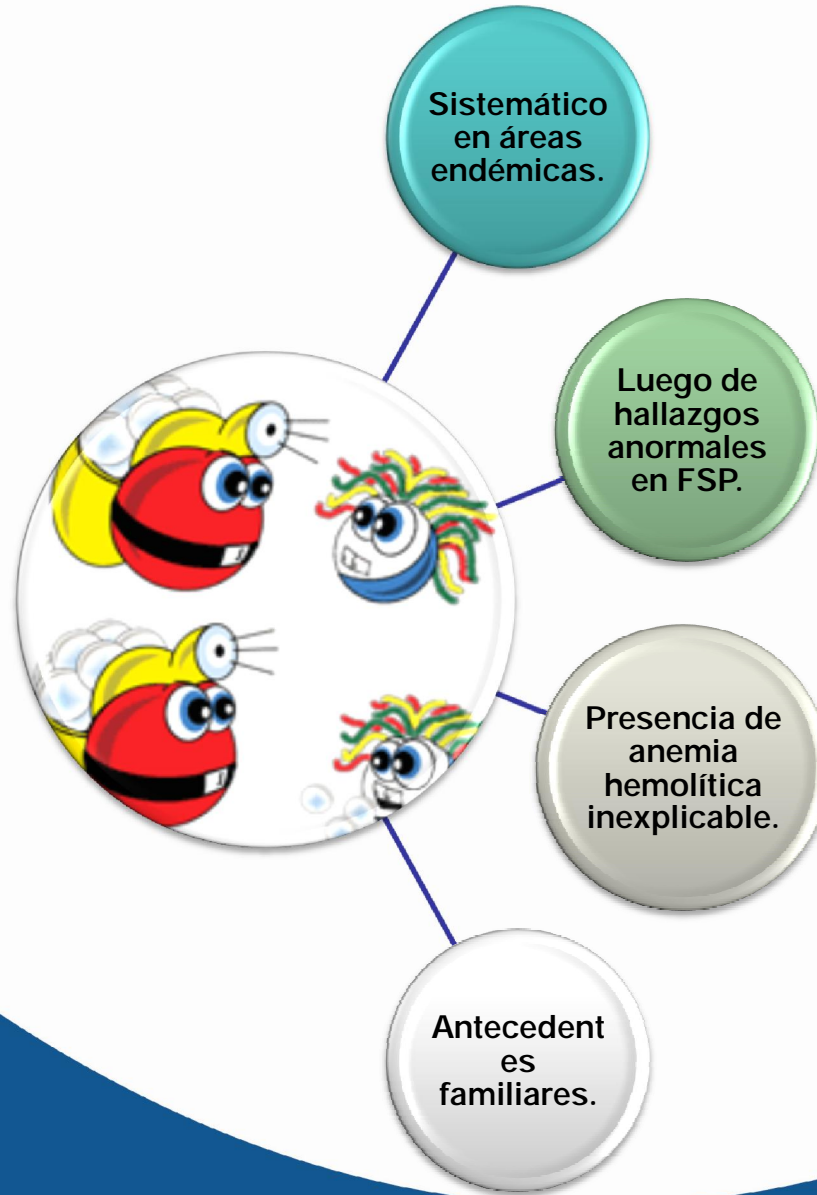


Variantes

- Por mutación superficial:
Síndromes Drepanocíticos: rasgo (AS), Anemia (SS), Dobles estados heterocigotos (SC, SD, S- - Talasemia).
- Hb inestables: Anemia hemolítica con cuerpos de Heinz.
- Variantes con elevada afinidad por el oxígeno.

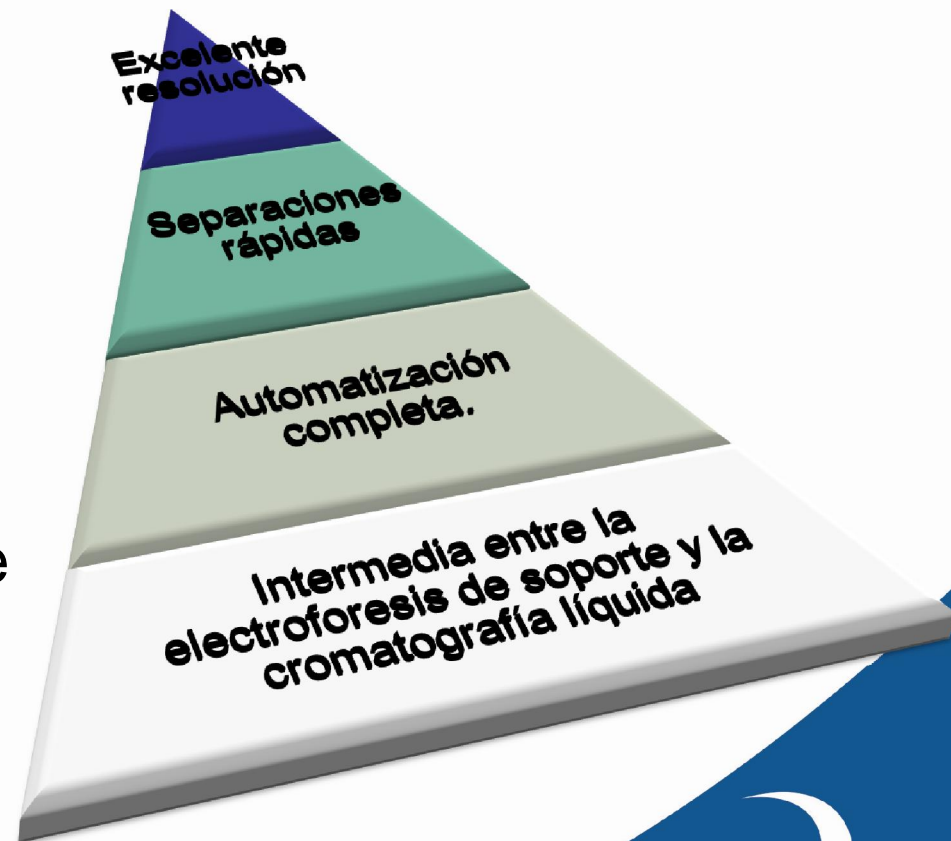


Investigación de Hemoglobinopatías



Electroforesis de hemoglobina

- Análisis muy útil en la investigación de anomalías cualitativas y cuantitativas de la Hb .
- Paralelamente a las técnicas en gel de agarosa se ha desarrollado la técnica de **electroforesis capilar**.



Electroforesis Capilar de hemoglobina

- Capilares en paralelo:
- 7 análisis simultáneamente

Inyección de muestras diluidas con solución hemolizante

Separación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar.

- Desde el ánodo por aspiración.

- Detección a 415 nm en el lado catódico.

IDENTIFICACION - SOFTWARE



Principio de la electroforesis de hemoglobinas.

Movimiento de partículas cargadas bajo un campo eléctrico.

Hb HYDRAGEL y Hb CAPILLARYS permite el screening de las principales hemoglobinas anormales de interés clínico.

Hb Ácida HYDRAGEL permite la diferenciación de las más hemoglobinas más comunes de acuerdo con su movilidad.



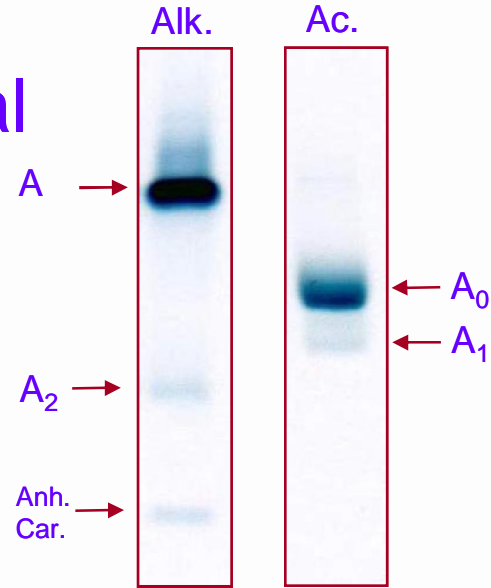
Identificación

Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, exceso de Hb F, Hb H, Hb Bart (en Talasemia) son las hemoglobinas anormales más comunes.

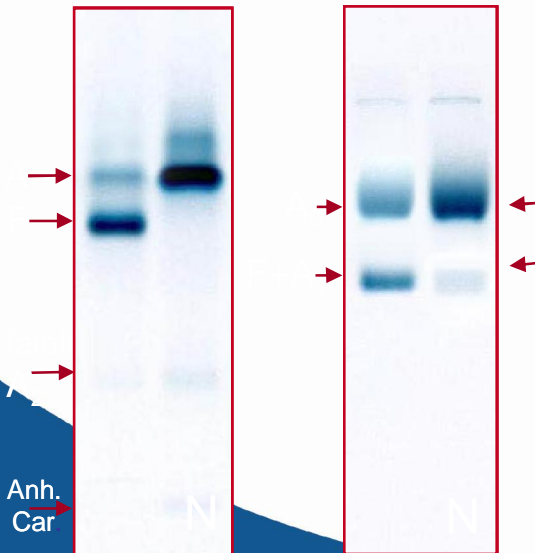
La completa identificación de Hb anormales requieren la comparación entre los dos geles (alcalino y ácido).



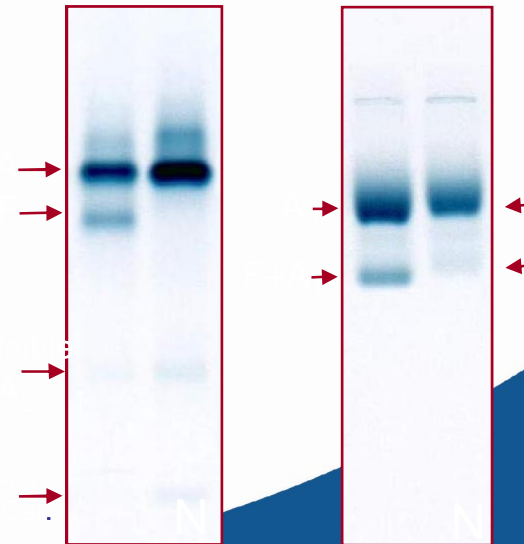
Perfil Normal



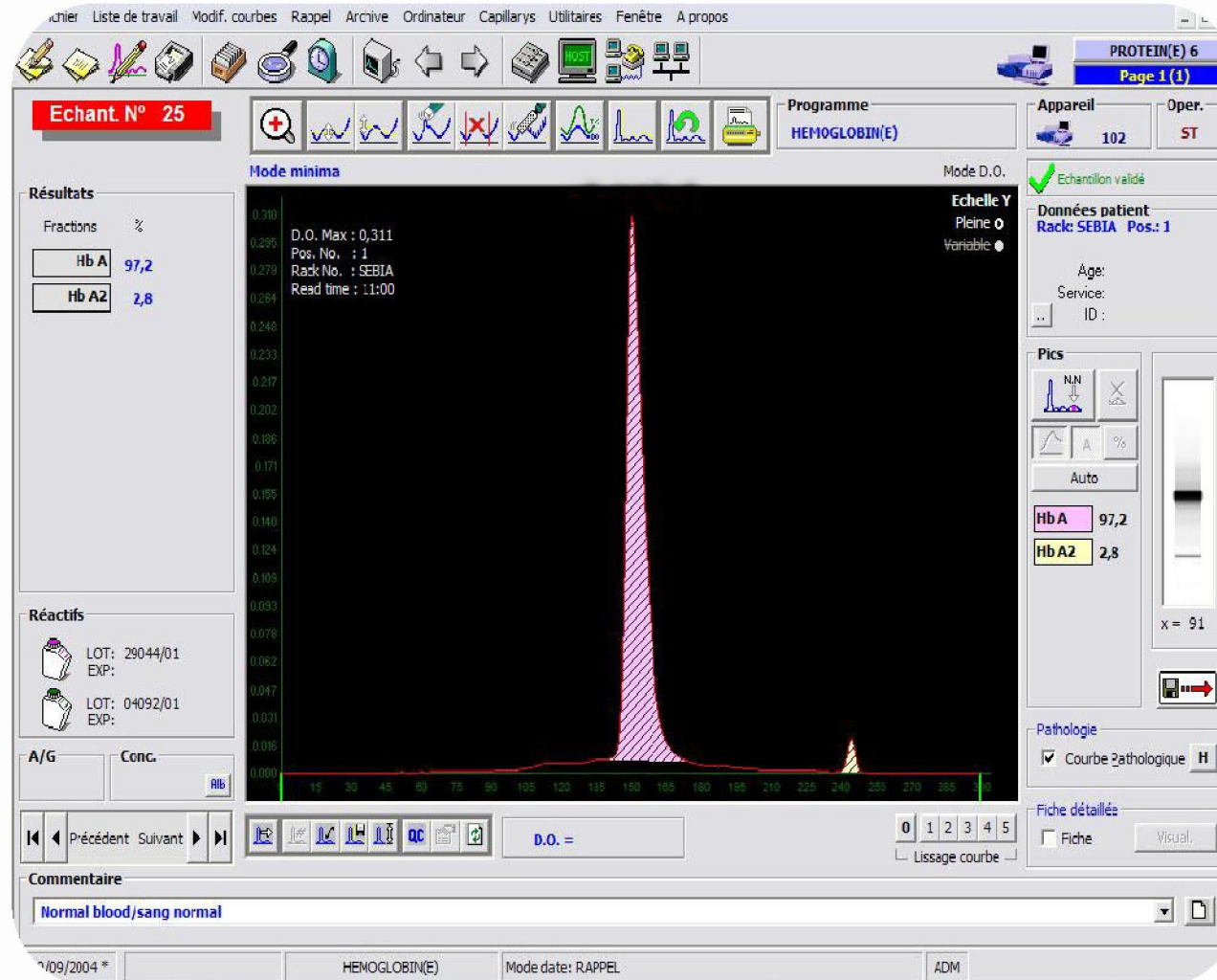
Perfil de niño de 3 semanas de edad.



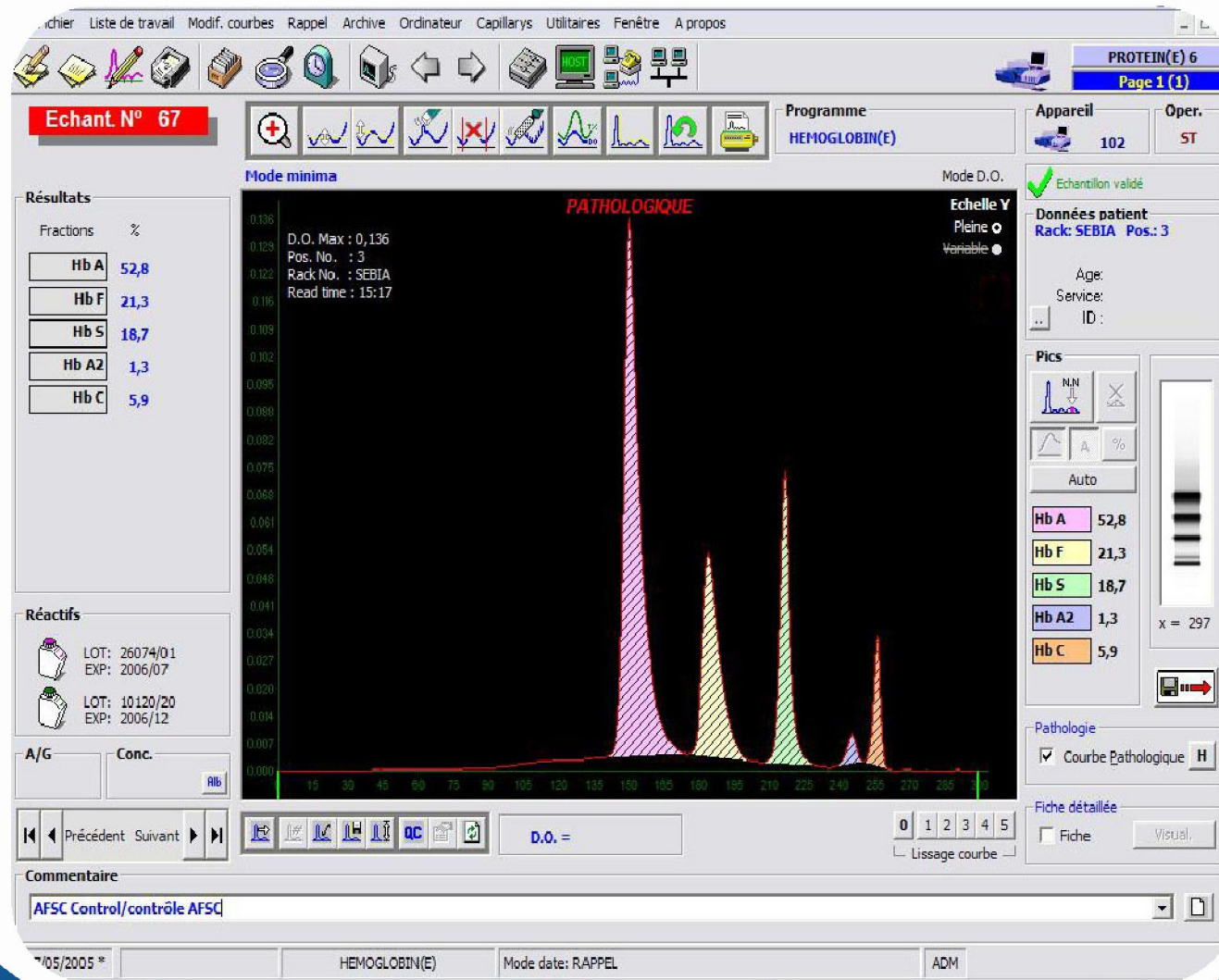
Perfil de niño de 8 semanas de edad.



Muestra Normal



Control AFSC



Hemoglobina S

- Alta prevalencia en África tropical.
- Producida por sustitución del ácido glutámico por la valina.
- Signos: Deformación de GR dando aspecto de hoz, disminución de la afinidad de la Hb por el oxígeno, hiperhemólisis.



Signos Clínicos:

Variables de acuerdo a la forma.

Forma Homocigota:

Síndrome Hemolítico Severo:

Ausencia de fracción Hb A

Fracción Hb S 80 – 100 %

Fracción de Hb A₂ normal o aumentada.

