



Fundación
J. L. Castaño
Para el desarrollo del Laboratorio Clínico

**EDUCACIÓN CONTINUADA
EN EL LABORATORIO CLÍNICO**
Ed Cont Lab Clín; 28: 53-71

SEQC^{ML}
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2016-2017

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS.

Dr. Cristian Morales-Indiano.

*Laboratori Unificat Metropolitana Nord (LIMN).
Hospital Germans Trías i Pujol. Badalona.*

INTRODUCCIÓN

Las hemoglobinopatías constituyen las enfermedades monogénicas más frecuentes y un importante problema de salud pública en determinadas áreas del mundo. Aproximadamente el 7 % de la población mundial es portadora de genes causantes de hemoglobinopatías y se estima que cada año nacen más de 500,000 niños con hemoglobinopatías graves. Consisten en unas enfermedades genéticas de herencia autosómica recesiva que afectan a las cadenas de globina, en la molécula de hemoglobina. Las hemoglobinopatías se pueden categorizar en dos principales grupos: 1) las talasemias (alteración cuantitativa) y 2) las hemoglobinas variantes o estructurales (alteración cualitativa). Debido a los flujos de migración ocurrido en las últimas décadas, las hemoglobinopatías han dejado de ser endémicas en determinadas zonas como África, Sur de Europa, Oriente Medio y Asia para estar presentes ampliamente en todo el mundo, incluyendo el continente Americano, Australia, Europa occidental y más recientemente el Norte de Europa (Figura 1). Este incremento notable de la prevalencia de las hemoglobinopatías en nuevas áreas obliga a disponer de herramientas para su detección, diagnóstico, prevención y tratamiento. El laboratorio clínico juega un papel crucial en el correcto diagnóstico de las hemoglobinopatías, disponiendo de gran cantidad de técnicas que, junto a su avance tecnológico, permite la detección de la gran mayoría de hemoglobinopatías. En el presente documento se aborda las principales características de aquellas hemoglobinopatías más frecuentes, así como las técnicas de laboratorio de primera línea utilizadas más frecuentemente en su screening y diagnóstico.

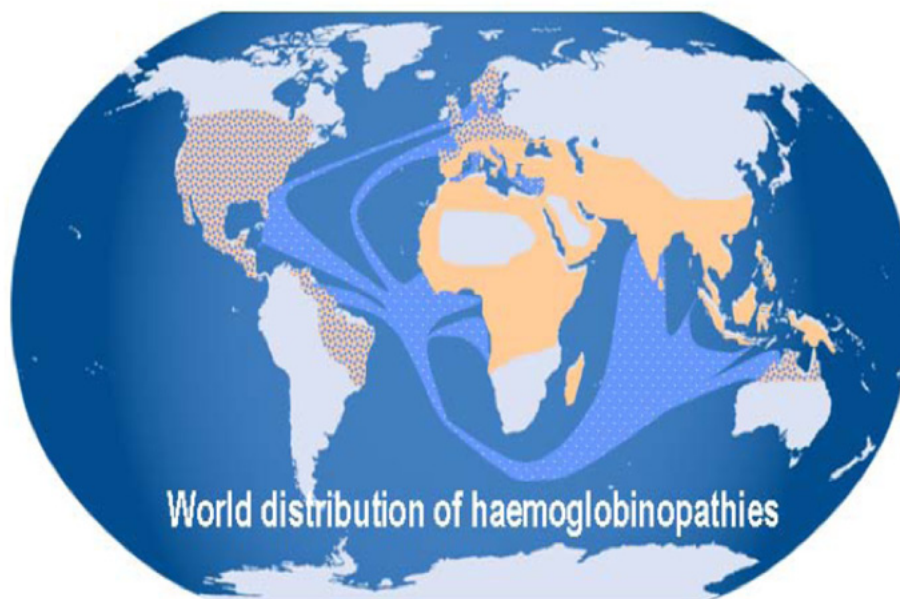


Figura 1: Distribución mundial de las hemoglobinopatías y la influencia del flujo migratorio en su incremento en determinadas zonas. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:13.

SÍNTESIS DE HEMOGLOBINAS

La molécula de hemoglobina (Hb) es un tetrámero formado por 2 pares de cadena de globina junto a un grupo hemo unido a cada cadena. Dependiendo de la combinación entre los tipos de globina se sintetizan diferentes hemoglobinas, tales como la Hb fetal (HbF), la HbA y la HbA₂. La HbF está compuesta por 2 cadenas gamma (γ) y 2 cadenas alfa (α), y pasa de ser la mayoritaria durante la etapa de gestación (constituye entre el 90-95 % de las hemoglobinas), a representar menos del 2-3 % a los 6 meses de edad. La HbA (formada por 2 cadenas α y 2 cadenas β) por el contrario, y debido al switch fisiológico de las síntesis de cadenas, es la mayoritaria a partir del sexto mes de edad (Figura 2). La HbA₂ formada por 2 cadenas α y 2 cadenas deltas (δ) por su parte se sintetiza en pocas cantidades desde el nacimiento, manteniendo una concentración estable minoritaria a partir del sexto mes entre 2,5-3,5 %.

TALASEMIAS

Las talasemias son un conjunto de enfermedades genéticas que afectan a los genes de las cadenas de globina produciendo una disminución o ausencia en la síntesis de una o más cadenas de globina. Esta disminución/ausencia de cadenas de globina produce una reducción de la formación de las hemoglobinas de la cual forman parte, originando un hematíe de menor tamaño (microcítico) y con menor contenido de hemoglobina (hipocromo). En contraposición existirá un aumento de aquellas hemoglobinas en las que la cadena de globina afectada no forma parte, ayudándonos en el diagnóstico diferencial. Las talasemias son frecuentes en países del Mediterráneo, Sudeste de Asia, Oriente Medio, África e India. Una de las maneras de clasificar las talasemias es según la cadena de globina afectada.

tada. De este modo una α o β -talasemia (mayoritarias) se originaría si la mutación afecta al gen de la α o β globina respectivamente, pero también puede tener lugar una δ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ y $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemias (menos frecuentes) si se afecta otro tipo de cadena de globina. Además del tipo de cadena afectada, en las talasemias la síntesis de cadena de globina puede estar ausente representándose como α^0 , β^0 , δ^0 , etc. o disminuida como $\alpha+$, $\beta+$, $\delta+$, etc.