(Fracción de Hb F puede estar presente 0 – 20 %)

Forma Heterocigota :

Rasgo de Células falciformes (generalmente asintomático)

Fracción Hb A 50 – 70 %

Fracción Hb S 35 – 50 %

Fracción Hb A₂ normal

Asociación con Hb S:

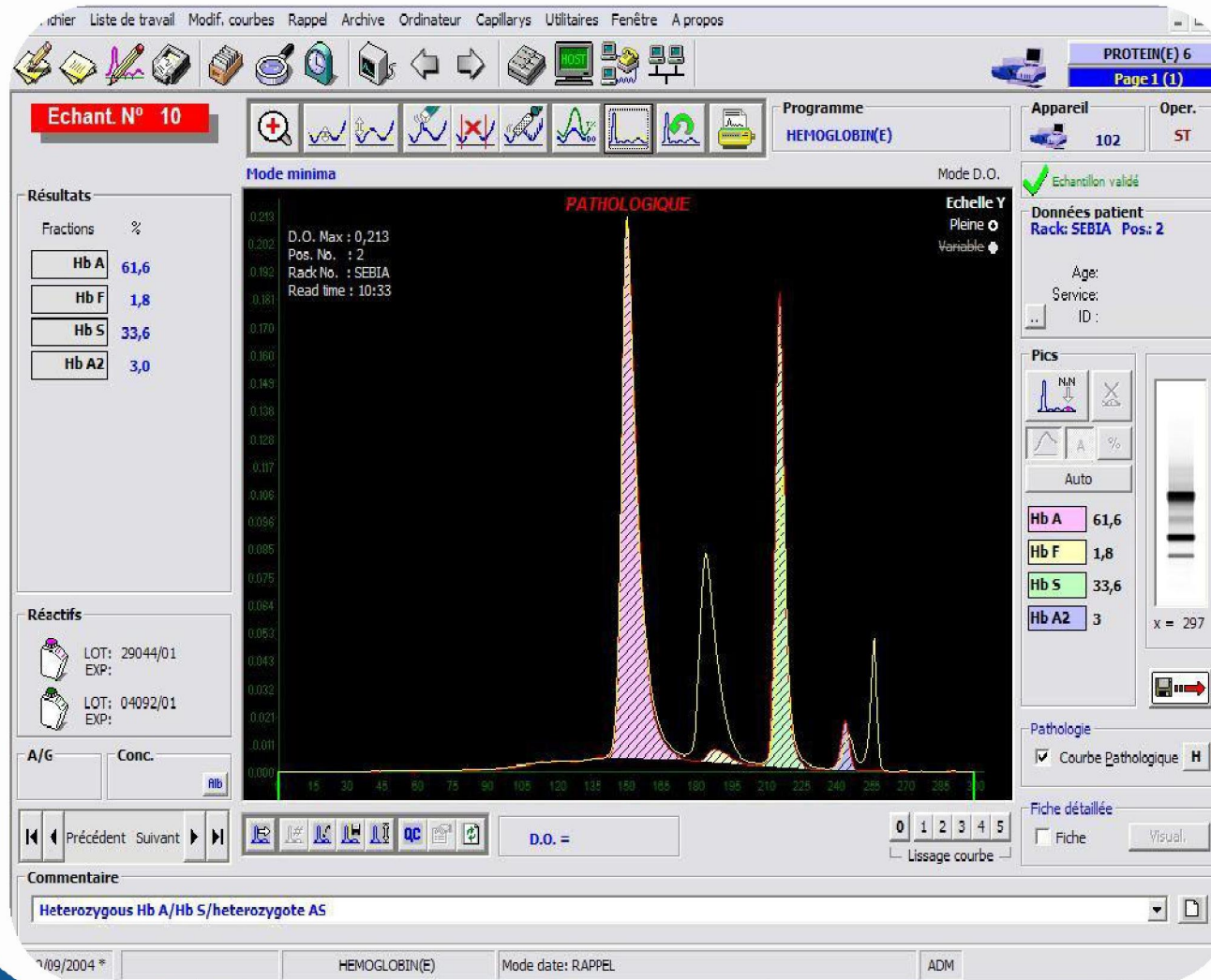
+ Talasemia

+ Hb C

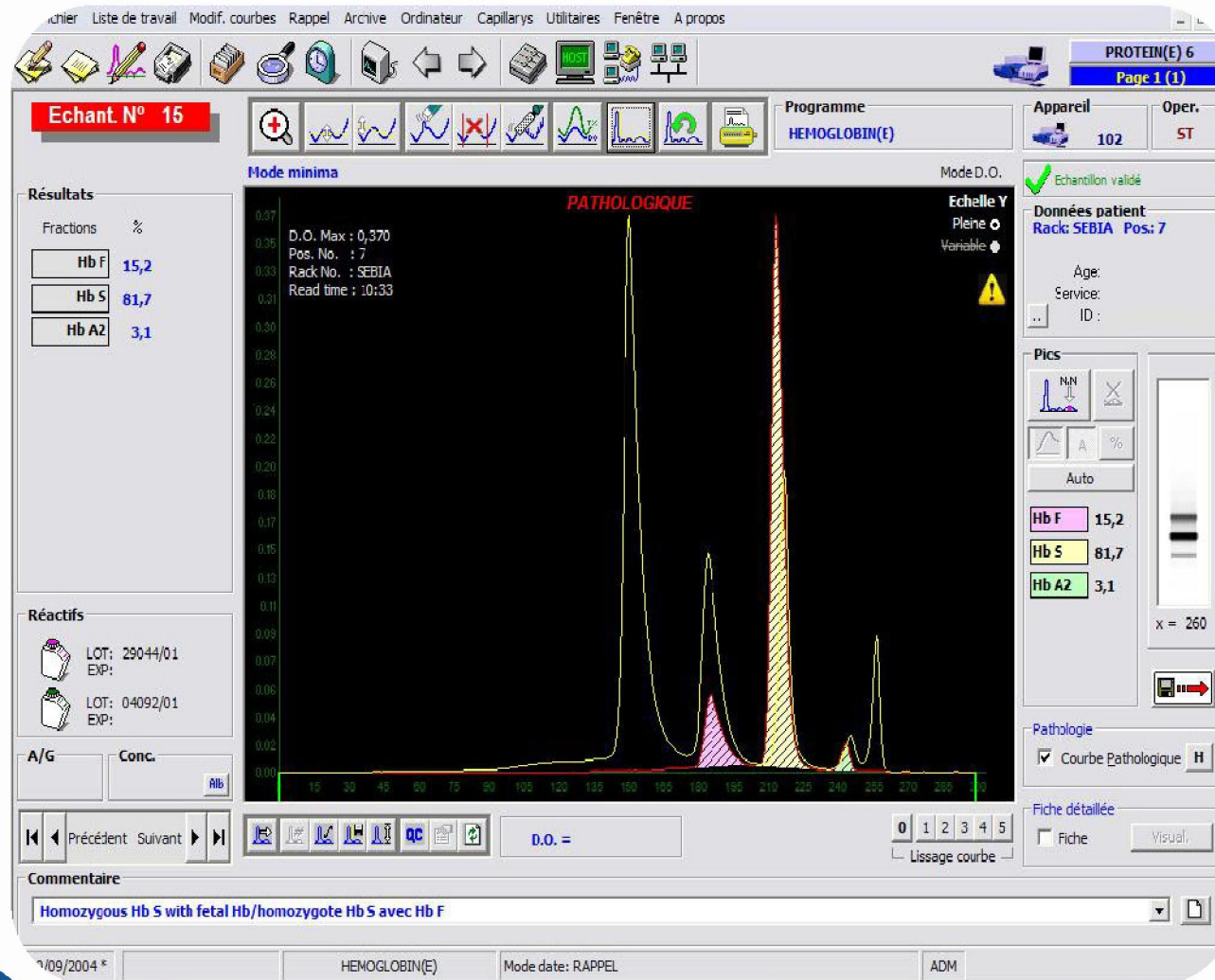
+ PHHF



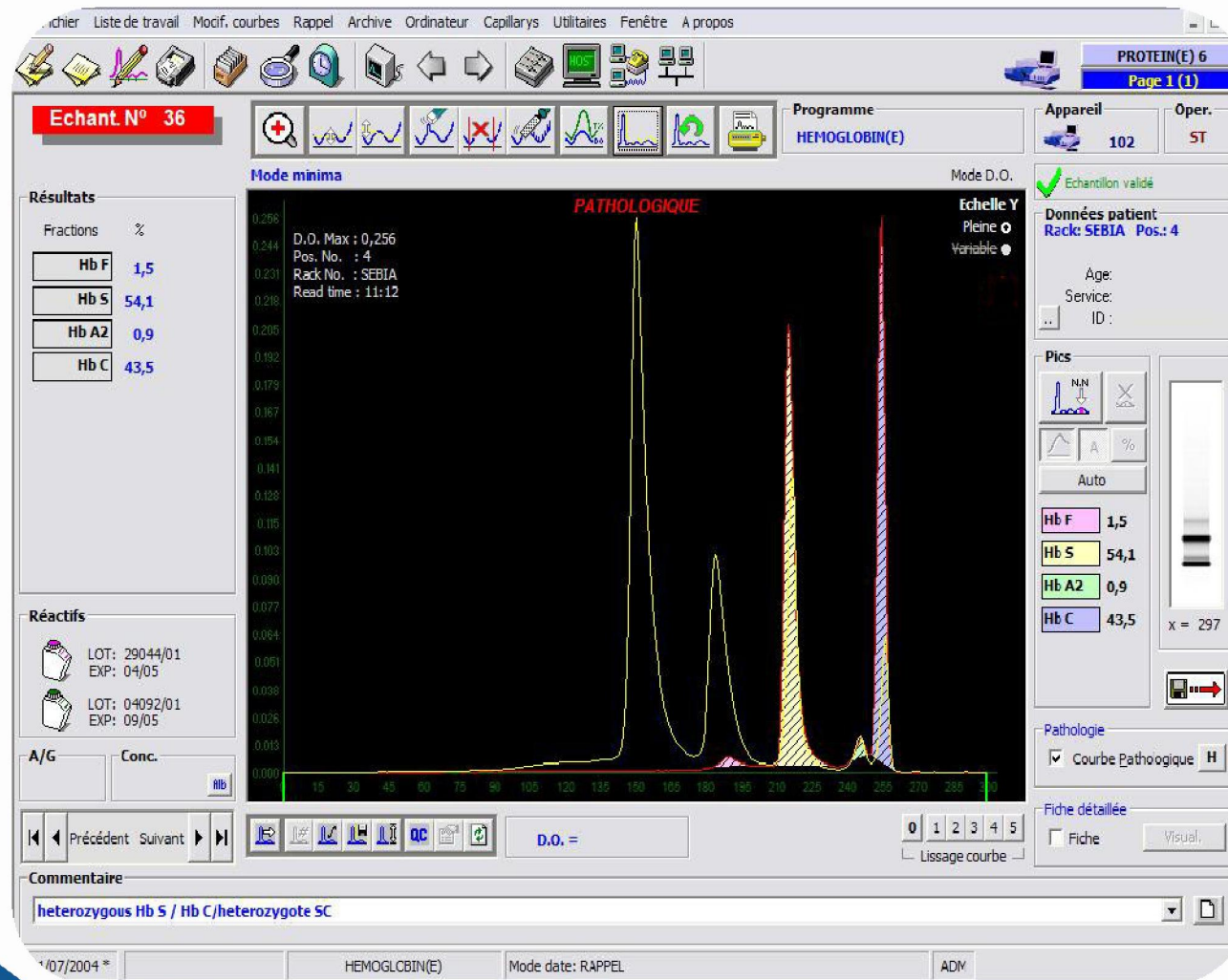
Heterocigoto Hb A/S



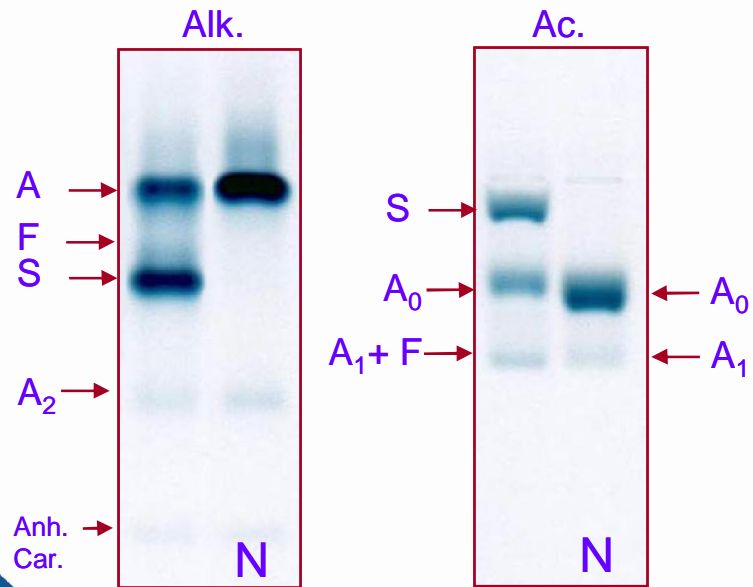
Homocigoto S con Hb F



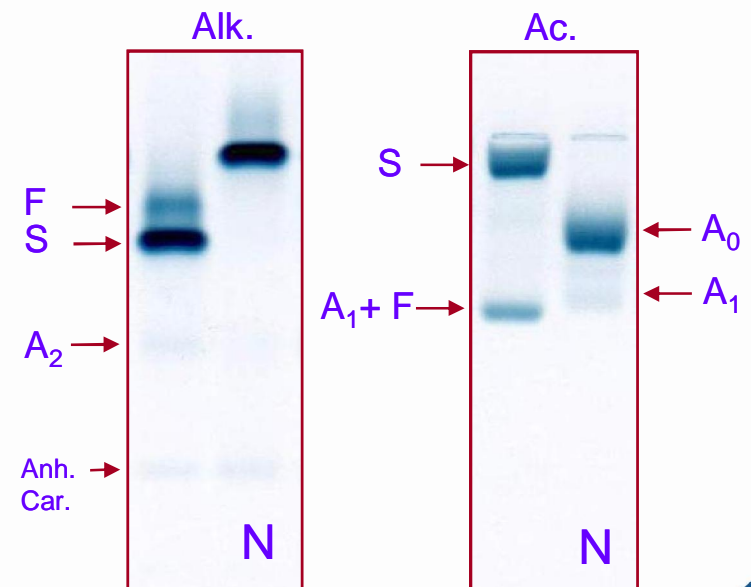
Heterocigoto S/C



Heterocigoto A/S



Homocigoto S con presencia Hb F



Hemoglobina C

- Anormalmente más común en la raza negra, oeste y norte de África, sur de Italia y Sicilia.
- Producida por sustitución del ácido glutámico por la lisina.
- Signos: Deformación de GR dando aspecto de hoz, disminución de la afinidad de la Hb por el oxígeno, hiper hemólisis.



Signos Clínicos y biológicos:

Disminución de solubilidad lleva a los GR en diana.

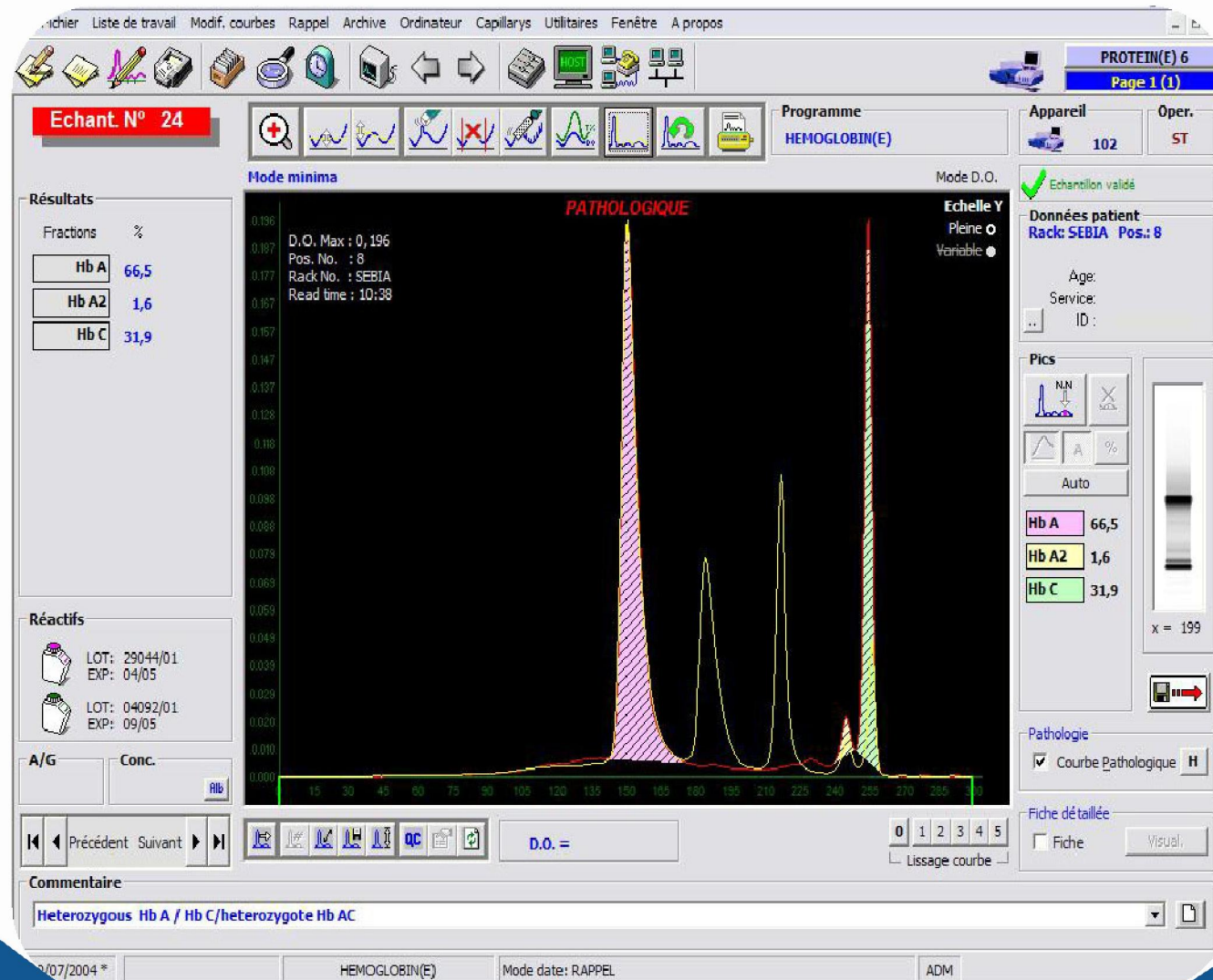
Forma Homocigota : Anemia hemolítica moderada. Esplenomegalia Ausencia de fracción Hb A Fracción Hb C: 95 – 100%	Forma Heterocigota: (asintomática) Fracción Hb A: 60 – 70 % Fracción Hb C: 35 – 40 %
--	---

Asociación con Hb S:

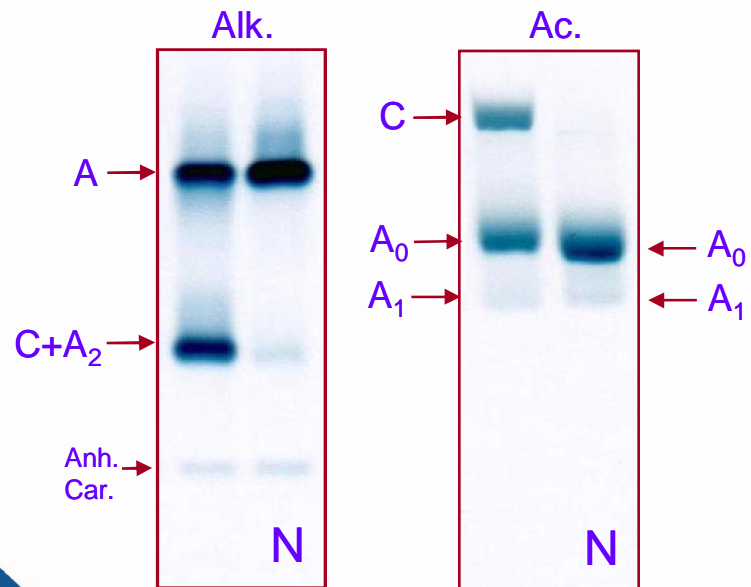
La misma patología como en la enfermedad de células falciformes homocigoto.



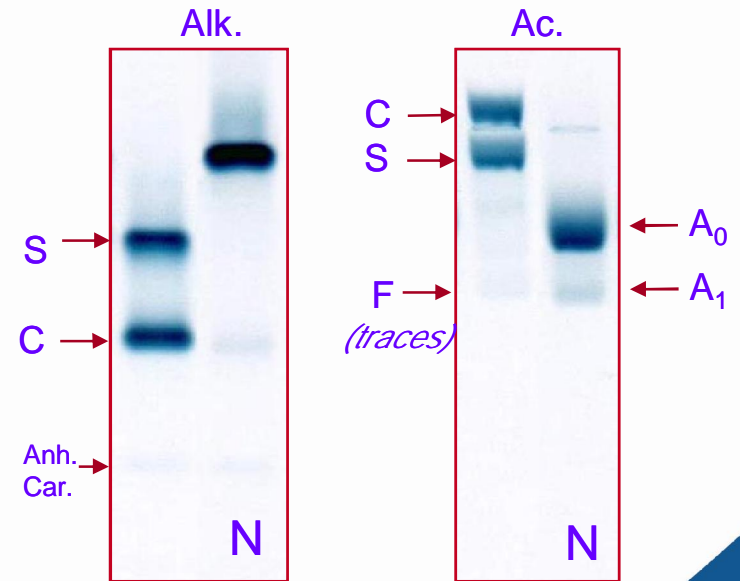
Heterocigoto A/C



Heterocigoto A/C



Heterocigoto S/C



Hemoglobina D

Frecuencia – localización:

Anormalidad normalmente en India.

Caracterización:

Mutación Ácido glutámico por glutamina (D-los Ángeles = D-Punjab)
(mas de 7 diferentes Hb D de acuerdo a la posición de la mutación)

Más anódica que la HbS en Capillarys

Signos Clínicos y biológicos :

Forma Homocigota:

Anemia muy ligera

Ausencia de fracción Hb A

Fracción Hb D 100 %

Forma Heterocigota:

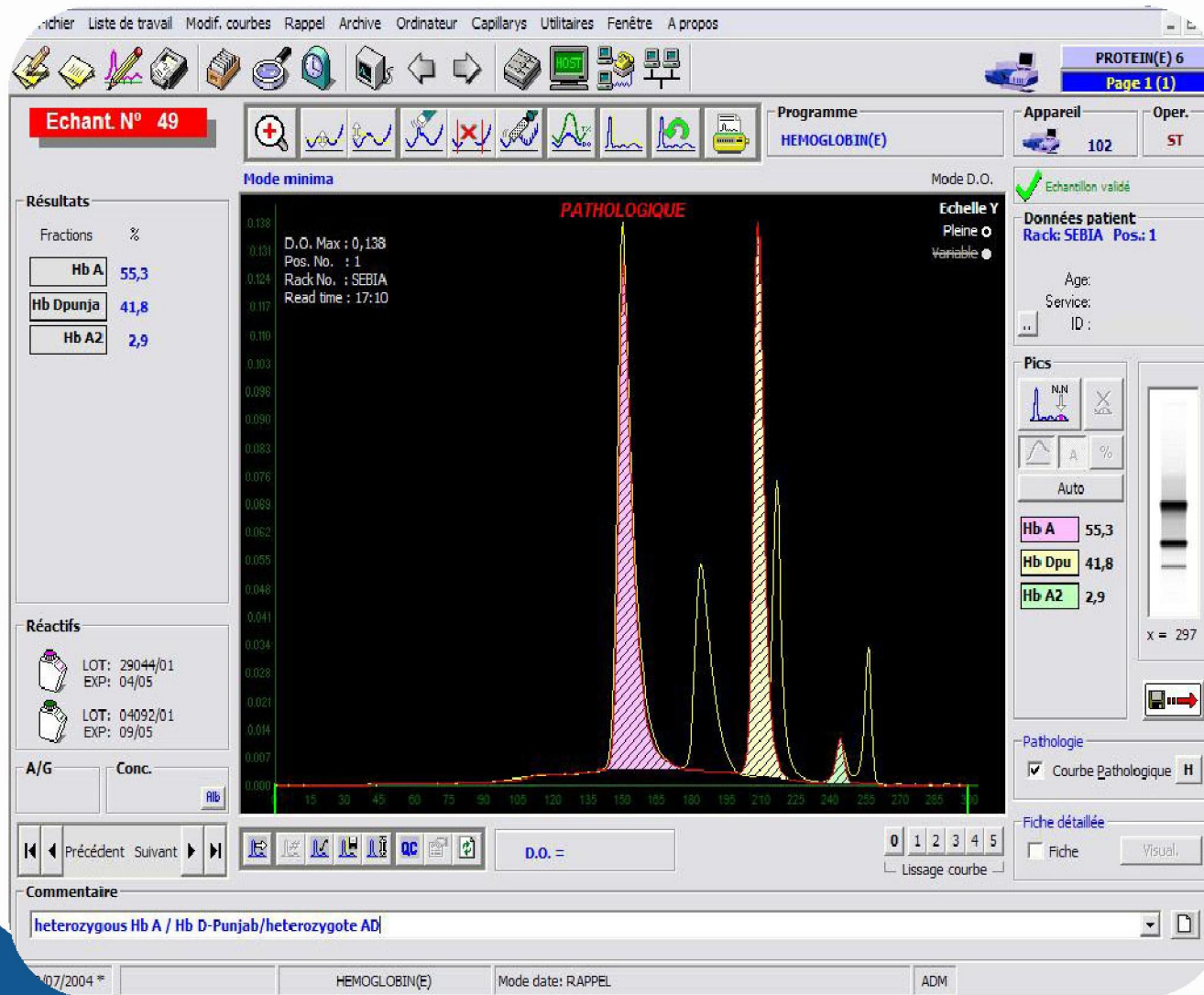
(asintomática, únicamente la
EH permite el diagnostico)

Fracción Hb A: 65 – 70 %

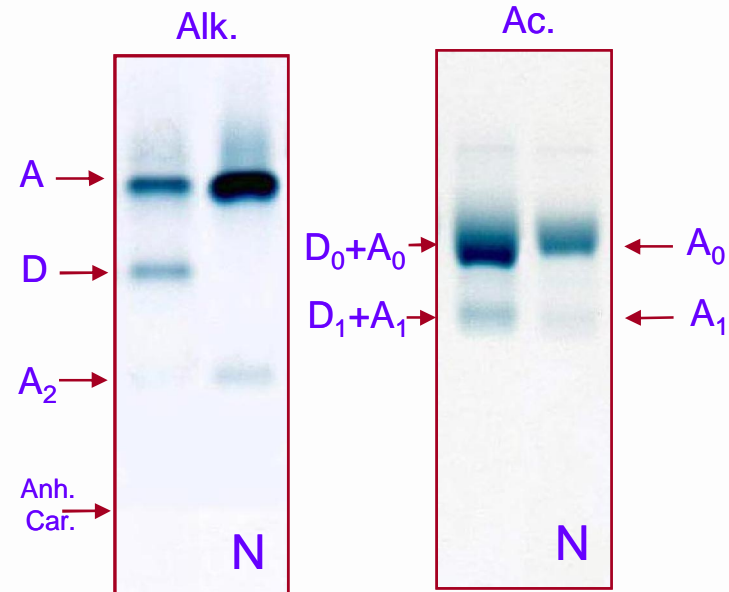
Fracción Hb D:30 – 35 %



Heterocigota A/D



Heterocigota A/D Los Ángeles



Hemoglobina E

Frecuencia – localización:

Anormalmente mas comúnmente encontrada en Sur Este de Asia.

Caracterización:

Mutación Acido glutámico Lisina

Clinical and biological signs:

Forma Homocigota:

(Discreta anemia)

Ausencia de fracción

Hb A

Fracción Hb E 100 %

Forma Heterocigota:

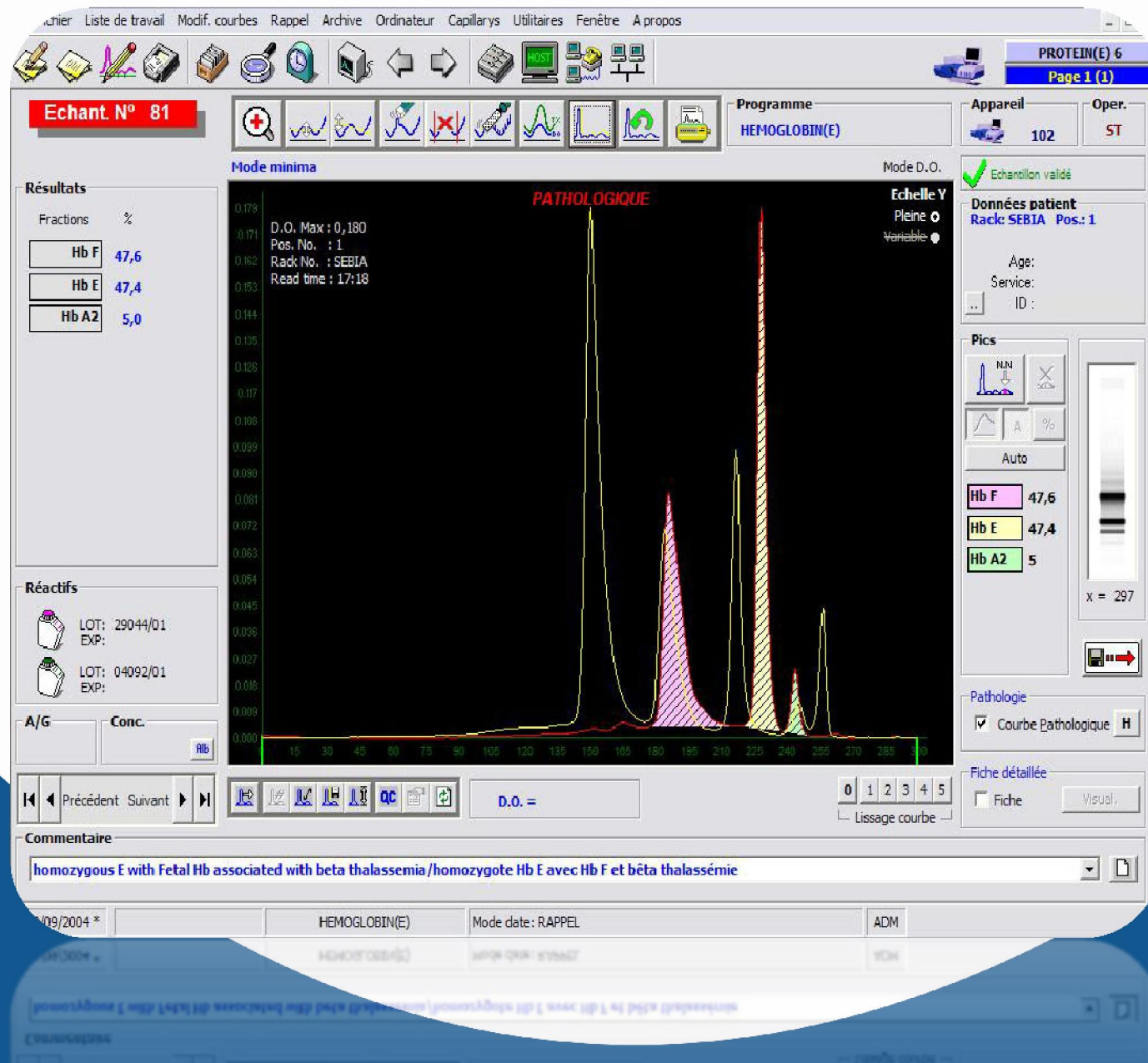
(asintomática)

Fracción Hb A: 65 – 70 %

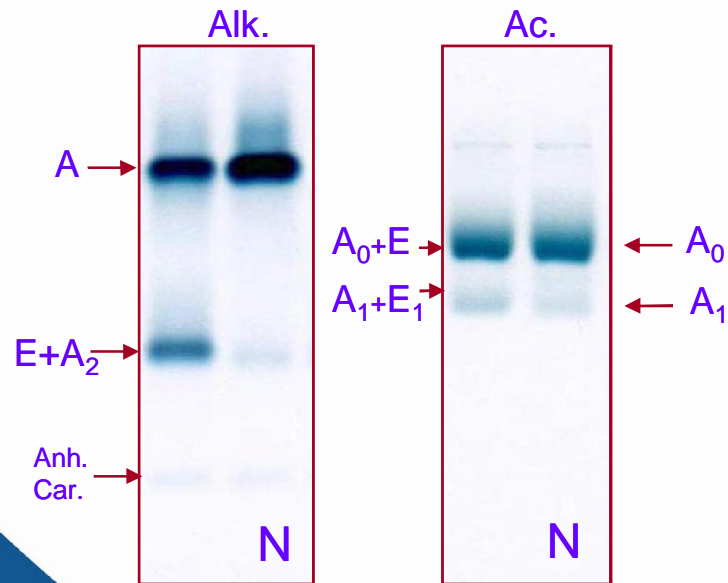
Fracción Hb E: 30 – 35 %



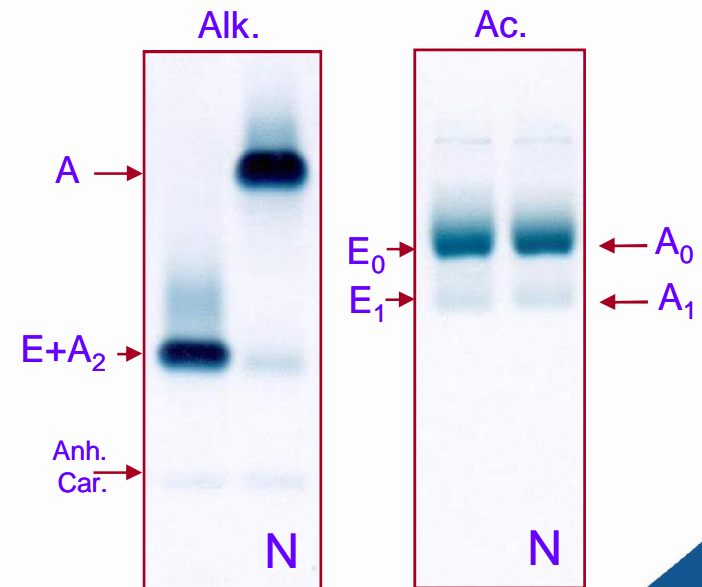
Homocigoto E, Hb F y beta Talasemia



Heterocigota A/E



Homocigota Hb E



Talasemia

Regulación Genética de las hemoglobinopatías

Ausencia o reducción de la síntesis de una o varias cadenas de hemoglobinas.

Balanceando el incremento en la síntesis de otras cadenas.

Las Talasemias están distribuidas alrededor del la región del Mediterráneo, Oeste Medio, Subcontinente India, Sudeste de Asia.



Alfa Talasemia

Disminución de la síntesis de la cadena α por alteración genética.

En consecuencia la síntesis de las 3 hemoglobinas fisiológicamente normales: Hb A, Hb A₂ y Hb F es afectada.

Compensación con Hb especiales:

(polimerización de cadenas libres de cadenas de globina en exceso)

Hb Bart	4 (en niños)
---------	--------------

Hb H	4
------	---

Frecuencia – localización

Anormalidad encontrada en el Lejano Este, África y Países Mediterráneos.



Completamente asintomática.

- Delección de un gen:

talasemia silente

Fracciones Hb A and A2 son normales,
(presencia de Hb Bart al nacimiento).

- Delección de dos genes:

a talasemia menor (anemia ligera)

Fracción Hb A normal.

Fracción Hb A2 ligeramente disminuida o normal.

Fracción Hb Bart detectada al nacimiento (5 – 10 %),
junto con Hb fetal.



Síndrome de severidad intermedia

- Delección de Tres genes :

Hemoglobinopatía Hb H

Anemia hemolítica, presencia de cuerpos de Heinz.

Fracción Hb A 70 %

Fracción Hb A 2 normal o disminuida

Fracción Hb Bart 5 – 30 % (niños)

Fracción Hb H 10 – 20 % (adultos)

Forma Mayor

- Delección de cuatro genes:

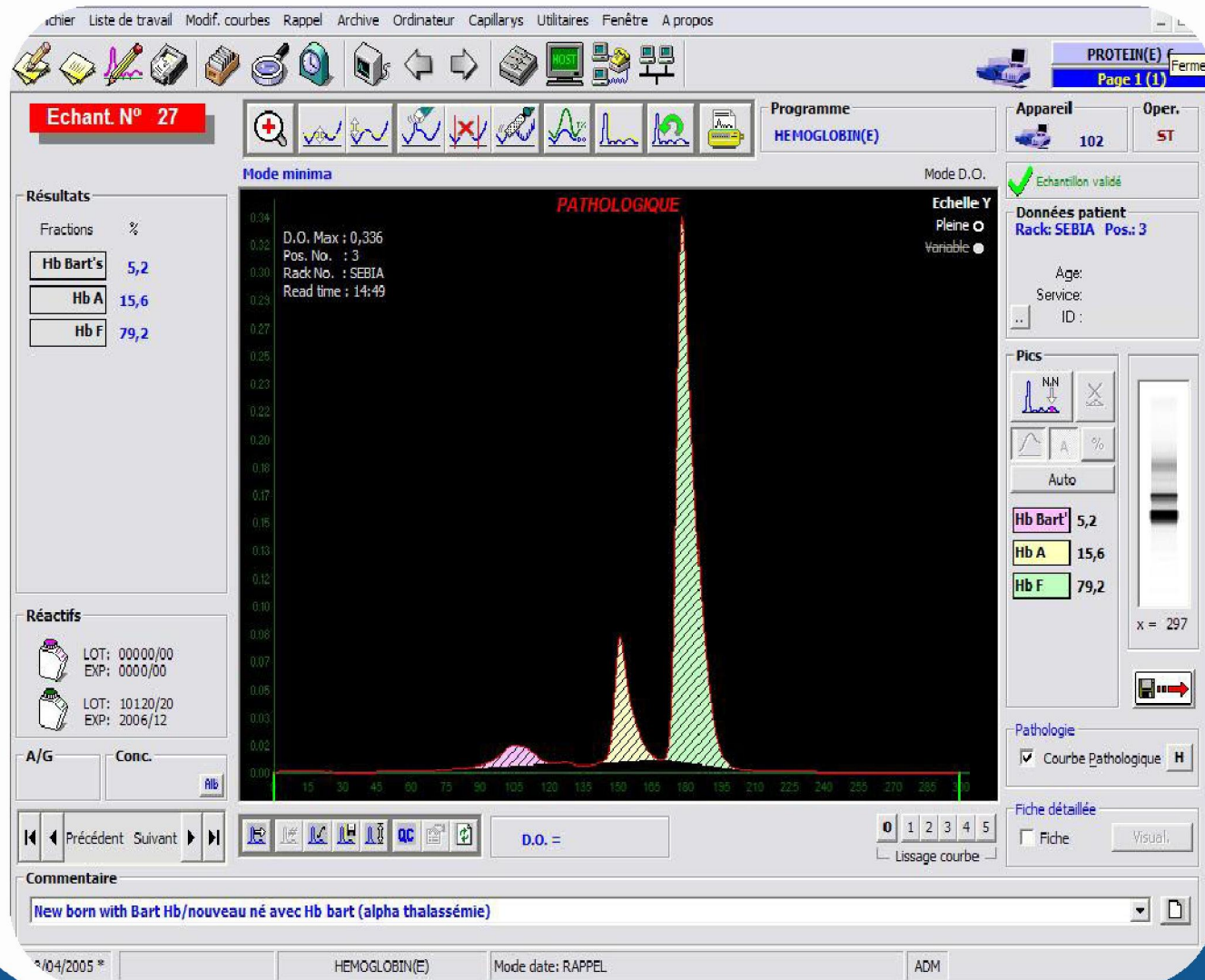
Síndrome Hb Bart (Hidropesía Fetal)

Anemia severa, muerte fetal, forma incompatible con la vida.

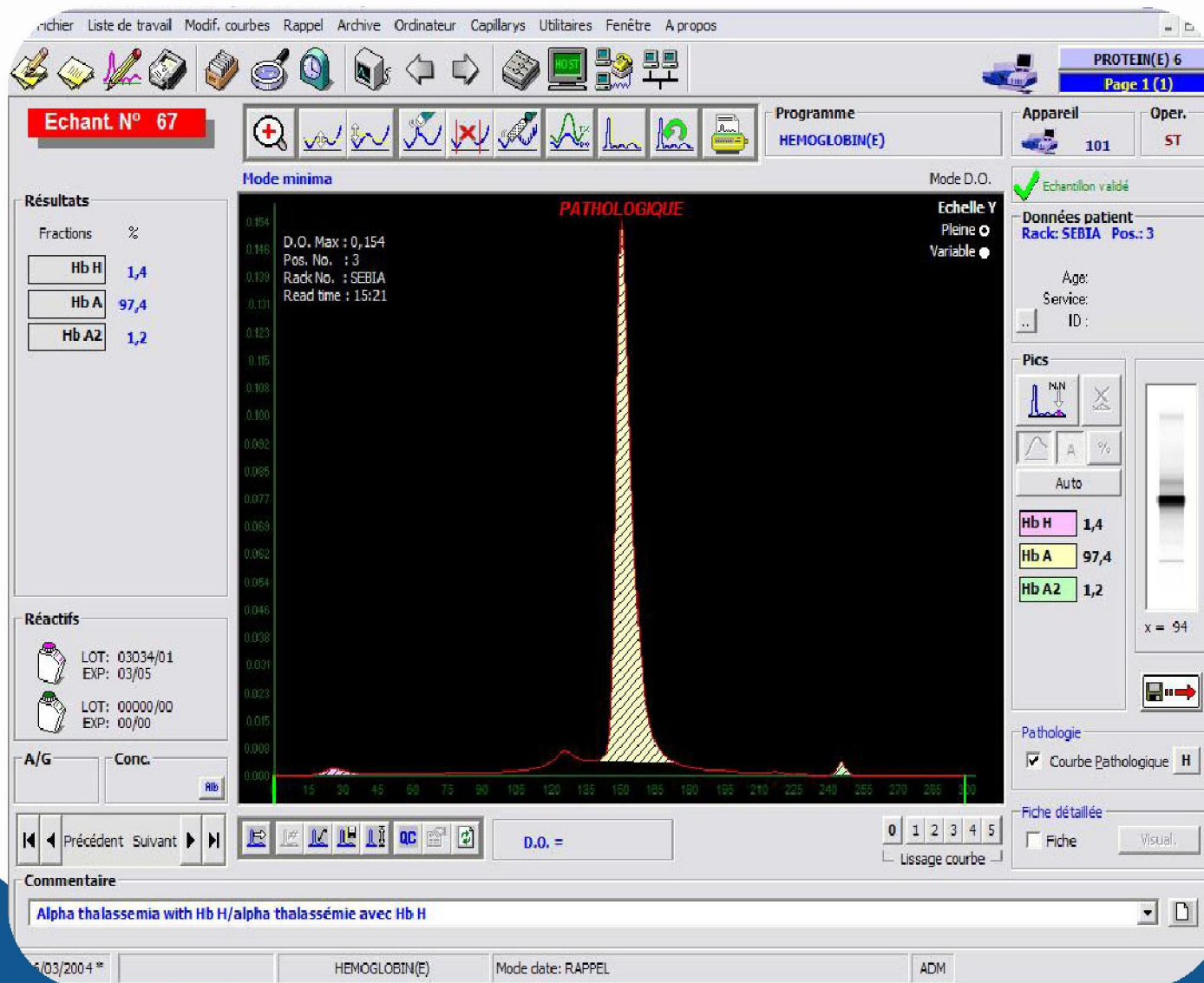
Fracción Hb Bart detectada al nacimiento (80 –100 %)



Hb Bart – Hb Bart's

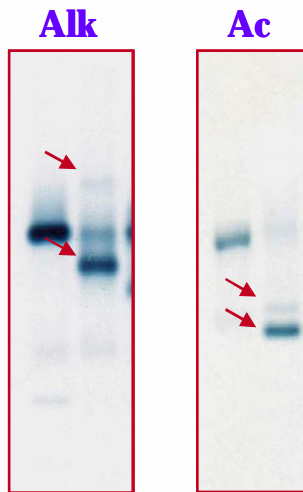


Hb H

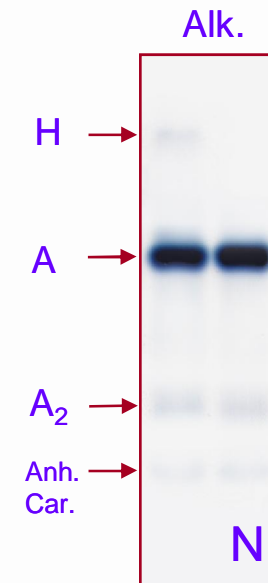


Alfa talasemia

Hb Bart



Hb H



Beta Talasemia

Hb A afectada por una disminución de la síntesis de la cadena β por mutación genética.