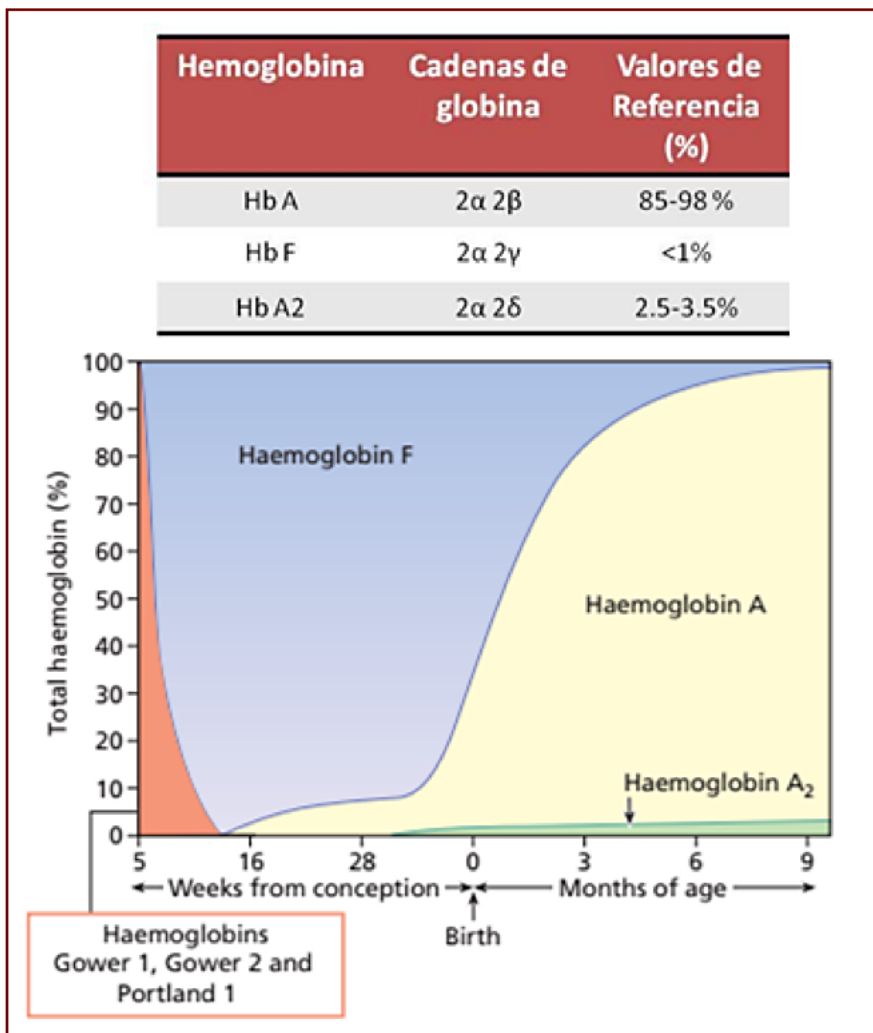


Figura 2: Características de las hemoglobinas presentes en la edad adulta y su variación en los principales tipos de talasemia. *Adaptado de Bain B. Hemoglobinopathy diagnosis, 2006.*

La observación morfológica de las talasemias es de gran ayuda, revelando una microcitosis con hipocromía. Los valores cuantitativos obtenidos en el hemograma (elevación del número de hematíes junto a microcitosis) también son de ayuda para la sospecha de una talasemia, aunque no siempre. La anemia puede estar o no presente. En algunos casos la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) está aumentada reflejando una anisocitosis. También se observa poiquilocitosis con presencia de eliptocitos, dianocitos, punteado basófilo y en ocasiones dacriocitos y algún eritroblasto circulante. La reticulocitosis es relativamente frecuente debido a la hemólisis crónica. Estos hallazgos morfológicos junto a los valores hematimétricos obtenidos estarán más o menos acentuados dependiendo del tipo

de talasemia y de la mutación responsable (Figura 3). El diagnóstico de β y $\delta\beta$ -talasemias se puede realizar a partir de la combinación de los resultados aumentados de la HbA2 y/o HbF obtenidos principalmente por HPLC, aunque también por EC (electroforesis capilar). En cambio para el diagnóstico de las α -talasemias es necesario el uso de técnicas moleculares.

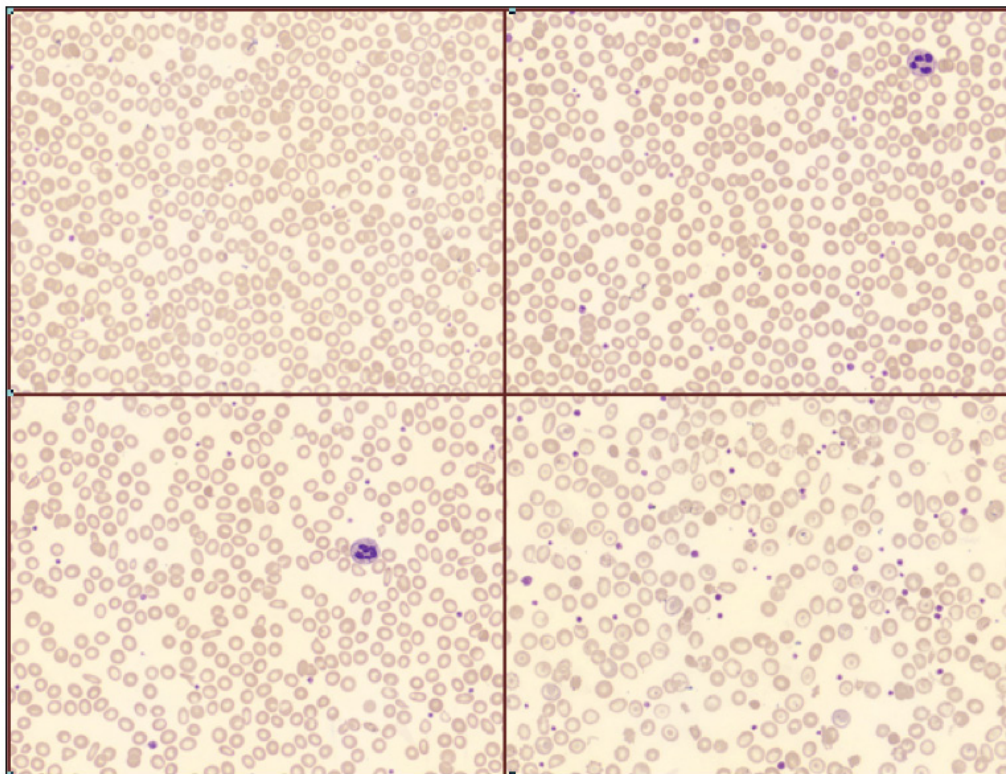


Figura 3: Representación morfológica de diferentes tipos de talasemias mostrando diferentes grados de alteraciones de la morfología eritrocitaria.