Compensación por incremento de la síntesis de cadenas α y β

Fracción Hb A₂ aumentada (<10 – 12 %)

Fracción Hb F presente pero no constante.

Frecuencia – localización

La talasemia más frecuente, encontrada alrededor del países Mediterráneos. En Grecia, Italia y Norte de África.



Puntos importantes

talasemia Menor heterocigota

Clínicamente: anemia moderada, pseudo poliglobulia microcítica, esplenomegalia moderada.

Electroforesis Hb :
Hb A 85-95%
Hb F N o ligeramente incrementada.
Hb A2 > 3,5%

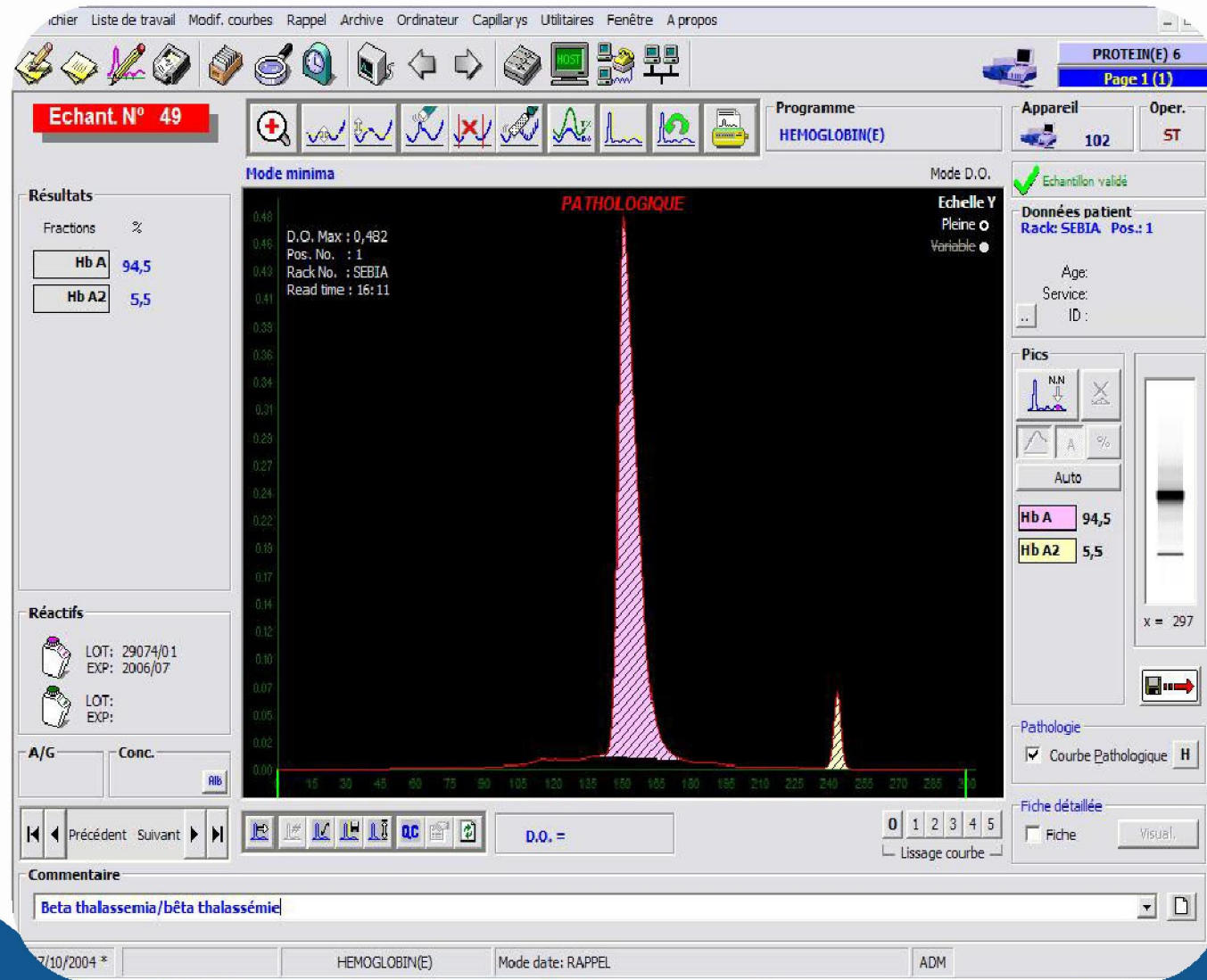
Talasemia Mayor

Clínicamente: Anemia asociada con complicaciones frecuentes: esplenomegalia, hemocromatosis, retraso en el crecimiento.

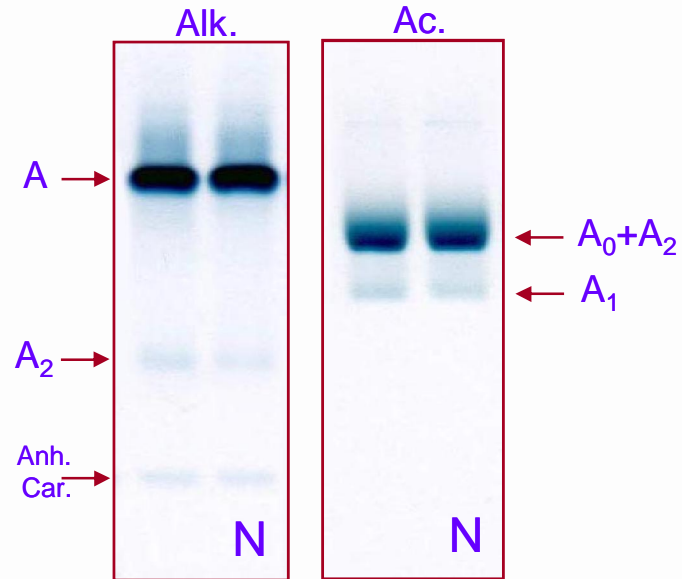
Electroforesis Hb : Hb A disminuida.
Hb F aumentada.
Hb A2 Normal o aumentada.



Beta thalassemia



Beta talasemia



Hb Lepore

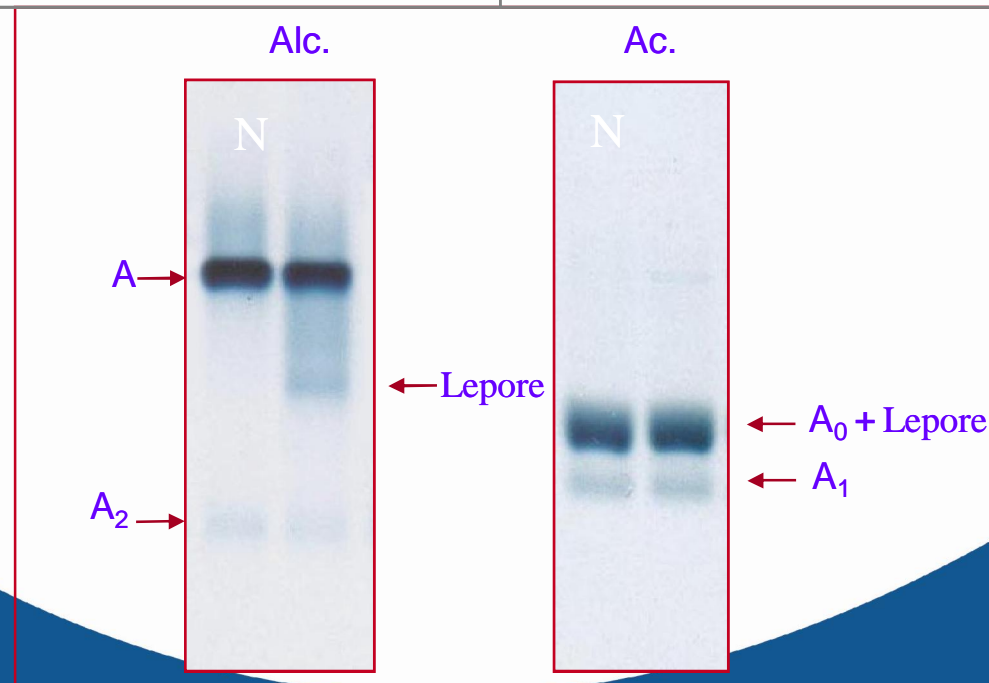
Cadenas b y d recombinación por sobre posición.

Forma Homocigota:

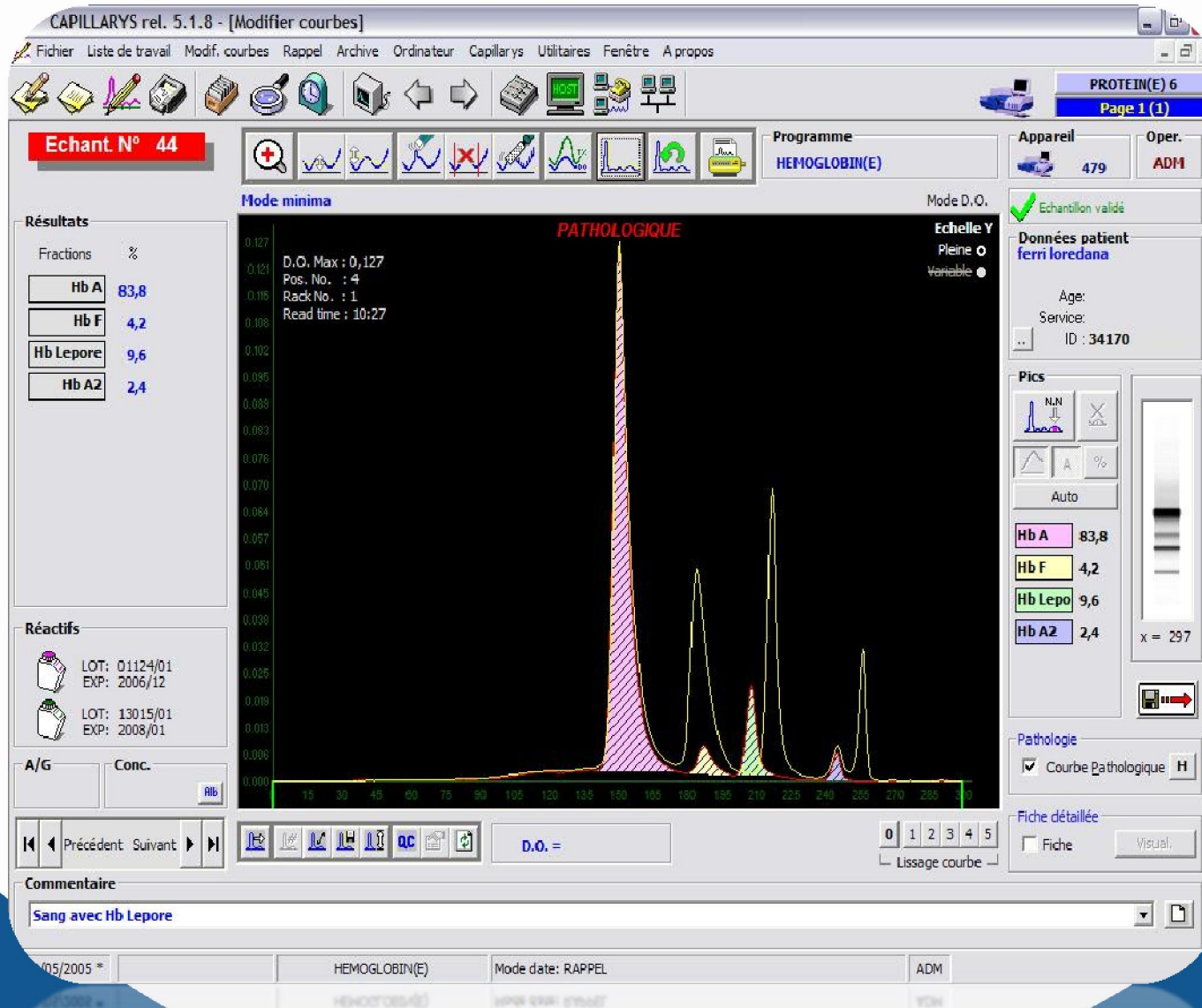
Fracción Hb Lepore 8 – 30 %
Signos Clínicos de la b talasemia homocigota.

Forma Heterocigota:

Fracción Hb Lepore 5 – 15 %
Signos Clínicos de la b talasemia menor.



Hb Lepore



La hemoglobina fetal puede incrementarse en varias
Hemoglobinopatías

talasemia Homocigota

talasemia Homocigota y heterocigota

Hb S, Hb Lepore

HPFH (Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal)

Fracción Hb F: 20 a 100 % (homocigota)



VARIANTES

Variantes Hemoglobina: más de 750 *International Center on Hemoglobins (1997)*

Variantes cadena : 217 mutaciones

Variantes cadena : 362 mutaciones

Variantes cadena : 70 mutaciones

Variantes cadena : 32 mutaciones

Otras: 69 mutaciones (doble mutación, delección, inserción, híbridos)

Consecuencia de estas mutaciones:

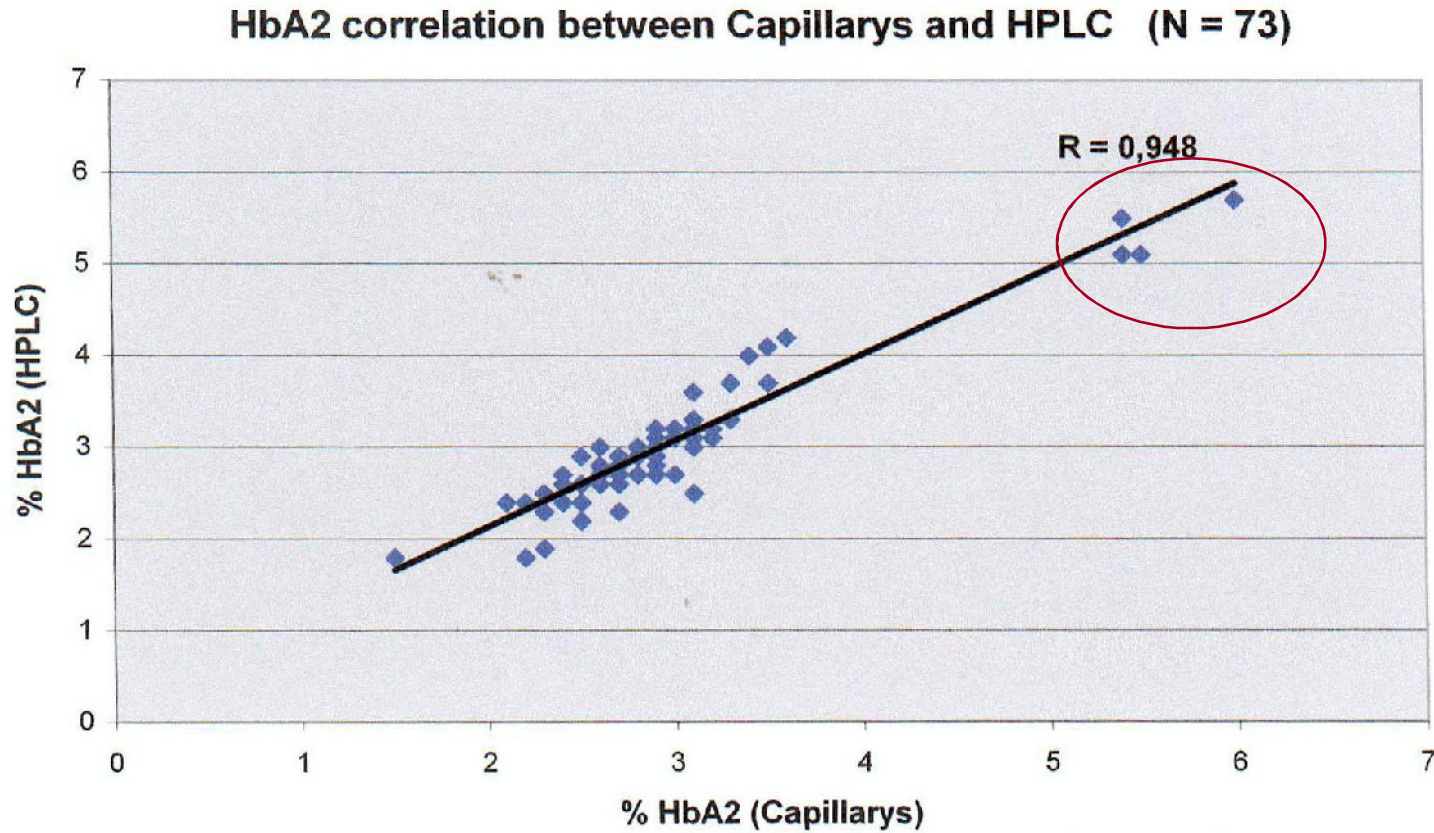
Disminución de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina.

Hemoglobinas inestables.

Muchas de estas variantes son totalmente asintomáticas.

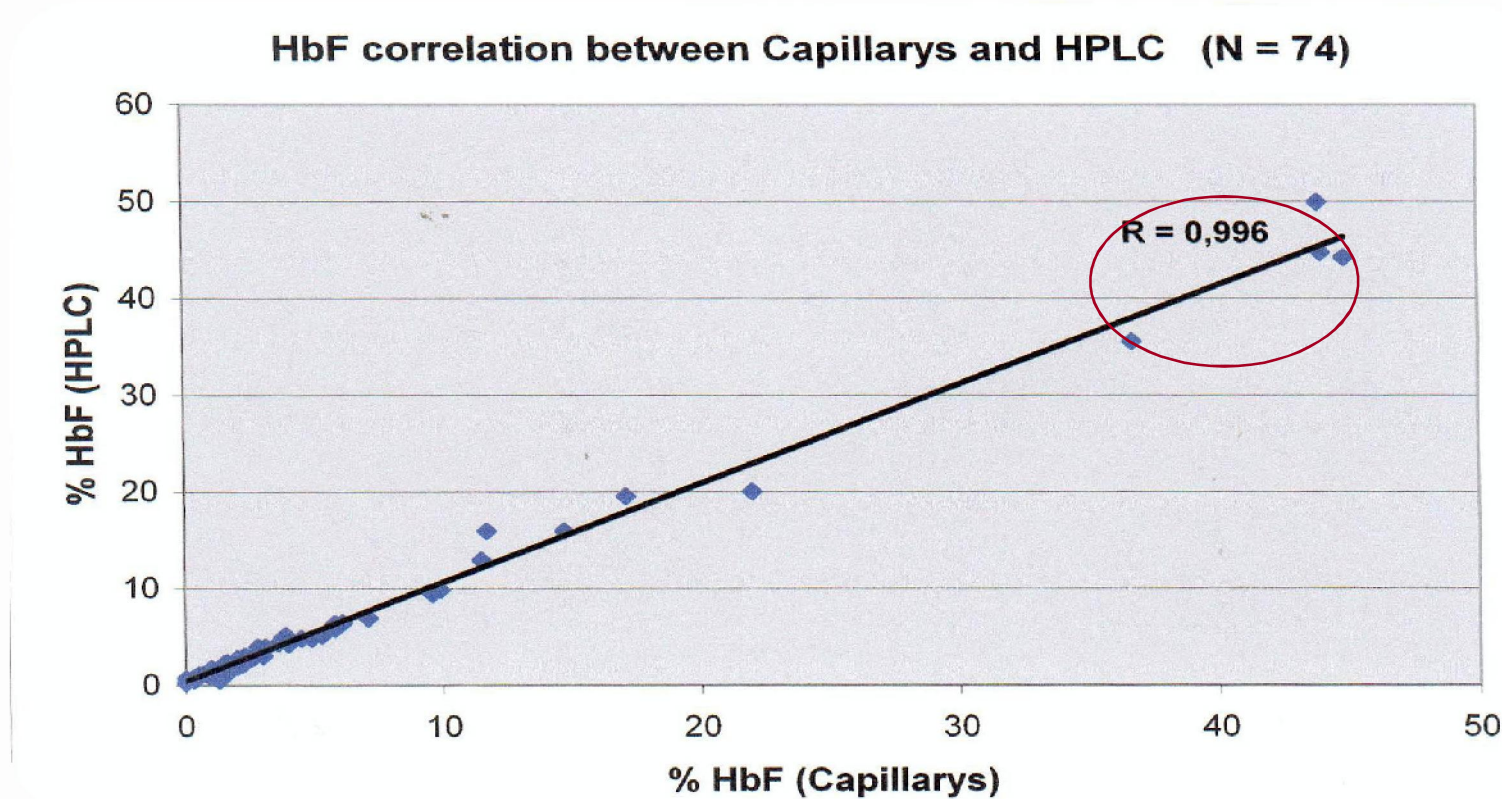


Hb A2: Correlación entre Capillarys y HPLC n = 73

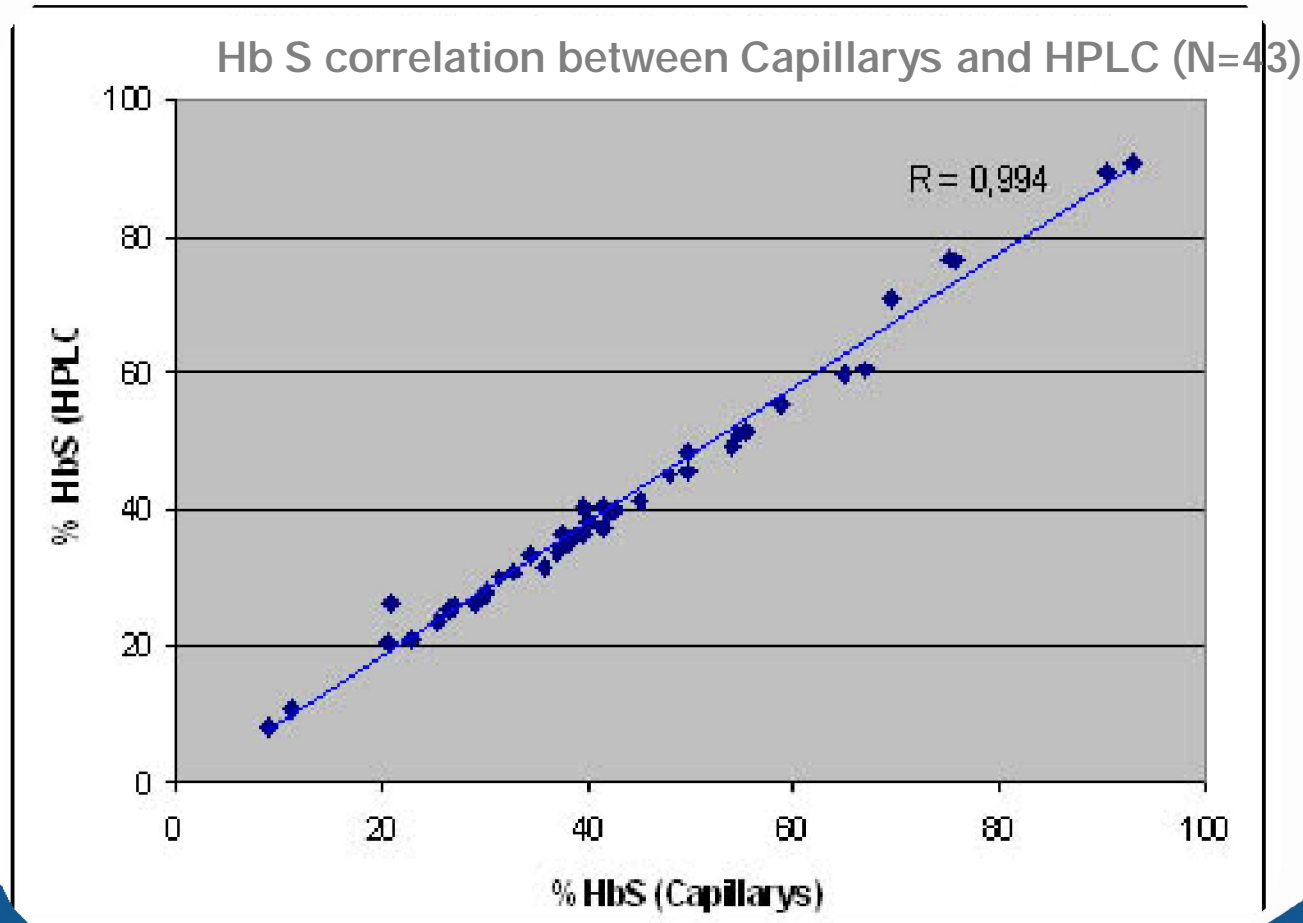


Hb F: Correlación entre Capillarys y HPLC

n = 74



Hb S: Correlación entre Capillarys y HPLC n = 43



Ventajas de la electroforesis de Hb capilar:

- La separación de hemoglobina C y E de la hemoglobina A₂
- Una ligera diferencia de migración entre hemoglobinas S y D permiten una fácil identificación entre ellas.
- Una perfecta individualización y focalización de hemoglobina F entre HbA y HbS permitiendo una cuantificación precisa.

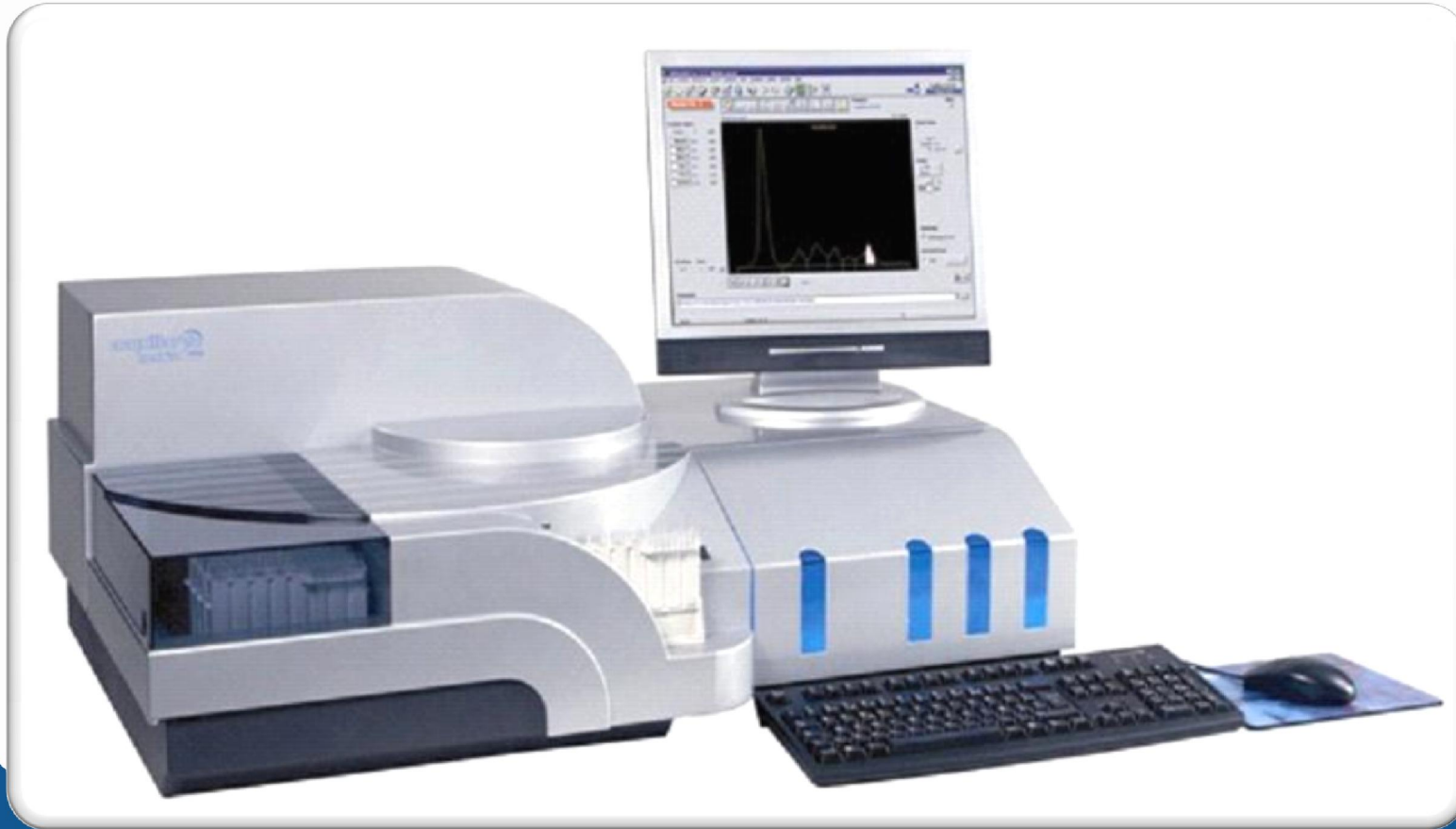


Ventajas de la electroforesis de Hb capilar:

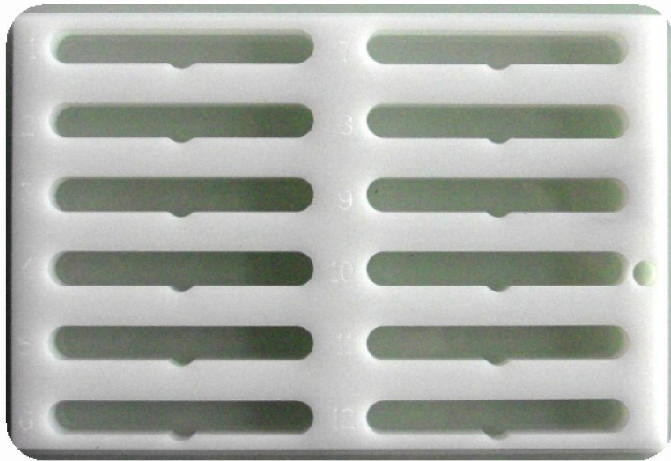
- Una muy buena focalización de Hb A₂ permitiendo una identificación automática y cuantificación de esta fracción.
- Una excelente separación de Variantes Hb A₂.
- Una identificación directa de las principales variantes de hemoglobinas.



CAPILLARYS 2



Accesorios requeridos

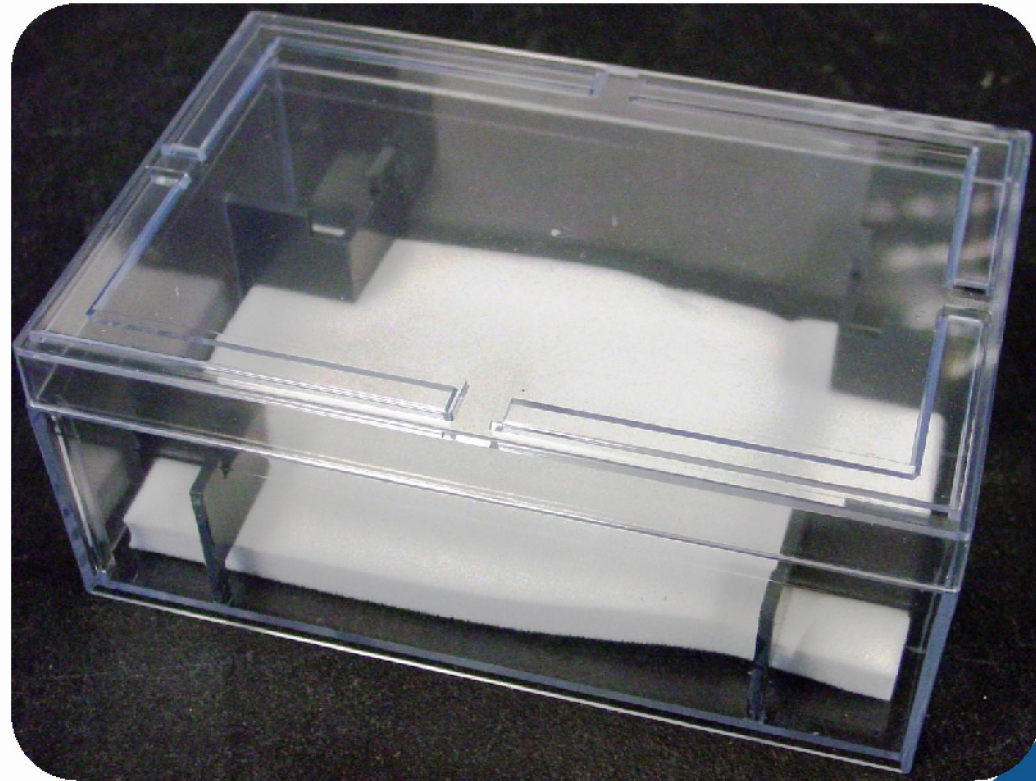


**HOLDER PARA SEGMENTOS
(12 segmentos)**



Cada **SEGMENTO** tiene

(identificación positiva).



CAMARA HUMEDA CAPILLARYS



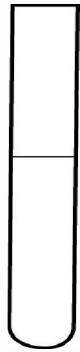
Posicionamiento del segmento en el holder



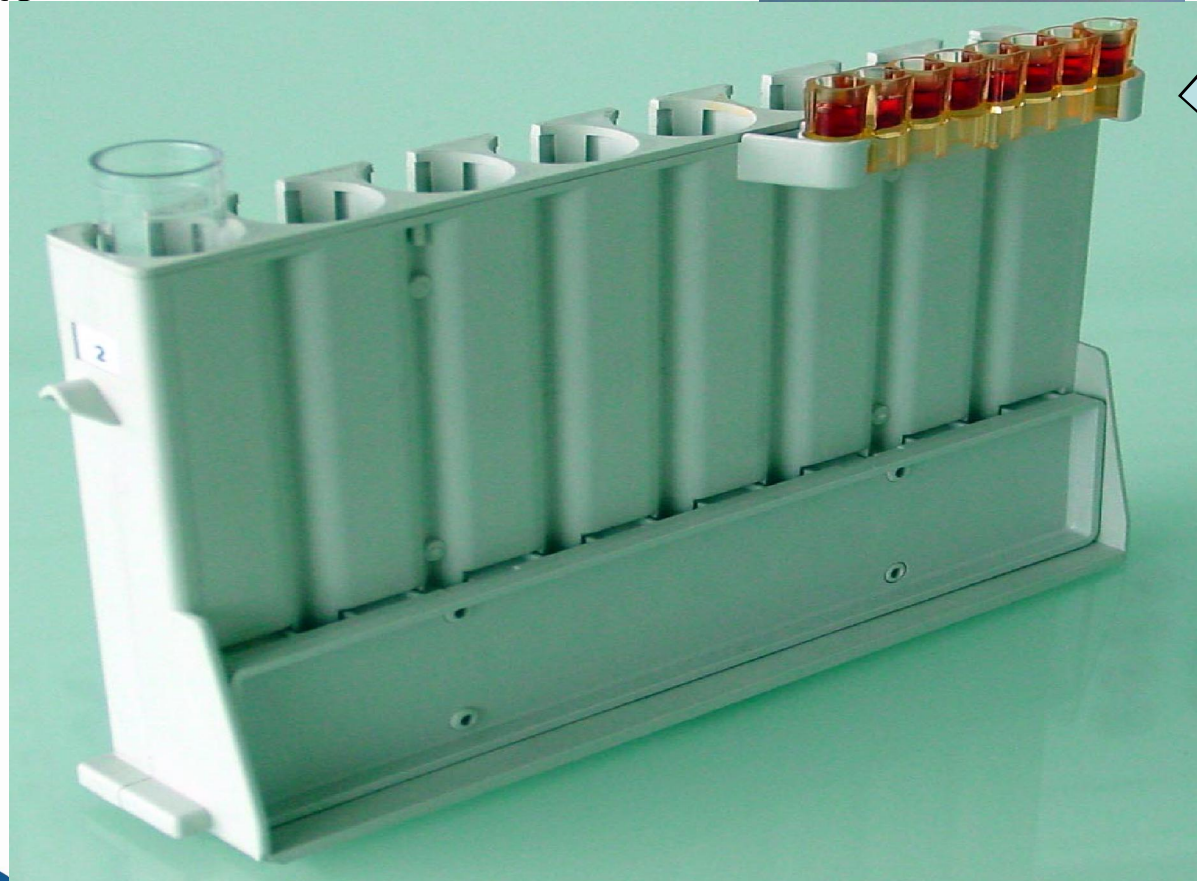
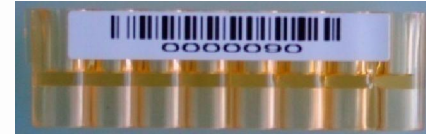
96 muestras pueden ser cargadas en el segmento.



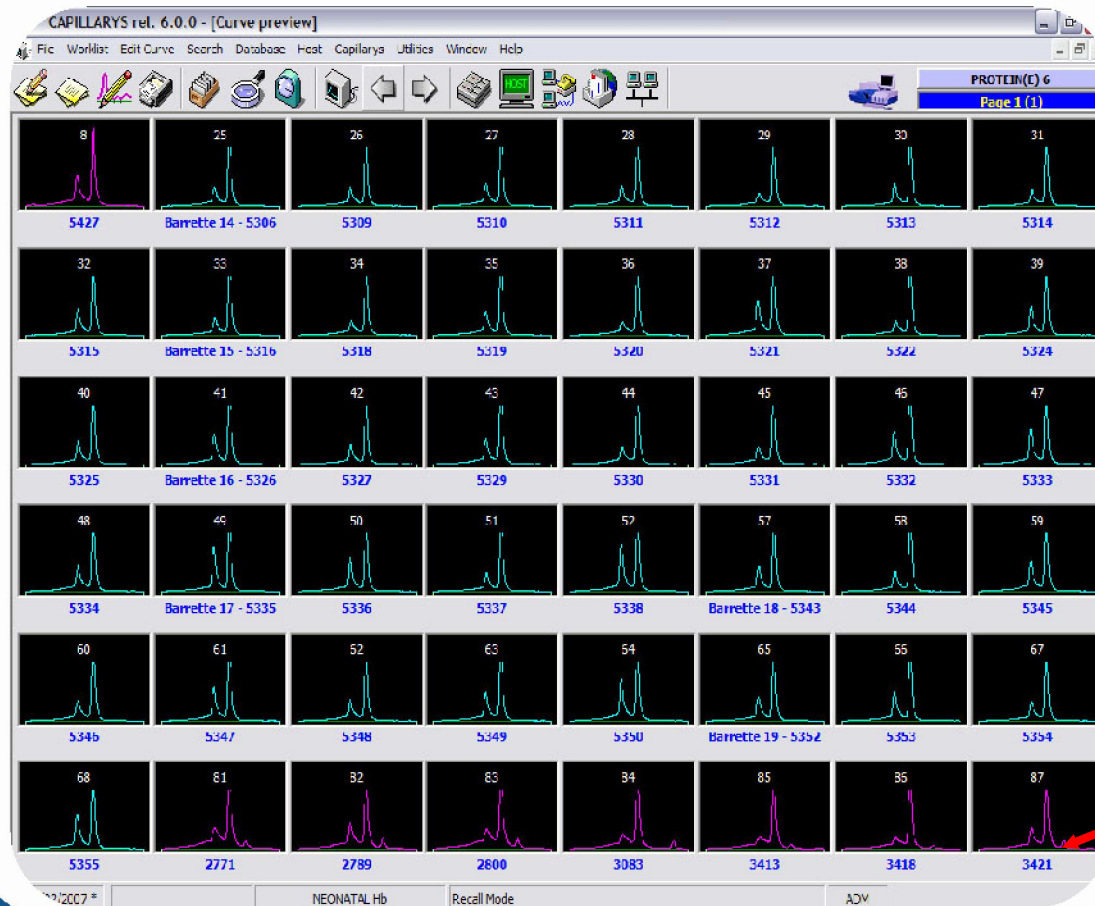
Preparación del rack de muestras estándar => 12 racks de muestras al mismo tiempo.