β -talasemias

Las β -talasemias resultan de la síntesis reducida (β^+) o ausente (β^0) de cadenas β -globina. Las cadenas de β -globina están codificadas por el gen HBB (gen β) incluido en la familia de genes β y situado en un cluster de 45 kilobases (kB) en la sección 15.5 del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) (Figura 4). Se han descrito alrededor de 400 mutaciones en el gen HBB responsables de las β -talasemias, siendo molecularmente de una elevada heterogeneidad genética.

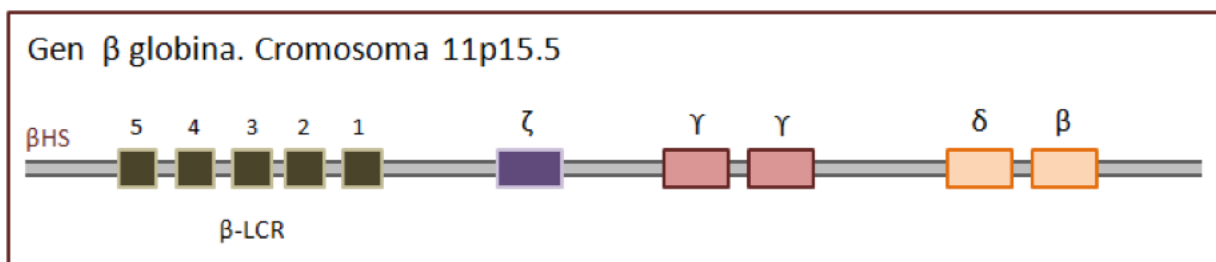


Figura 4: Representación del gen de la b-globina situado en el cromosoma 11.

Según el tipo de β -talasemia se pueden originar cuatro cuadros clínicos de menor a mayor gravedad: portador silente, rasgo talasémico, talasemia intermedia y talasemia mayor. El portador silente no muestra alteraciones clínicas ni hematológicas presentando un hemograma anodino, mientras que en la talasemia menor (rasgo talasémico o β -talasemia heterocigota) se observa una microcitosis, hipocromía y anemia en algunos casos, siendo clínicamente asintomática. En la talasemia intermedia por su parte, la disminución de la hemoglobina es más marcada (Hb: 7-10 g/dL) con valores también más disminuidos para el VCM y la HCM. Debido al desbalance de cadenas se observa una eritropoyesis ineficaz y hemólisis crónica con aumento de reticulocitos. Por último la talasemia mayor o anemia de Cooley, enfermedad con ausencia de cadenas β , presenta una manifestación clínica con anemia severa (Hb<7g/dL), hepatoesplenomegalia, retraso en el crecimiento y deformidades óseas.

El diagnóstico de las β -talasemias se basa en el aumento de la concentración de la HbA2 (>3,5 %) debido a un aumento en la síntesis de cadena δ como consecuencia de la mutación en el gen HBB. Los valores para la HbA2 pueden oscilar entre 3,5 % y 8,5 %, y por encima de este valor hay que sospechar de la presencia de una hemoglobina variante y no de una β -talasemia. Hay que tener presente que existe un porcentaje de β -talasemias con valores de HbA2 dentro de la normalidad. En aproximadamente el 50% de los casos de β -talasemias la HbF puede estar aumentada, dependiendo del tipo de mutación. En la mayoría de laboratorios, para la cuantificación de los porcentajes de HbA2 y HbF se utilizan técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la electroforesis capilar (EC).

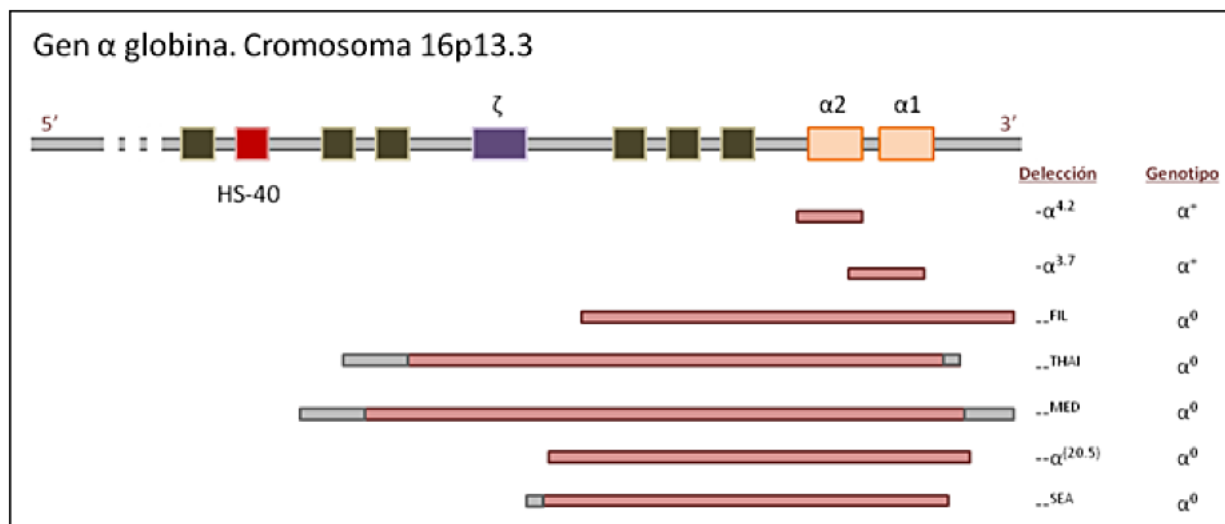


Figura 5: Representación de la familia de genes que forman parte del cluster para la α -globina junto las principales deleciones observadas en las α -talasemias y los genotipos que representan.

α -talasemias

Las cadenas de α -globina están codificados por 2 genes α , HBA1 ($\alpha 1$) y HBA2 ($\alpha 2$), situados en una región denominada alpha globin gene cluster de la sección 13.3 del brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3), dando lugar a 4 genes α en total (genotipo normal: $\alpha\alpha/\alpha\alpha$).

La familia de genes para la α -globina requiere la presencia de un elemento regulador denominado HS-40 para su correcto funcionamiento (Figura 6).

La pérdida de un gen α ($-\alpha/\alpha\alpha$) daría lugar a la α^+ -heterocigota, la pérdida de 2 genes a una α^+ -homocigota ($-\alpha/-\alpha$), si son genes de diferentes cromosomas o a una α^0 -heterocigota ($-/-\alpha$) si están en el mismo cromosoma los 2 genes afectados. De este modo, si faltan 3 genes α ($-/-\alpha$) nos encontramos frente a lo que se conoce como enfermedad de la HbH y si faltan los 4 genes α ($-/-/-$) o α^0 -homocigota, frente a la hidropesía fetal por hemoglobina de Bart (Figura 6). Las α -talasemias pueden resultar de una delección (más frecuente) o de una mutación no deleccional (generalmente más severa) en uno o ambos genes α . Las principales mutaciones (Figura 5) que dan lugar al rasgo talasémico (α^+ -talasemia) resultan de la delección de pocas kilobases (kb) que afectan todo o a una parte del gen HBA2 ($\alpha 2$). Las delecciones más comunes en el área mediterránea corresponden a la delección $-\alpha$ 3.7 de 3.7 kb y la $-\alpha$ 4.2 de 4.2 kb. En el caso de α^0 -talasemias las delecciones son mucho más grandes, llegando a más de 100 kb y afectando a los 2 genes α simultáneamente debido a la proximidad entre ellos. La α^0 -talasemia es frecuente en el Sudeste de China y en otras poblaciones del Sudeste de Asia como Tailandia, Filipinas o Vietnam, entre otras. Las principales delecciones en el Sudeste Asiático son la $--$ SEA, $--$ FIL y $--$ THAI, mientras que en el área del Mediterráneo las delecciones más frecuente son la $--$ MED y la $-\alpha$ (20.5).

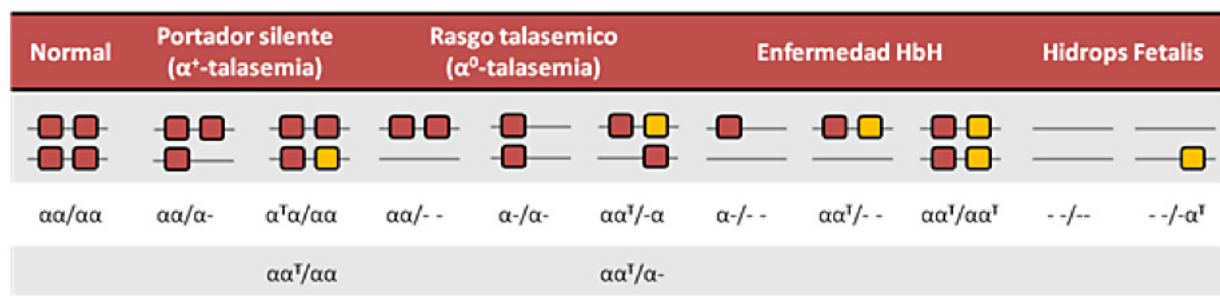


Figura 6: Diferentes genotipos para los tipos de α -talasemia.

Respecto al hemograma, el rasgo talasémico presenta una discreta microcitosis e hipocromía (más marcada en la β -talasemia) con valores de VCM $< 75-80$ fL y HCM < 25 pg, muchas veces solapándose con valores dentro de la normalidad. Dependiendo de los genes afectados, más en α^0 -heterocigota que en α^+ -heterocigota, el VCM, el HCM y la hemoglobina están más alterados. La realización de técnicas como el HPLC o la electroforesis no permite detectar la presencia de una α -talasemia, ya que en una α -talasemia la disminución de la síntesis de cadena α afectaría a las tres hemoglobinas de las que forma parte (HbA, HbF y HbA2). Es por ello que su detección debe realizarse por técnicas moleculares como PCR-Gap, MLPA (*high resolution ligation-dependent probe amplification*), Southern blot o secuenciación. De todos modos, una reducción del nivel de HbA2, en ausencia de ferropenia y un hemograma con microcitosis e hipocromía puede indicar una posible α -talasemia, ya que la concentración de la HbA2 es lo suficientemente estable y minoritaria para evidenciar los cambios de síntesis de cadena (en la HbF y HbA no serían tan marcados porque su porcen-

taje es mayor). Solo la presencia de la HbH o Hb de Bart pueden ser detectadas por HPLC o EC al tratarse de hemoglobinas anómalas de elución rápida formadas por tetrámeros de cadena beta (b4) o gamma (4g) respectivamente.

$\delta\beta$ -talasemia

Las mutaciones en este tipo de talasemias afectan a los genes β (HBB) y δ (HBD) (Figura 4). Son menos frecuentes que las β -talasemias pero de igual complejidad molecular. Al no estar afectado el gen γ , los pacientes afectados de una $\delta\beta$ -talasemia presentan una elevación en la síntesis de HbF ($2\alpha_2\gamma$) entre un 5-20 % con niveles de HbA2 normal (heterocigoto) o disminuido (homocigoto). Se puede detectar por electroforesis pero su cuantificación se debe realizar mediante HPLC o EC. El estado heterocigoto fenotípicamente es similar al rasgo β -talasemia, mostrando en el hemograma una hemoglobina entre 8-13 g/dL con microcitosis, hipocromía, un RDW incrementado (en las β -talasemias no siempre) y reticulocitosis. Las características morfológicas también son similares a las halladas en las β -talasemias. El estado homocigoto se comporta como una talasemia intermedia y no como una mayor debido a su concentración de HbF alrededor del 100 %, presenta una anemia más o menos severa (Hb: 9-10 g/dL), con reticulocitosis por hemólisis crónica y presencia de esplenomegalia en algunos casos.

HEMOGLOBINAS VARIANTES

En la actualidad hay descritas más de 1200 variantes estructurales de hemoglobinas, debido principalmente a un cambio de aminoácido. Este cambio aminoacídico puede alterar las características fisicoquímicas de la variante condicionando su solubilidad, estabilidad, afinidad por el oxígeno y función fisiológica siendo responsables de las manifestaciones clínicas de los pacientes afectados. La hemoglobina S (HbS) es la hemoglobinopatía estructural más frecuente, seguida de la HbC, HbD, HbE y Hb Lepore. Las guías internacionales recomiendan realizar el diagnóstico de la presencia de hemoglobinas variantes mediante dos métodos distintos. Los métodos más utilizados son el HPLC, electroforesis alcalina y ácida, isoelectroenfoque o test de falciformación, entre otros. En ocasiones la combinación de estos métodos no es suficiente y se requiere la confirmación molecular para poder tipificar la hemoglobina anómala estructural.

Hemoglobina S

La hemoglobina S es la hemoglobinopatía más frecuente en el mundo teniendo una mayor incidencia en África, Oriente Medio, India y la cuenca del Mediterráneo, aunque en la actualidad está mucho más extendida. En 1947, L. Pauling sugirió que la HbS podría tratarse de una enfermedad molecular, siendo el resultado de una mutación en el gen de la β -globina que comporta un cambio de aminoácido en la posición 6 de una valina en lugar de un ácido glutámico (β_6 Val-Glu). En situaciones de oxigenación la HbS es igual de soluble que la HbA, pero en ausencia de oxígeno la solubilidad de la HbS disminuye precipitando en forma de

polímeros. Estos polímeros distorsionan la forma bicóncava del hematíe produciendo un aspecto de media luna, falciforme o en forma de hoz característicos. La formación de polímeros falciformes de HbS obstaculiza el flujo sanguíneo en los capilares produciendo crisis vaso-oclusivas y hemólisis por rotura de los hematíes (Figura 7). Clínicamente es de gran severidad, los pacientes pueden presentar sepsis, crisis aplásicas, accidentes cerebrovasculares o hipertensión pulmonar.