Solución
Hemolizante



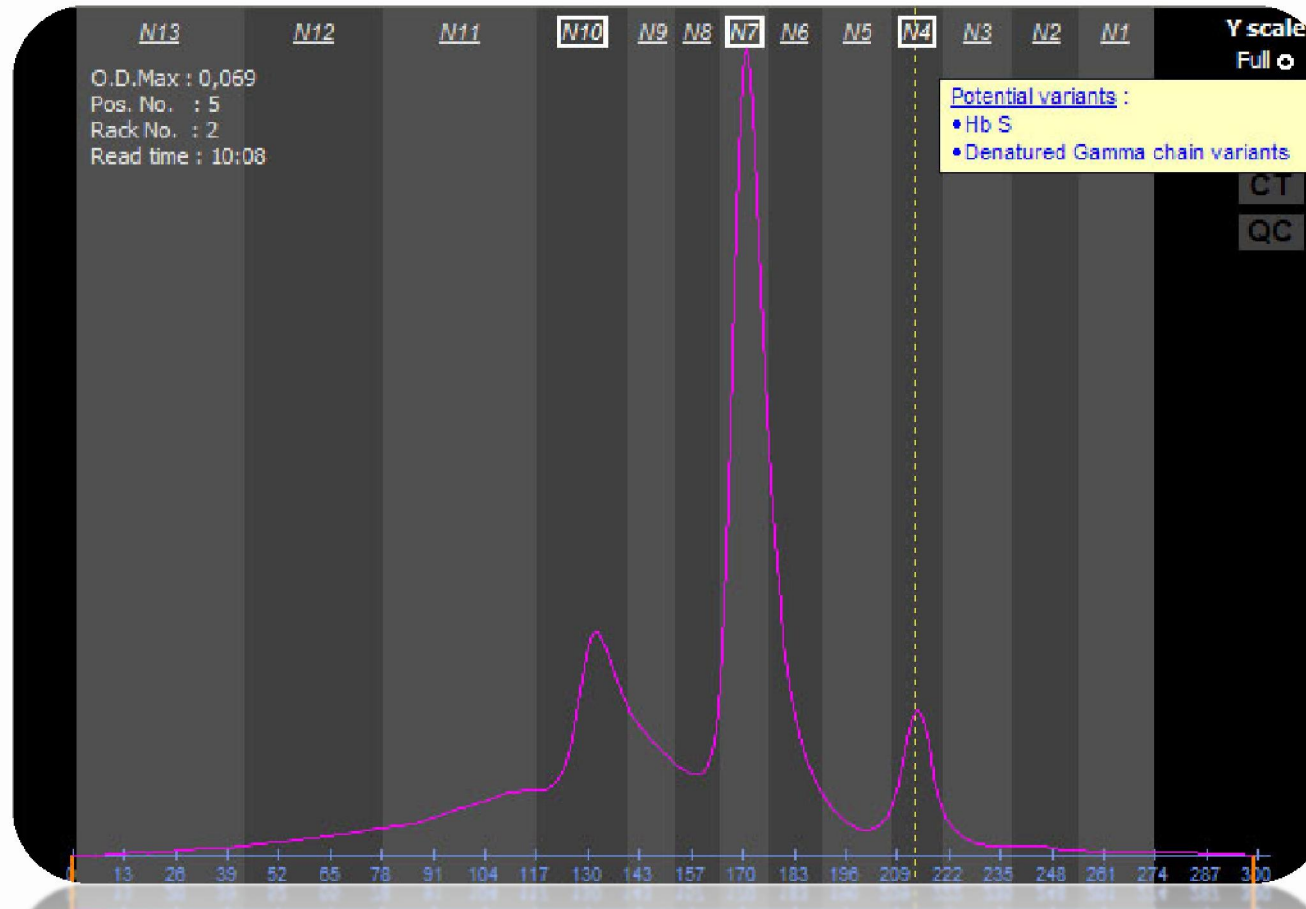
Discriminación de curvas normales de curvas anormales de acuerdo a un código de color.



Sangre Normal:
con Hb F y Hb A
(+ Hb F acetilada)

Sangre Anormal





Sobre los electroforegramas :

- * El nombre de las zonas es visualizadas en pantalla en un recuadro cuando el pico aparece en esta zona.
- * Localizando el mouse sobre la zona del nombre (N1 a N13), sugiere cuales variantes pueden ser vistas en esta zona.



Posiciones de las posibles variantes en recién nacidos en las diferentes zonas.

N 13 : Hb Bart

N 12 : //

N 11 : Hb Hope, variantes de la cadena Gamma, Hb A desnaturalizada.

N 10 : Hb A

N 9 : Hb F Desnaturalizada

N 8 : //

N 7 : Hb F

N 6 : //

N 5 : Hb D-Punjab, Hb G-Philadelphia, Hb Korle-Bu

N 4 : Hb S, variantes de la cadena Gamma acetiladas

N 3 : Hb E, Hb F-Ouled Rabah, variantes de la cadena Gamma, Metahemoglobina.

N 2 : Hb A2, Hb O-Arab, Hb F-Ouled Rabah.

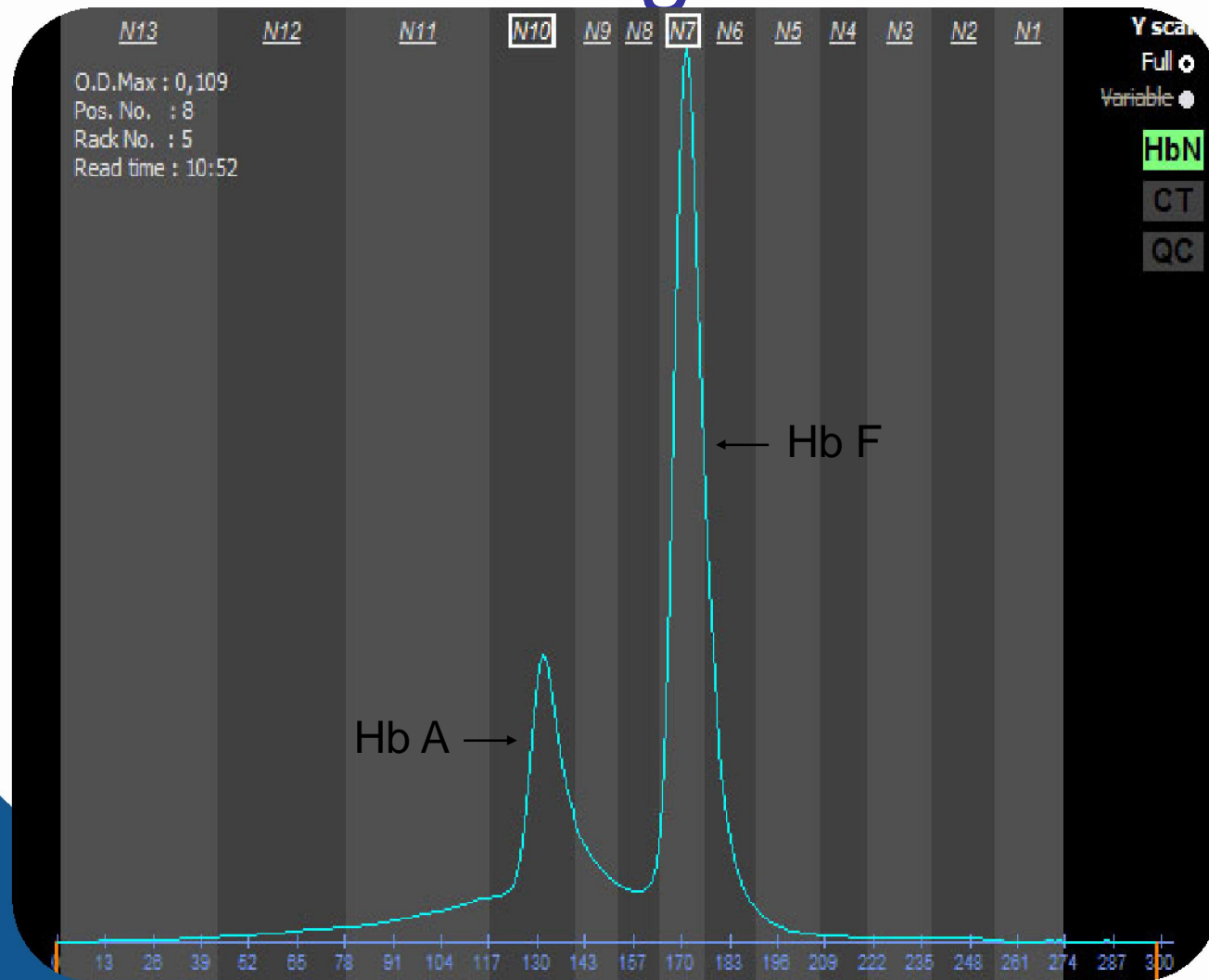
N 1 : Hb C



Recién Nacidos Normales



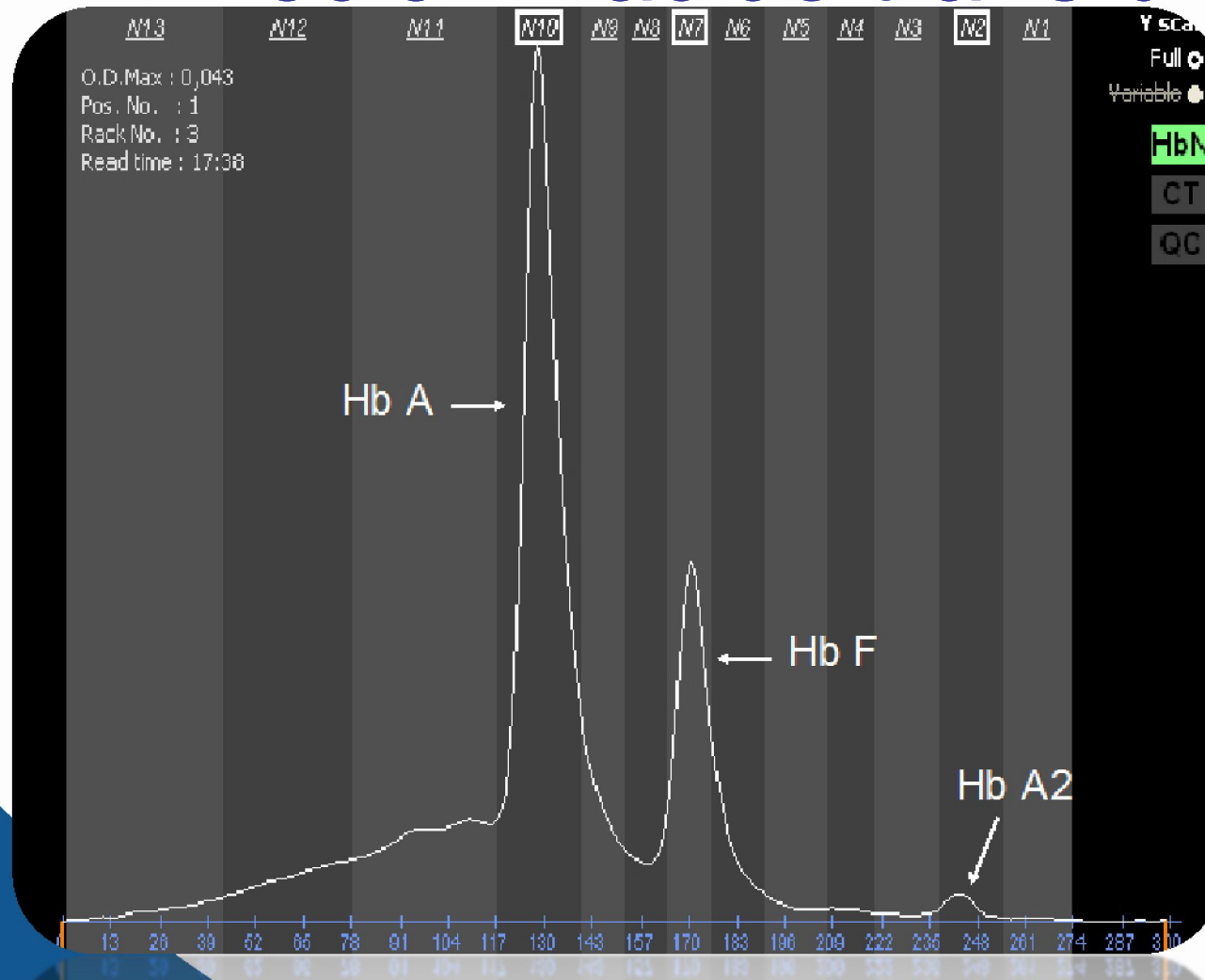
Sangre Normal



Nacimiento:
19/01/06
Toma de muestra:
24/01/06
Talla : 39 w.
Peso : 3445 g



Recién Nacido transfundido



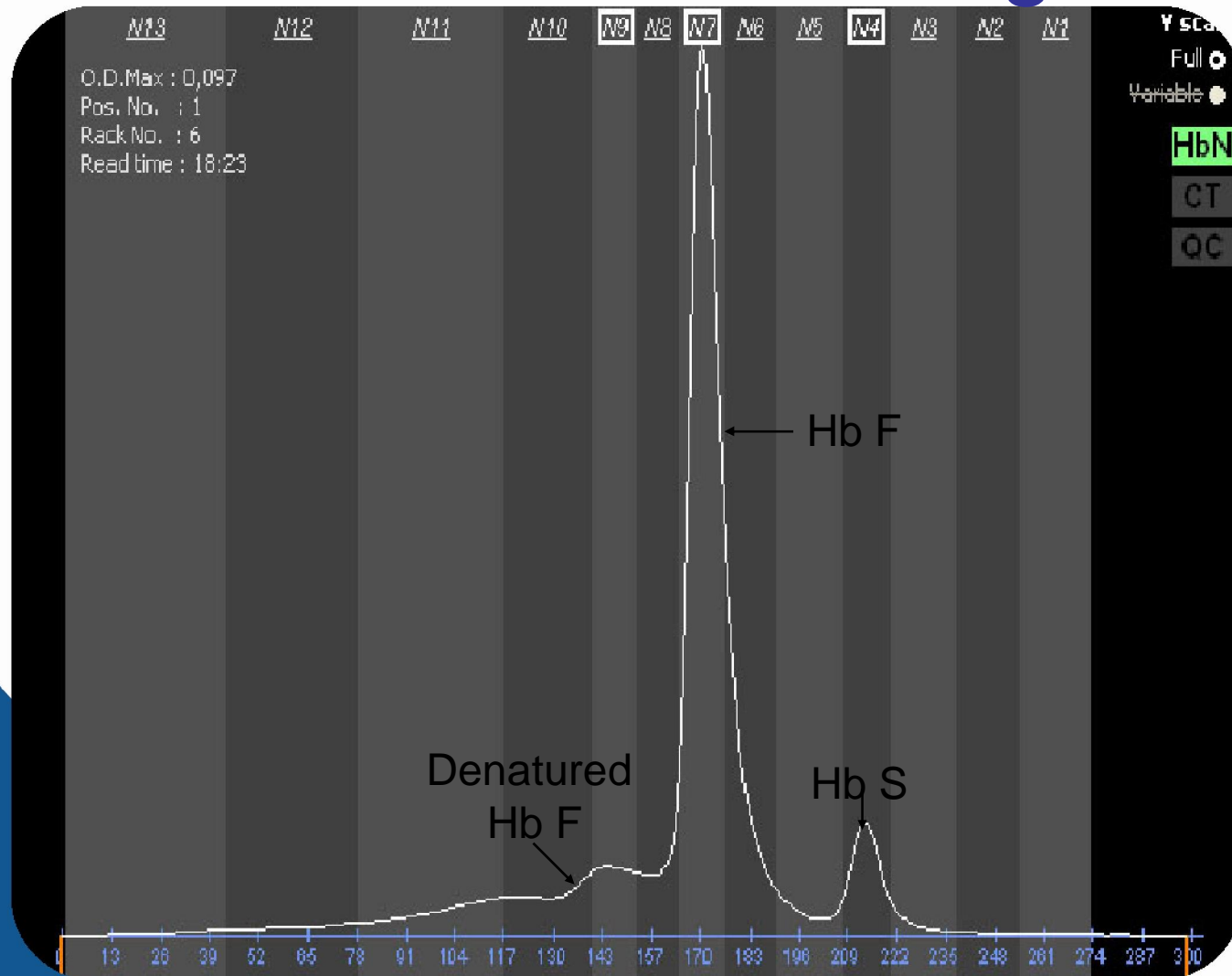
Nacimiento:
29/01/06
Toma de muestra:
01/02/06
Talla : 38 w.
Peso : 3100 g



Enfermedades y rasgos comunes



F/S homocigoto



Nacimiento:

05/01/06

Toma de muestra:

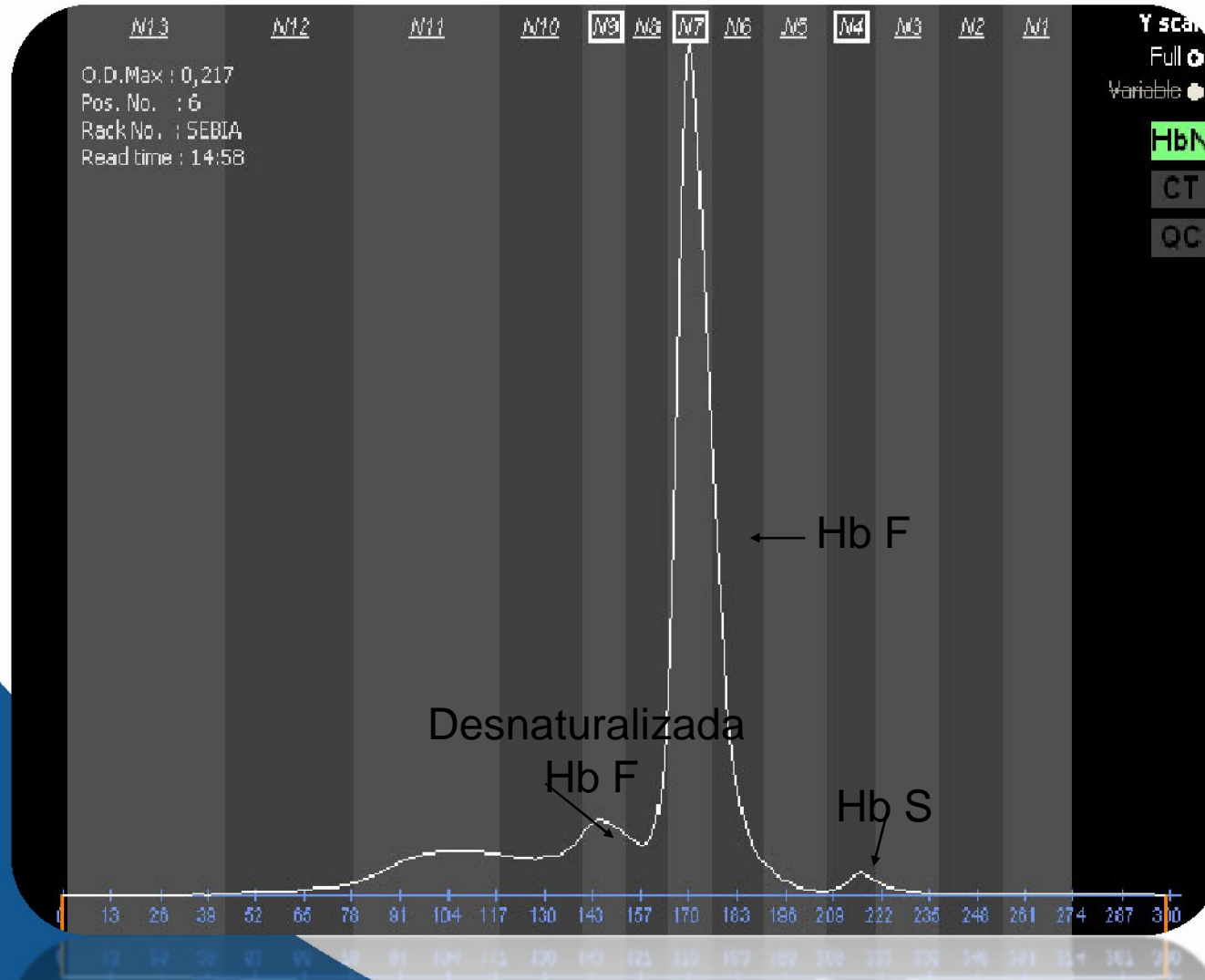
08/01/06

Talla: 37 w.