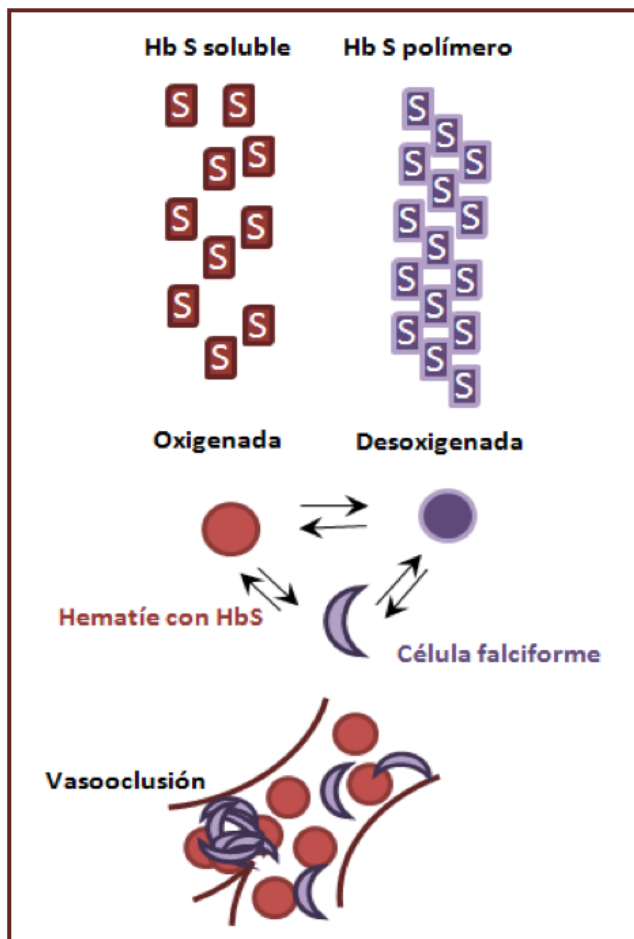


Figura 7: Representación de la HbS en el proceso de formación de polímeros falciformes con obstaculización del flujo sanguíneo en los capilares sanguíneos.

Las manifestaciones clínicas por presencia de HbS tienen lugar en el estado homocigoto (HbSS) dando lugar a la anemia de células falciformes o drepanocitosis. Además la combinación de la HbS con una hemoglobina C (HbC) o una β -talasemia daría lugar a heterocigotos compuestos originando síndromes falciformes con clínica similar a la anemia de células falciformes por HbSS. Es decir, la enfermedad de células falciformes puede presentar 3 genotipos distintos: HbSS (anemia de células falciformes), HbSC o HbS/ β -talasemia. La HbS también se puede combinar con otras hemoglobinas variantes menos frecuente y presentar manifestaciones clínicas similares, como la HbD o la HbO-Arab entre otras. En la Figura 8 se muestra una tabla con el riesgo clínico en relación a la posible combinación entre variantes de hemoglobinas y talasemias.

Carrier of	Hb S	β thal	$\delta\beta$ thal	Hb Lepore	Hb E	Hb O ^{Arab}	Hb C	Hb D ^{Punjab}	HPFH	Not identified as a carrier
	Father	Hb S	β thal	$\delta\beta$ thal	Hb Lepore	Hb E	Hb O ^{Arab}	Hb C	Hb D ^{Punjab}	HPFH
Hb S	Dark Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
β thal	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
$\delta\beta$ thal	Light Red	Dark Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Hb Lepore	Light Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Hb E	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Hb O ^{Arab}	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Hb C	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Hb D ^{Punjab}	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
HPFH	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Not identified as a carrier	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red

Key:

- Serious risk - refer couple for counselling - prenatal diagnosis to be offered
- Less serious risk - refer couple for counselling - further investigation may be required
- Minimal risk

Figura 8: Tabla basada en el trabajo del profesor B. Modell. Sickle Cell and Thalassemia. Handbook for Laboratories.

Los pacientes heterocigotos para la HbS o con rasgo falciforme no presentan manifestaciones clínicas y sus valores del hemograma son normales debido a la presencia de HbA. La observación morfológica es anodina, aunque en determinadas situaciones que inducen la falciformación (mínima) se puede observar la presencia de hematíes con los extremos puntiagudos en forma de semiluna menos marcada (o barco). En cambio en estados homocigotos la presencia de hematíes falciformes o drepanocitos es muy elevada (Figura 9). La doble heterocigosis entre HbS y HbC, HbD-Punjad o HbO-Arab facilita la falciformación.

Hemoglobina C

Se trata de una hemoglobina variante de cadena β en la que se ha producido un cambio del ácido glutámico por una lisina en la posición 6 (β_6 Lys-Glu). Es frecuente en el continente Africano, especialmente en el oeste de África de donde surge, teniendo una prevalencia en algunas zonas de hasta el 50 % (Costa de Marfil). En la actualidad, debido al flujo migratorio está presente en el norte de África, Sur de Europa, EEUU o Canadá. El estado heteroci-

gato (HbAC) no presenta clínica mientras que en homocigosis (HbCC) se puede observar una anemia hemolítica moderada, de menor gravedad que en la drepanocitosis, con discreta esplenomegalia pudiendo aparecer retinopatía y dolores óseos. El cambio de aminoácido reduce la plasticidad del hematíe y condiciona la solubilidad de la HbC pudiendo generar estructuras cristalinas en el interior del hematíe por deshidratación. En la revisión del frotis podemos observar la presencia de dianocitos, alcanzando incluso hasta el 30 % en el estado HbCC. El hemograma en ocasiones cursa con una discreta microcitosis.

Las características estructurales de la HbC hacen que pueda ser detectada mediante electroforesis. No obstante, en la electroforesis alcalina la HbC tiene la misma movilidad que la HbE, HbA2 y HbO-Arab no pudiéndose diferenciar entre ellas, mientras que en la electroforesis ácida puede diferenciarse bien de la HbE y HbA2 y de la HbO-Arab. Al presentar un residuo de lisina le confiere a la variante estructural un carácter más básico que la HbA o HbS quedando retenido más tiempo en la columna cromatográfica, pudiéndose diferenciar fácilmente cuando se procesa por HPLC. La HbC en el cromatograma presenta un tiempo de retención más alargado, alrededor de 4,6-4,9 minutos (dependiendo del analizador y kit de reactivos). El HPLC y la EC son dos métodos que permiten la separación correcta de la HbC del resto de hemoglobinas más comunes, pudiendo además ser cuantificadas.

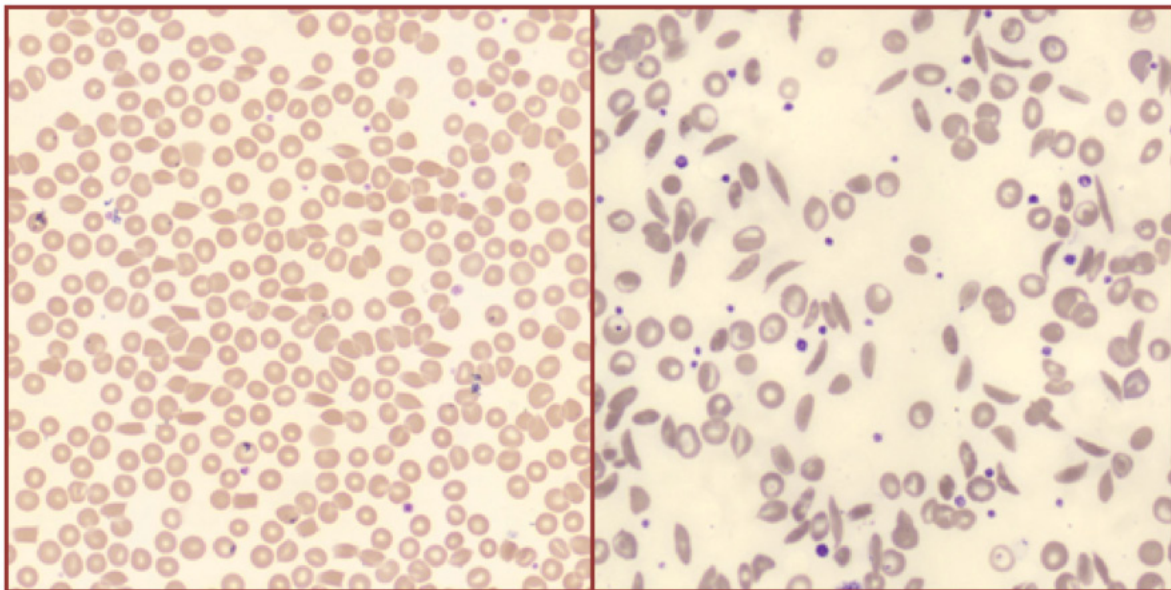


Figura 9: a) Representación morfológica la sangre periférica de un paciente con rasgo falciforme (HbS heterocigota) y presencia de algunos hematíes falciformes. b) Paciente diagnosticado de anemia falciforme o drepanocitosis (HbS homocigota) y presencia de abundantes hematíes falciformes en la revisión morfológica del frotis.

Hemoglobina E y Hemoglobina Lepore

Se consideran hemoglobinas talasémicas, ya que además de producir una hemoglobina estructural anómala se asocian a una disminución de la síntesis de cadena de globina mostrando un hemograma con microcitosis e hipocromía. En la revisión del frotis de sangre periférica podemos observar microcitosis, hipocromía con anisopoiquilocitosis, presencia de

dianocitos y punteado basófilo, hallazgos morfológicos característicos de las talasemias. Son variantes de la hemoglobina frecuentes en el Sud-Este Asiático, especialmente en algunas regiones como Camboya o Tailandia.

La HbE se debe a un cambio de aminoácido, ácido glutámico por lisina, en la la posición 26 del gen de la β -globina (β 26 Lys-Glu). La mutación origina un mRNA anómalo que se traduce en una hemoglobina variante con síntesis de la cadena β E reducida en comparación a la cadena β sin mutar. En la electroforesis a pH alcalino, la HbE presenta la misma movilidad electroforética que la HbA₂ y la HbC, mientras que a pH ácido la movilidad es igual que la HbA y la HbA₂. En el HPLC, la HbE se separa de las HbA y HbC, pero co-eluye en el tiempo de retención de la HbA₂ interfiriendo en su cuantificación.

La hemoglobina Lepore por su parte, se sintetiza como consecuencia de un entrecruzamiento genético entre el gen de la β -globina y el gen de la δ -globina dando lugar a un gen de fusión $\delta\beta$. Este gen de fusión codifica una cadena globina de fusión $\delta\beta$ pero con una reducción en su síntesis de la cadena comparado con una cadena β sin alteraciones, de ahí los rasgos talasémicos que presenta la HbLepore. La HbLepore presenta una movilidad junto a la HbS en la electroforesis a pH alcalino, y junto la HbA a pH ácido, en el HPLC presenta un tiempo de retención similar al de la HbA₂, interfiriendo en su cuantificación pero con un perfil característico, y en la electroforesis capilar presenta una movilidad entre la HbE y la HbC.

Otras hemoglobinas variantes

Además de las hemoglobinas estructurales comentadas, podemos hallar otras variantes como la HbD-Punjad (relativamente frecuente), la HbO-Arab, la HbJ, Hb Hope o la HbG-Philadelphia (una variante de cadena alfa más frecuente).

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

A continuación se describen con detalle las principales pruebas analíticas disponibles en el laboratorio para el cribado y diagnóstico de las hemoglobinopatías. En ocasiones, el diagnóstico definitivo requiere la confirmación mediante el uso de técnicas moleculares que no se tratarán en el documento. Algunas de las más utilizadas son PCR-Gap, PCR con enzimas de restricción, MLPA (*high resolution ligation-dependent probe amplification*), *Southern blot* o secuenciación del DNA. Es necesario recordar que para la identificación correcta de una variante de hemoglobina las guías internacionales recomiendan al menos el uso de 2 métodos diagnósticos diferentes.