Peso : 3490 g



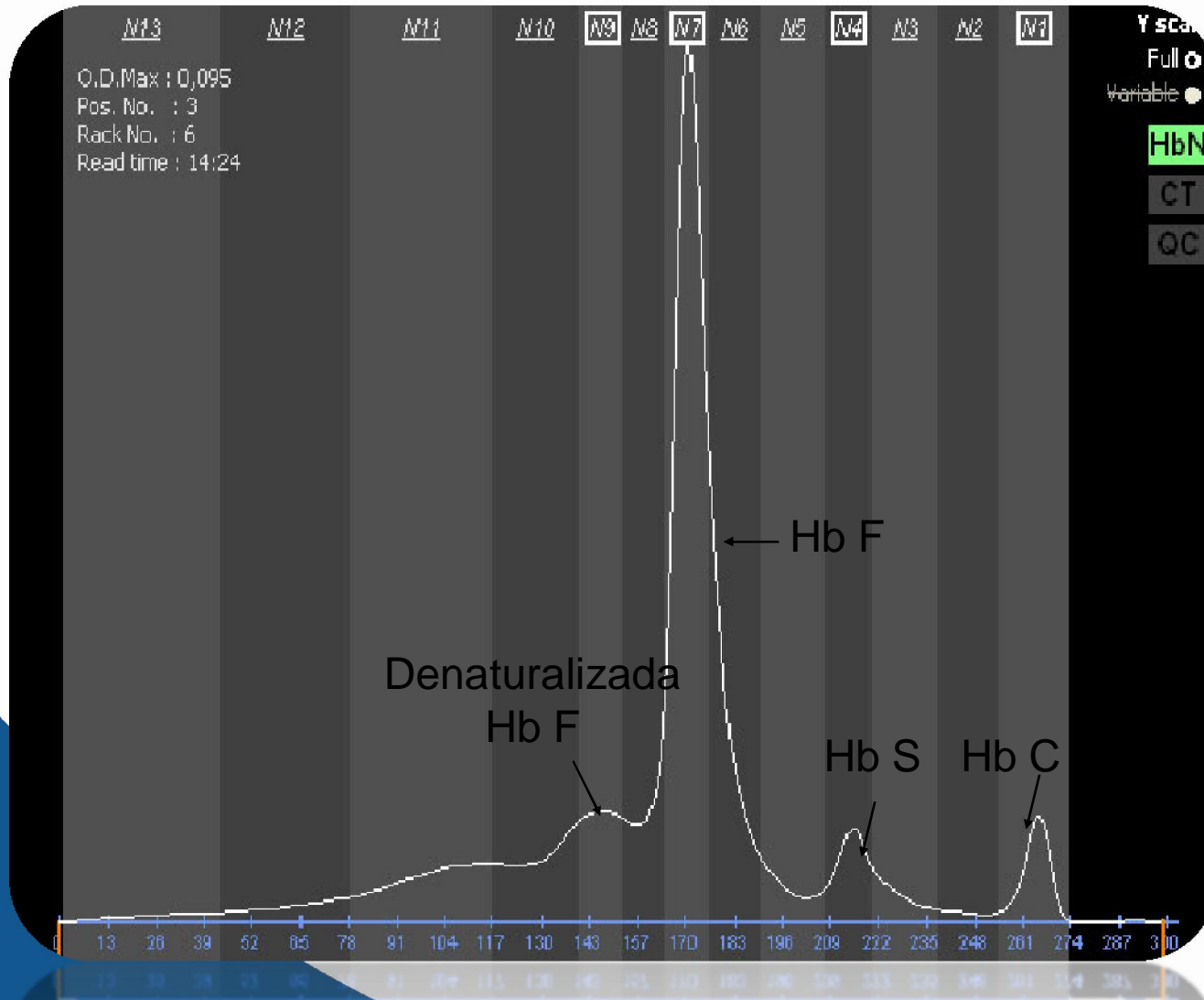
F/S en recién nacido prematuro



Nacimiento:
20/02/06
Toma de muestra:
23/02/06
Talla: 34 w.
Peso: 1300 g



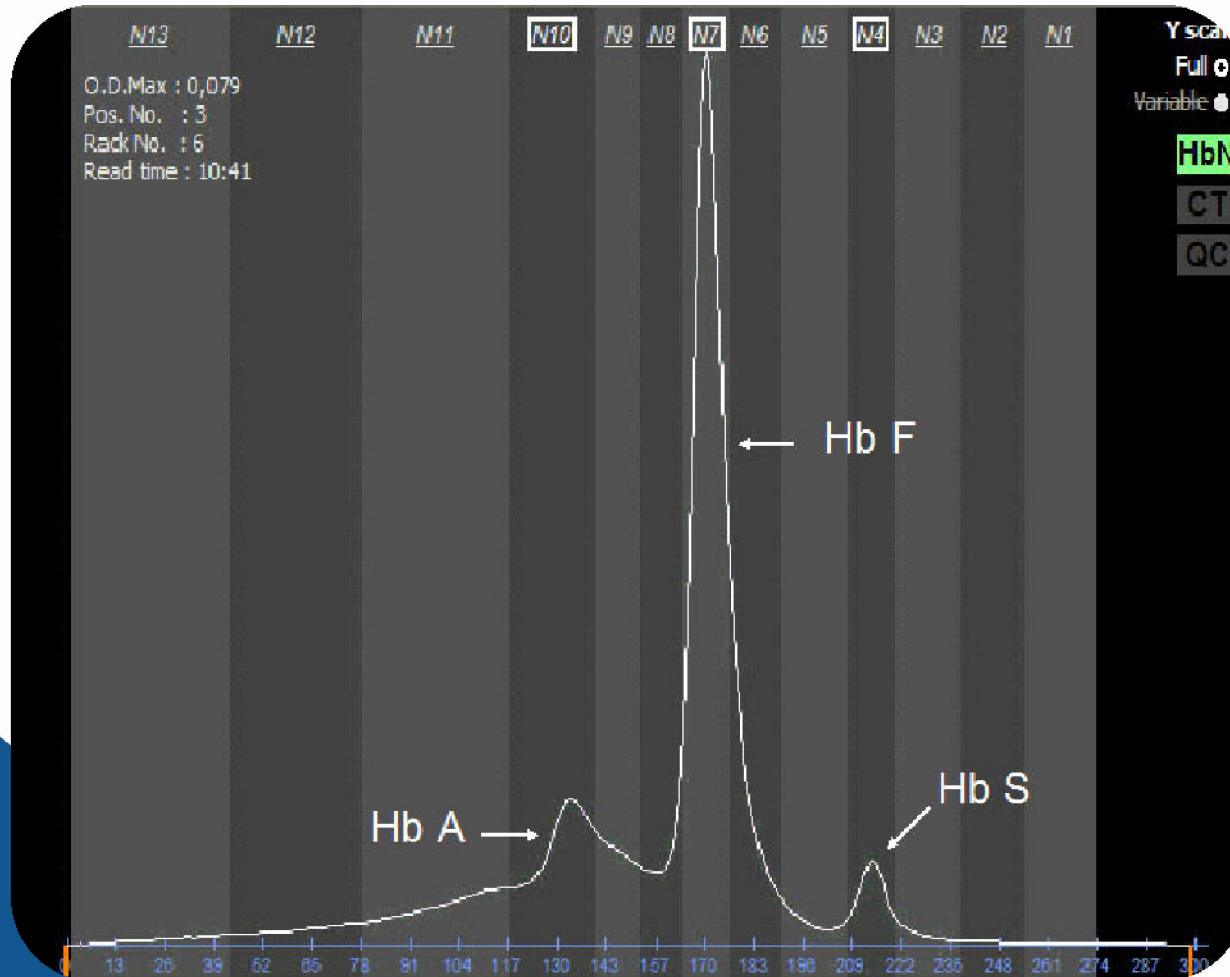
F/SC componente heterocigoto



Nacimiento:
30/01/06
Toma de muestra:
02/02/06
Talla: 40 w.
Peso: 3900 g



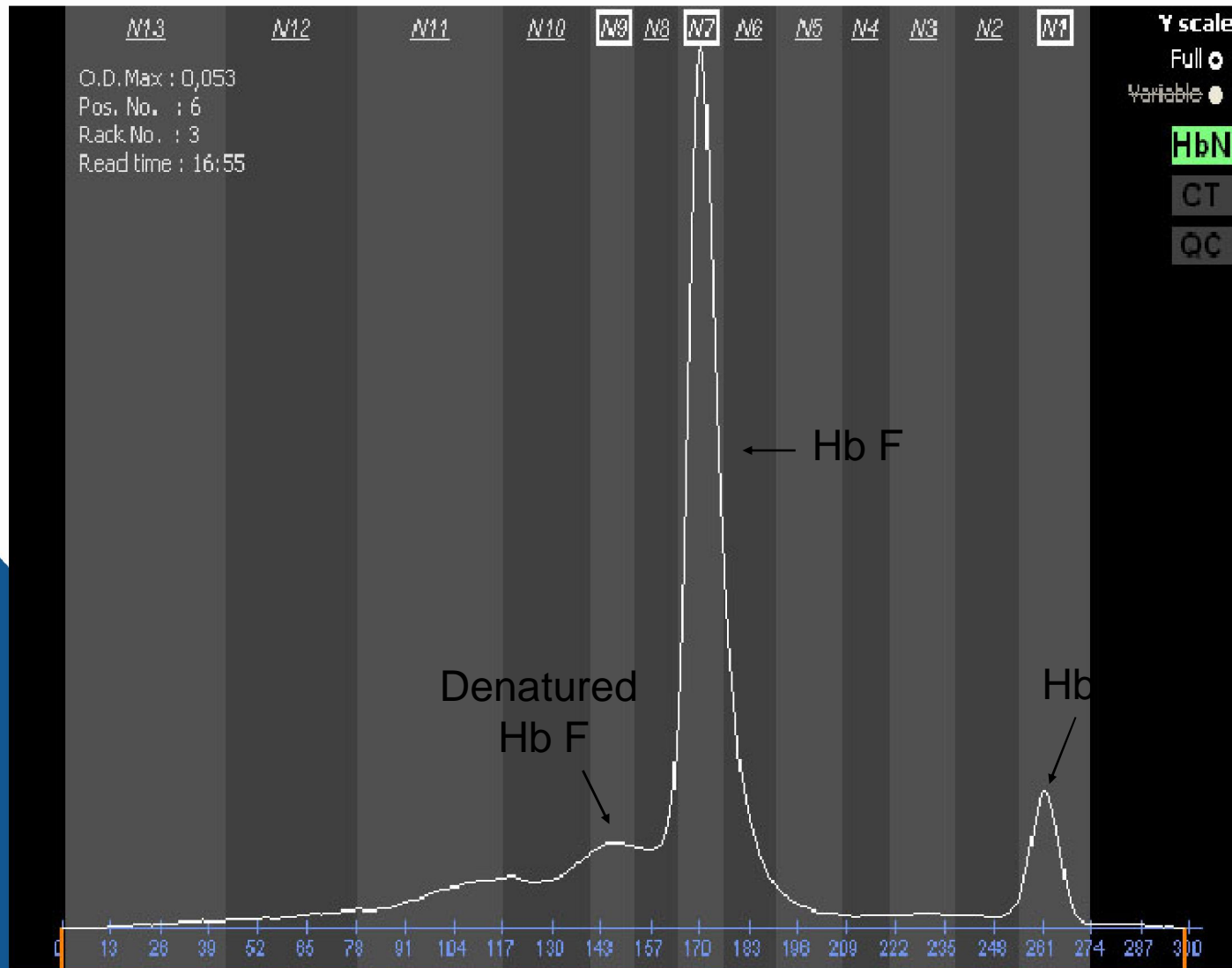
F/AS heterocigoto



Nacimiento:
16/12/06
Toma de muestra:
19/12/06
Talla: 36 w.
Peso: 2780g



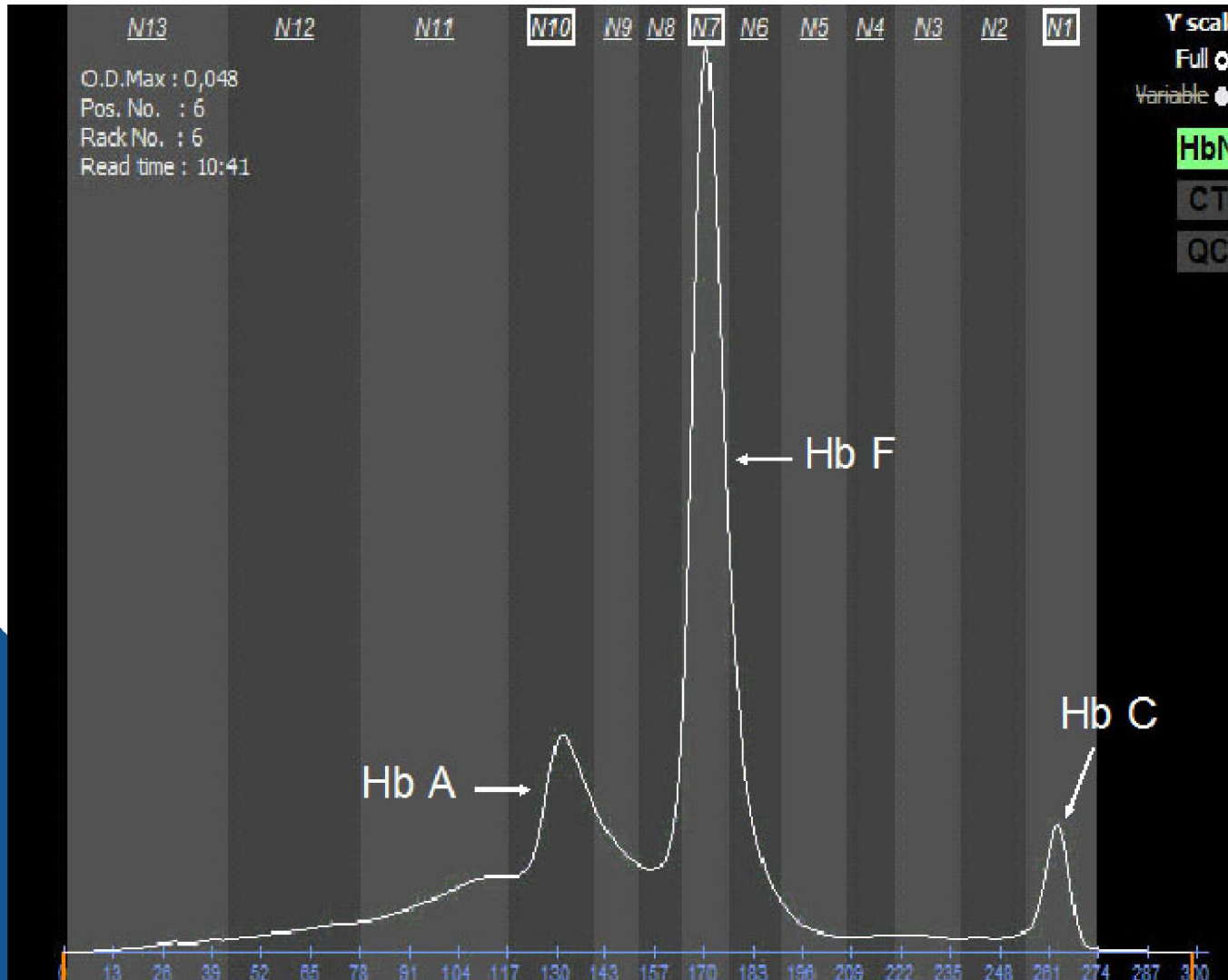
F/C homocigoto



Nacimeinto:
20/12/05
Toma de muestra:
24/12/05
Talla: 39 w.
Peso: 3160 g



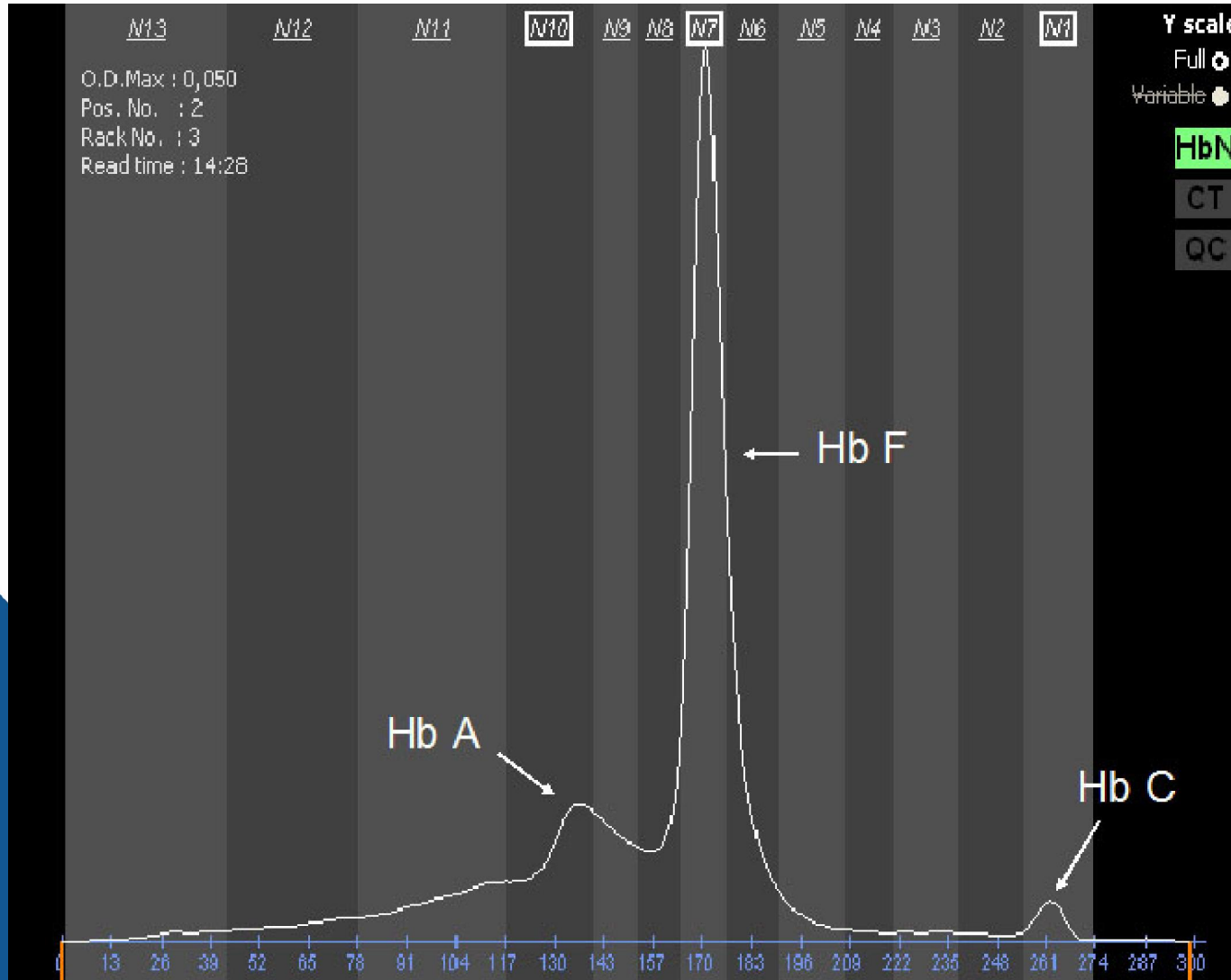
F/AC heterocigoto



Nacimiento:
18/12/06
Toma de muestra:
21/12/06
Talla: 40 w.
Peso: 3035 g



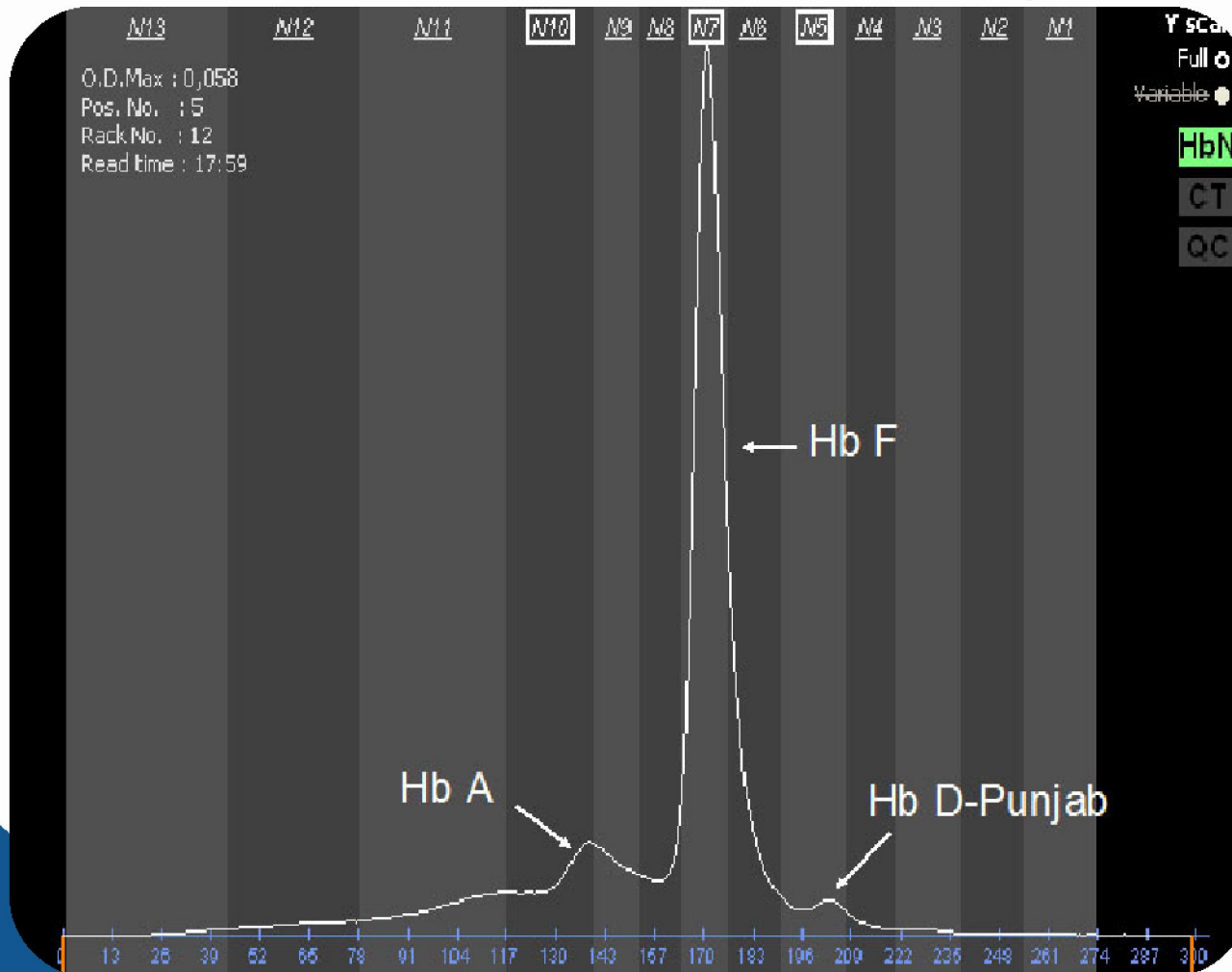
F/AC en un recién nacido prematuro



Nacimiento:
17/10/05
Toma de muestra:
20/10/05
Talla: 30 w.
Peso: 2330 g



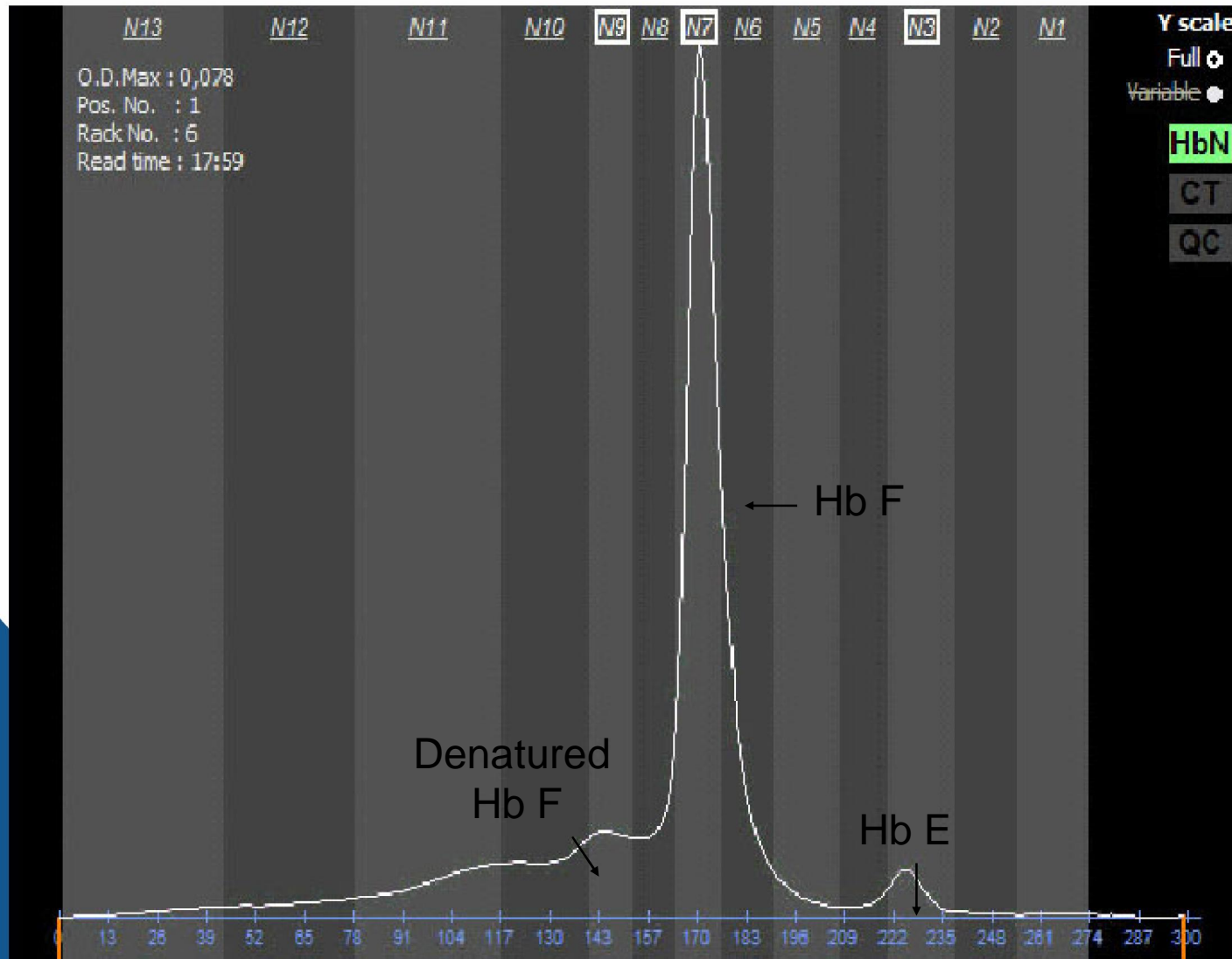
F/AD heterocigoto



Nacimiento:
29/01/06