Hemograma

La determinación del hemograma es una de las pruebas de laboratorio más demandadas en la rutina diaria, siendo fundamental en la sospecha inicial de una talasemia. Las talasemias se caracterizan por presentar una microcitosis (VCM < 80 fL) con hipocromía (HCM < 27 pg) y en ocasiones aumento del número de hematíes por compensación. El primer paso es realizar el diagnóstico diferencial con una anemia ferropénica, también microcítica e hipocroma. En

las talasemias, la presencia de anemia puede estar o no presente y el ADE generalmente no está alterado, a diferencia de la ferropenia, pero según el tipo de mutación causante puede existir una reticulocitosis con aumento del ADE. Es necesario realizar un estudio del metabolismo del hierro con niveles de ferritina para descartar la presencia de una ferropenia. En ausencia de ferropenia, con los índices eritrocitarios revelando una microcitosis hipocroma se debe proceder a realizar pruebas como el HPLC, electroforesis en acetato de celulosa o electroforesis capilar para la detección de hemoglobinopatías. En la actualidad, gracias al avance tecnológico los autoanalizadores de hematimetría disponen de nuevos parámetros que reflejan de manera precoz la eritropoyesis, ofreciendo un valor añadido en el diagnóstico diferencial ante una microcitosis. Algunos parámetros como el porcentaje de hematíes hipocromos, porcentaje de hematíes microcíticos, el contenido de hemoglobina reticulocitaria o el factor de tamaño eritrocitario (RsF), y fórmulas relacionadas, han sido propuestos como *screening* para la presencia de talasemia. Algunas hemoglobinas variantes como la hemoglobina Lepore o la HbE presentan un perfil talasémico presentando una sospecha inicial a partir de los valores del hemograma. La HbC también puede presentar una discreta microcitosis, acentuándose en estado homocigoto.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de intercambio iónico es una técnica rápida, precisa y reproducible para la detección de diferentes fracciones de hemoglobinas humanas. Utiliza una columna constituida por una resina de sílica gel como fase estacionaria sobre la que se eluye la muestra (lisado de hematíes). Las diferentes hemoglobinas quedarán retenidas más o menos tiempo en la columna en función de su interacción iónica. A continuación se ejerce un gradiente de tampones (fase móvil) con fuerza iónica y pH crecientes, permitiendo la elución de las diferentes hemoglobinas y siendo detectadas por un fotómetro a 415 nm a partir de los cambios de absorbancia. Las distintas hemoglobinas eluyen a un tiempo determinado y reproducible para cada analizador y kit utilizados. En las figuras 10 y 11 se pueden observar diferentes hemoglobinas variantes procesadas por HPLC en 2 analizadores distintos. Se debe tener en cuenta la temperatura a la que produce el proceso de elución de hemoglobinas para asegurar que los tiempos de retención sean adecuados. El HPLC es una técnica que permite, a parte de la separación y detección de hemoglobinas, la cuantificación de HbF y HbA2 de manera precisa. Para ello, es necesario el ajuste de 2 niveles de calibradores y procesamiento de controles valorados.

En la actualidad, muchos laboratorios utilizan el HPLC como primer método en el *screening* diagnóstico de las hemoglobinopatías por las ventajas que ofrece: técnica poco laboriosa, automatizada, permite el análisis de gran número de muestras, requiere poco volumen (alrededor de 5 μ L de muestra), identifica provisionalmente un gran rango de hemoglobinopatías variantes (Figuras 10 y 11). La cuantificación tanto de la HbA2 como de la HbF permite el diagnóstico de β y $\delta\beta$ -talasemias siendo el método de elección. Hay que tener presente que en los cromatogramas obtenidos se observa fracciones glicosiladas y acetiladas de las hemoglobinas variantes que dificultan su interpretación y en ocasiones pueden

incrementar falsamente el porcentaje de HbA2, como en presencia de HbS. Se requiere una interpretación minuciosa de cada cromatograma teniendo en cuenta que diferentes variantes de hemoglobinas pueden presentar un tiempo de retención similar, siendo necesario técnicas adicionales para su identificación.