Toma de muestra:
31/01/06
Talla: 37 w.
Peso: 3280 g



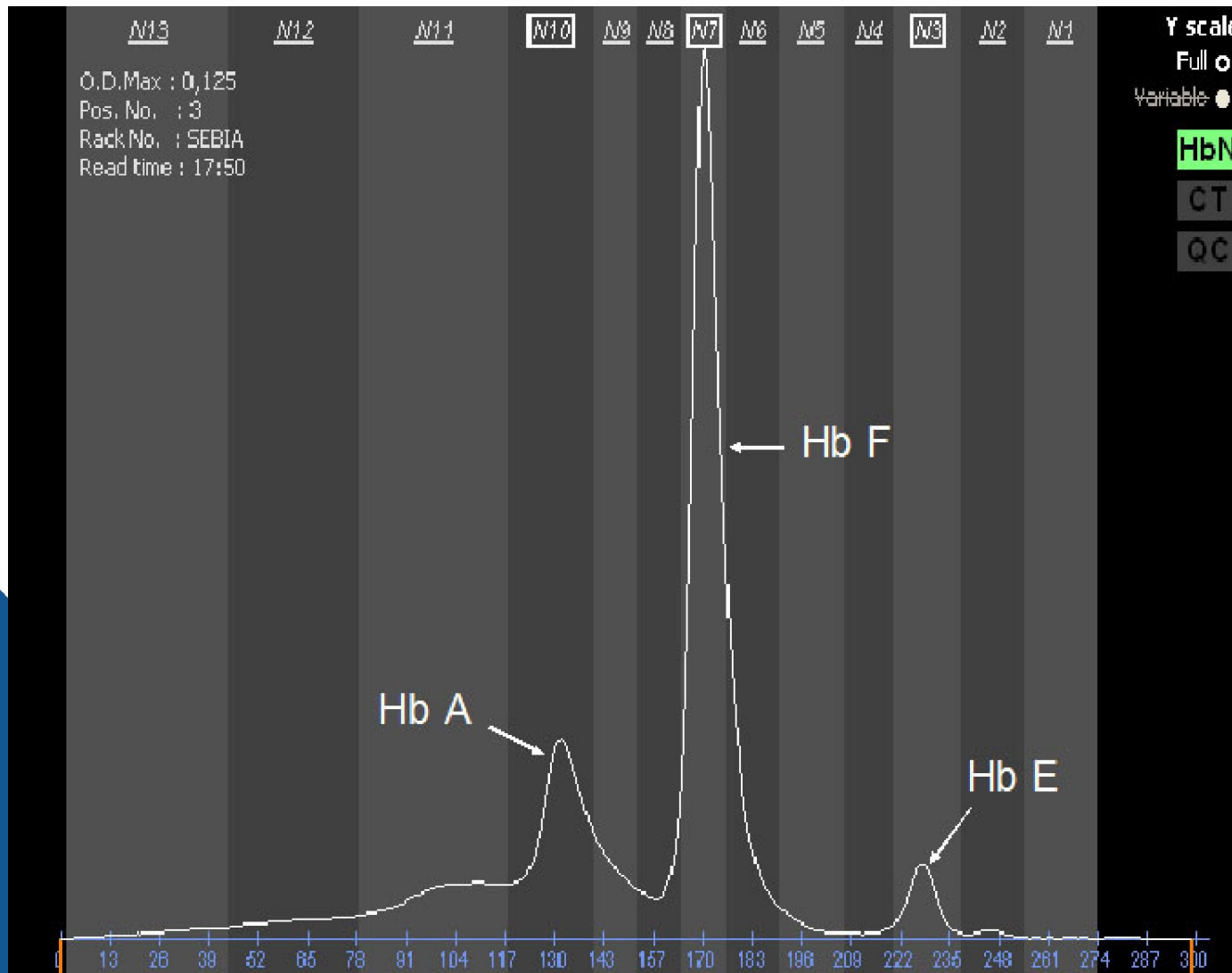
F/E homocigoto



Nacimiento:
10/11/06
Toma de muestra:
13/11/06
Talla: 40 w.
Peso: ?



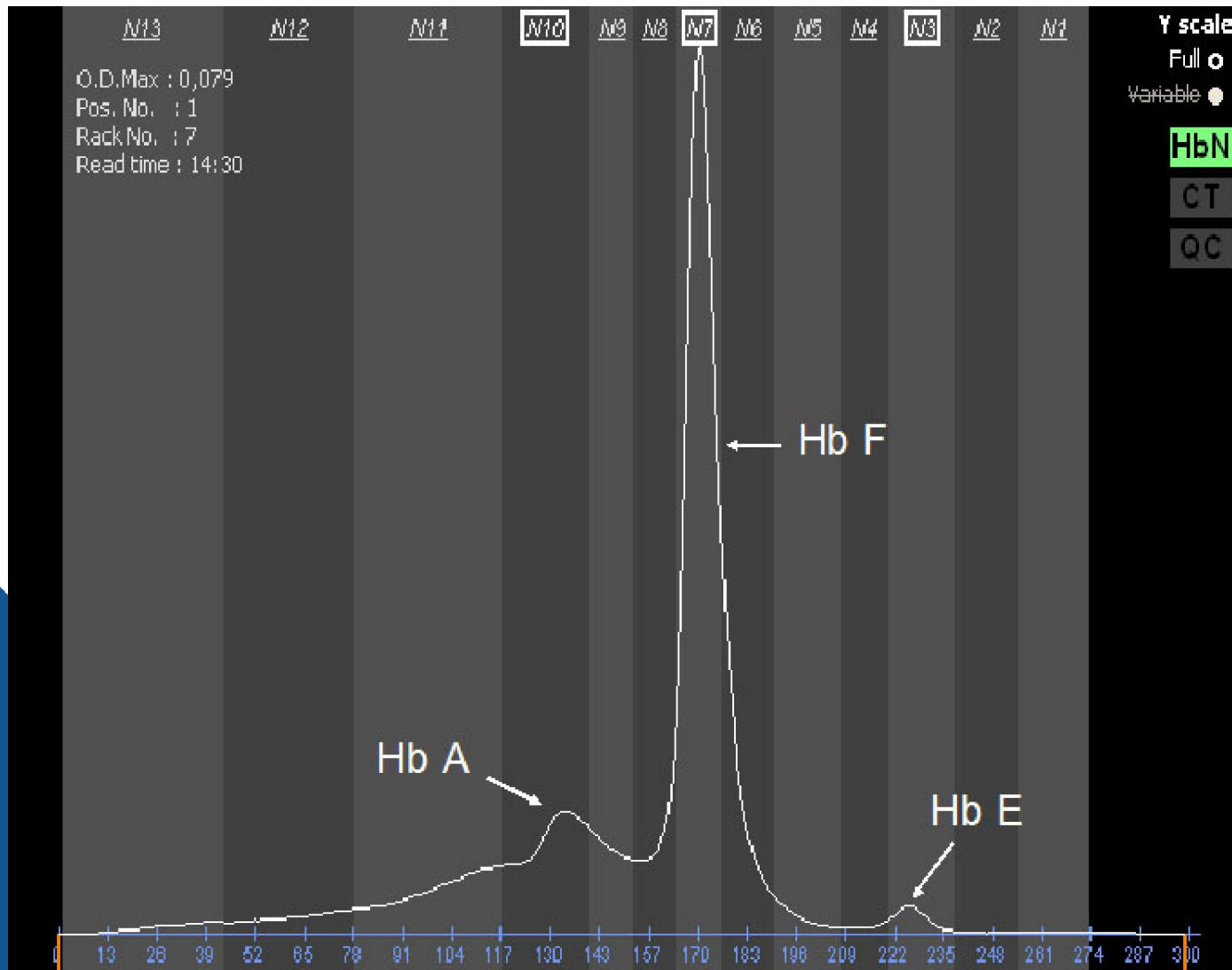
F/AE heterocigoto



Nacimiento:
10/03/06
Toma de muestra:
13/03/06
Talla: 39 w.
Peso: 3420 g



F/AE en un recién nacido prematuro



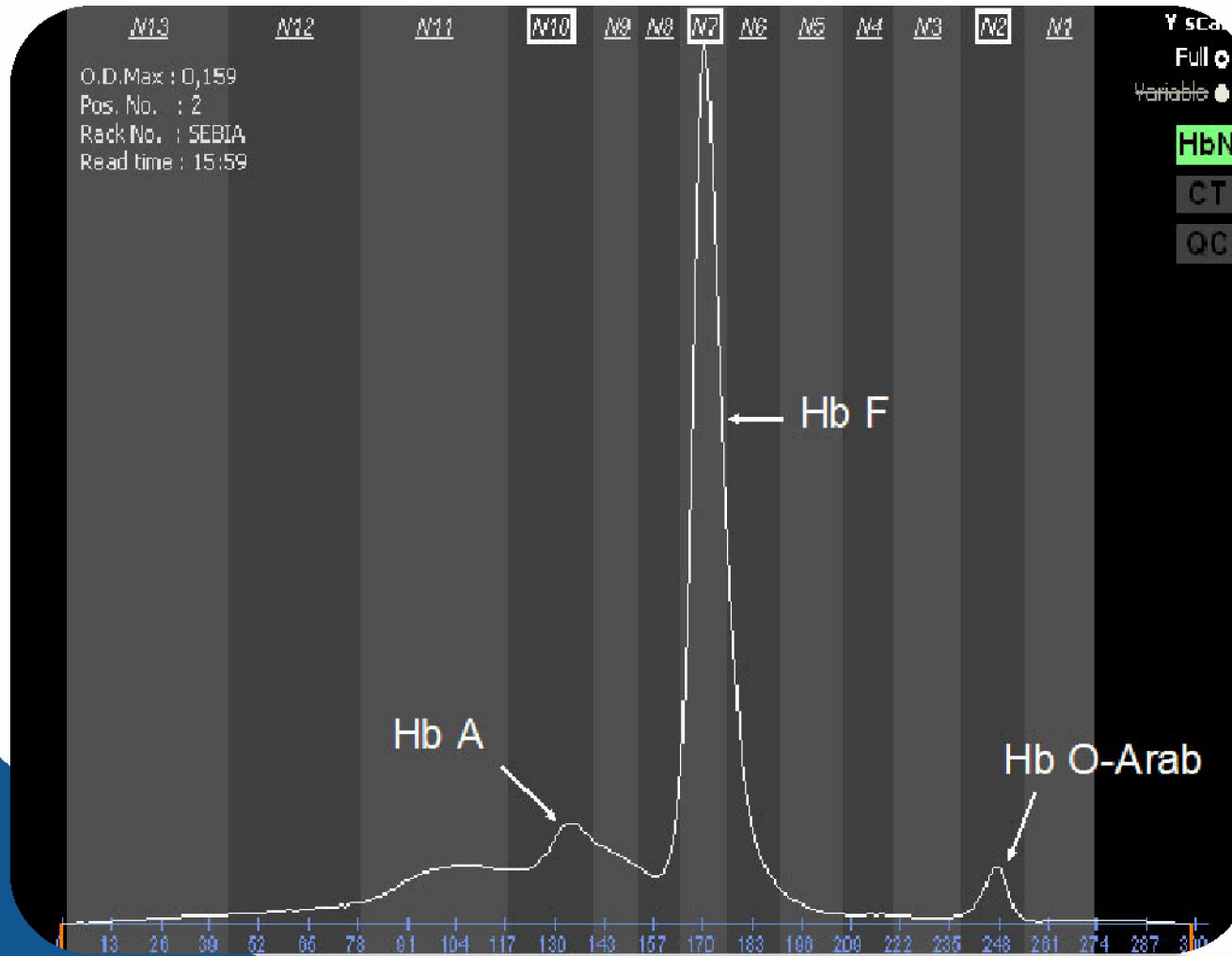
Nacimiento:
21/07/05
Toma de muestra:
24/07/05
Talla: 35 w.
Peso: 1840 g



Variantes Clínicas silentes variantes de Cadenas-beta



F/A0-Arab heterocigoto



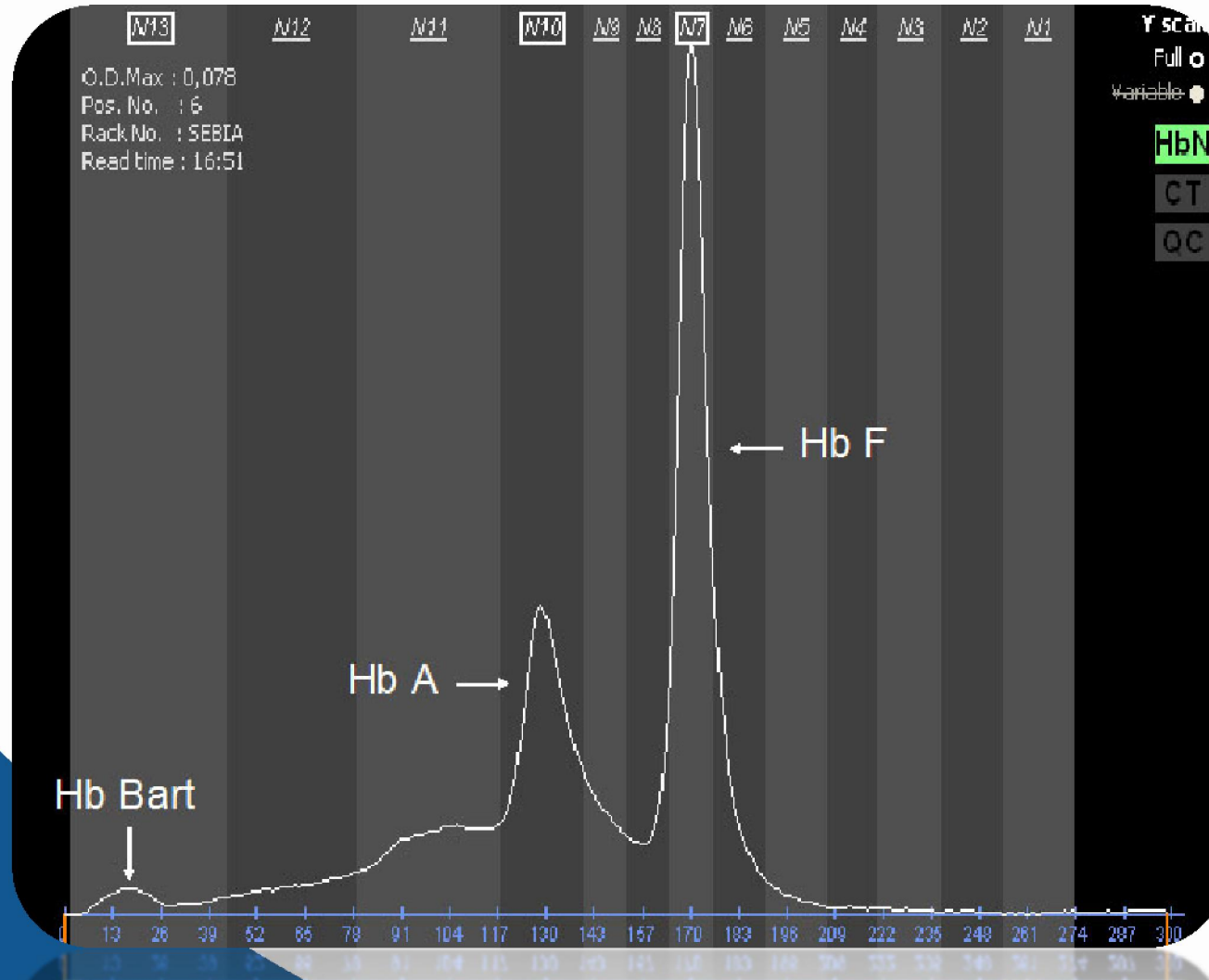
Nacimiento:
14/02/06
Toma de muestra:
17/02/06
Talla: 40 w.
Peso: 3120 g



Alfa-talasemia



Bart en recién nacido a término



Nacimiento:
05/04/06
Toma de muestra:
08/04/06
Talla: 38 w.
Peso: 2790 g



seleção

EUROPA
AFRICA
BRASIL
COLOMBIA ????

GRACIAS



Diagnóstica Import S.A.S.

Sofía Moscoso Velosa

Product Manager

Sofia.moscoso@annardx.com

www.annardx.com