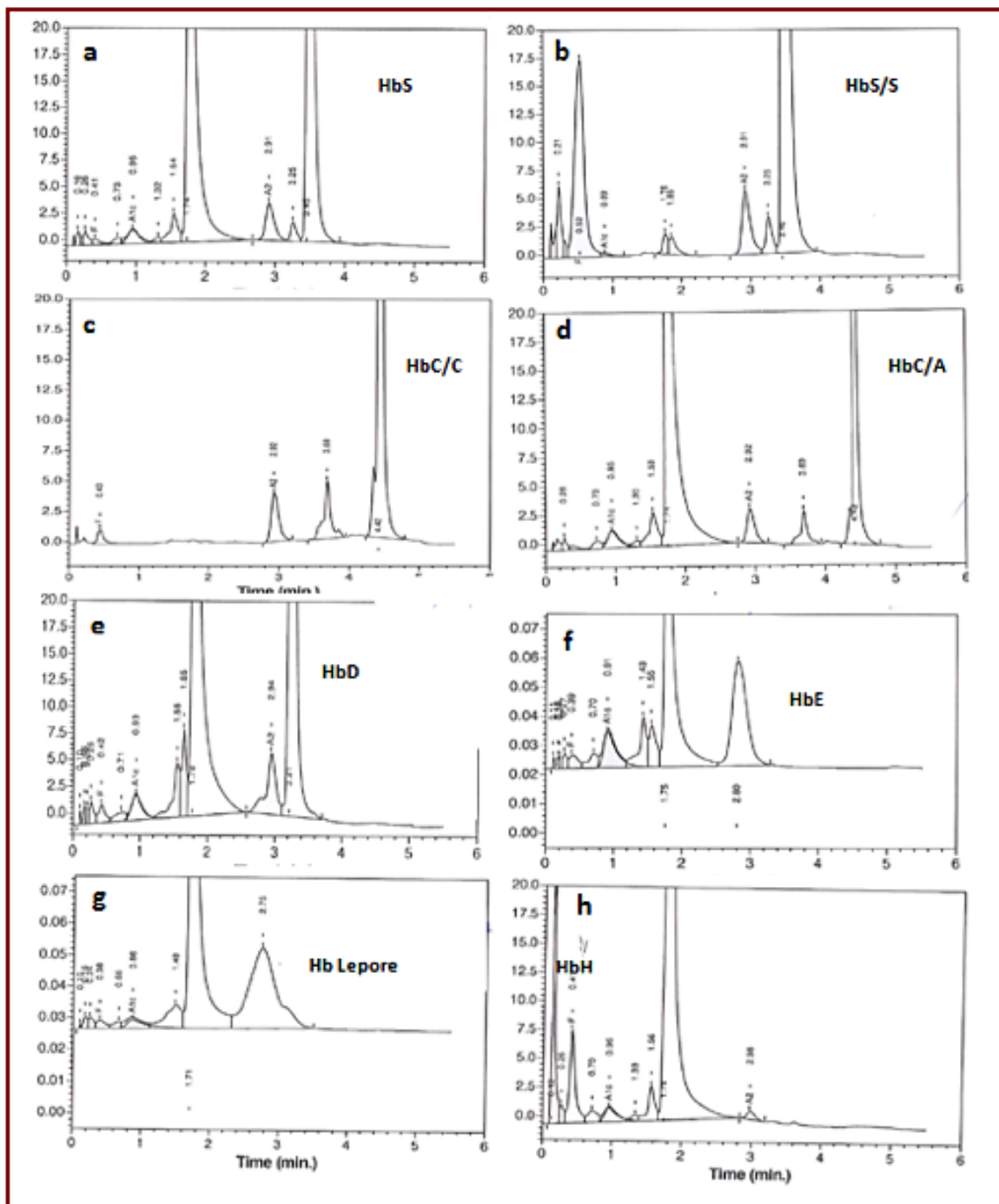


Figura 10: Cromatogramas (HPLC) procesados por el analizador Variant II de Bio-Rad con presencia de diferentes hemoglobinopatías: a) Hemoglobina S heterocigota. b) Hemoglobina S homocigota con aumento de la hemoglobina F. c) Hemoglobina C homocigota. d) Hemoglobina C heterocigota. e) Hemoglobina D heterocigota. f) Hemoglobina E heterocigota. g) Hemoglobina Lepore. h) Enfermedad de la hemoglobina H (alfa-talasemia intermedia) con presencia de hemoglobina H (elución muy rápida con tiempo de retención de 0.12 min) con disminución de la hemoglobina A2.

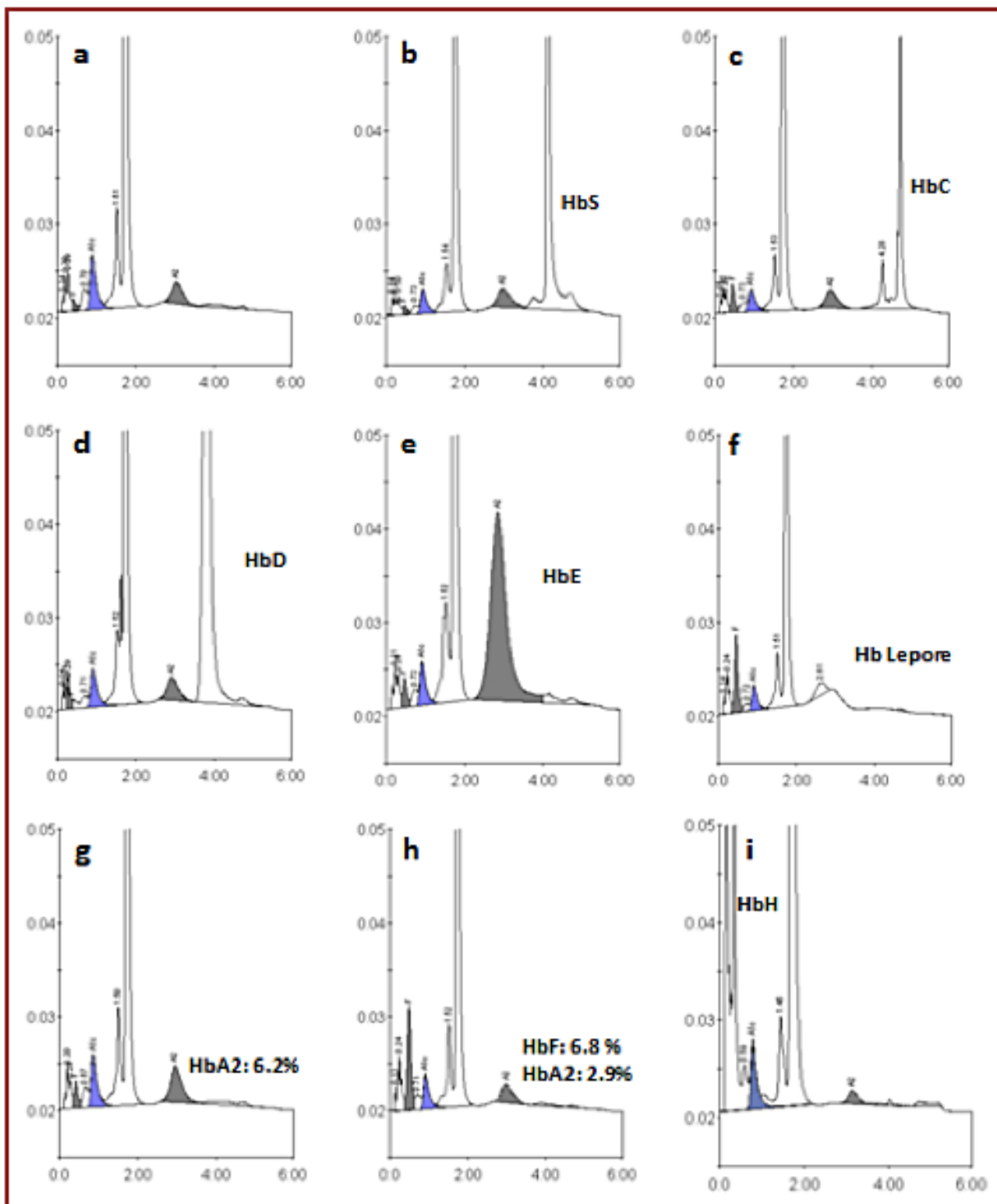


Figura 11: Cromatogramas (HPLC) procesados por el analizador D-10 de Bio-Rad con presencia de diferentes hemoglobinopatías: a) Cromatograma sin alteraciones. b) Hemoglobina S heterocigota. c) Hemoglobina C heterocigota. d) Hemoglobina D heterocigota. e) Hemoglobina E heterocigota. f) Hemoglobina Lepore. g) β -talasemia (aumento de la HbA2). h) $\delta\beta$ -talasemia (aumento de la HbF y HbA2 normal). Enfermedad de la hemoglobina H (alfa-talasemia intermedia) con presencia de hemoglobina H (elución muy rápida con tiempo de retención de 0.12 min) con disminución de la hemoglobina A2.

Electroforesis alcalina y ácida

El tipo de electroforesis más utilizada es la electroforesis en acetato de celulosa o gel de agarosa a pH alcalino con pH entre 8,2-8,6. A este pH la hemoglobina está cargada negativamente y migra hacia el ánodo (+). Este procedimiento permite la separación, en función de su carga y composición, de la mayoría de hemoglobinas variantes más comunes como la HbS, HbC, HbE, HbH, HbLepore y algunas otras variantes menos frecuentes (Figura 12). Sin embargo algunas hemoglobinas anómalas a pH alcalino migran en posiciones similares, como HbS, HbG, HbD y HbLepore o la HbC, HbE, HbA₂ y HbO-Arab, requiriendo otros métodos para poder identificarlas. En estos casos, el método complementario más común es la EF en medio ácido (pH: 6,0-6,2) en gel de agarosa, aunque también se puede utilizar el isoelectroenfoque. A pH ácido la carga de las hemoglobinas es diferente y los patrones de migración cambiarán. La EF ácida permite la separación de la HbC de la HbE, la HbO y la HbA₂ (Figura 12).

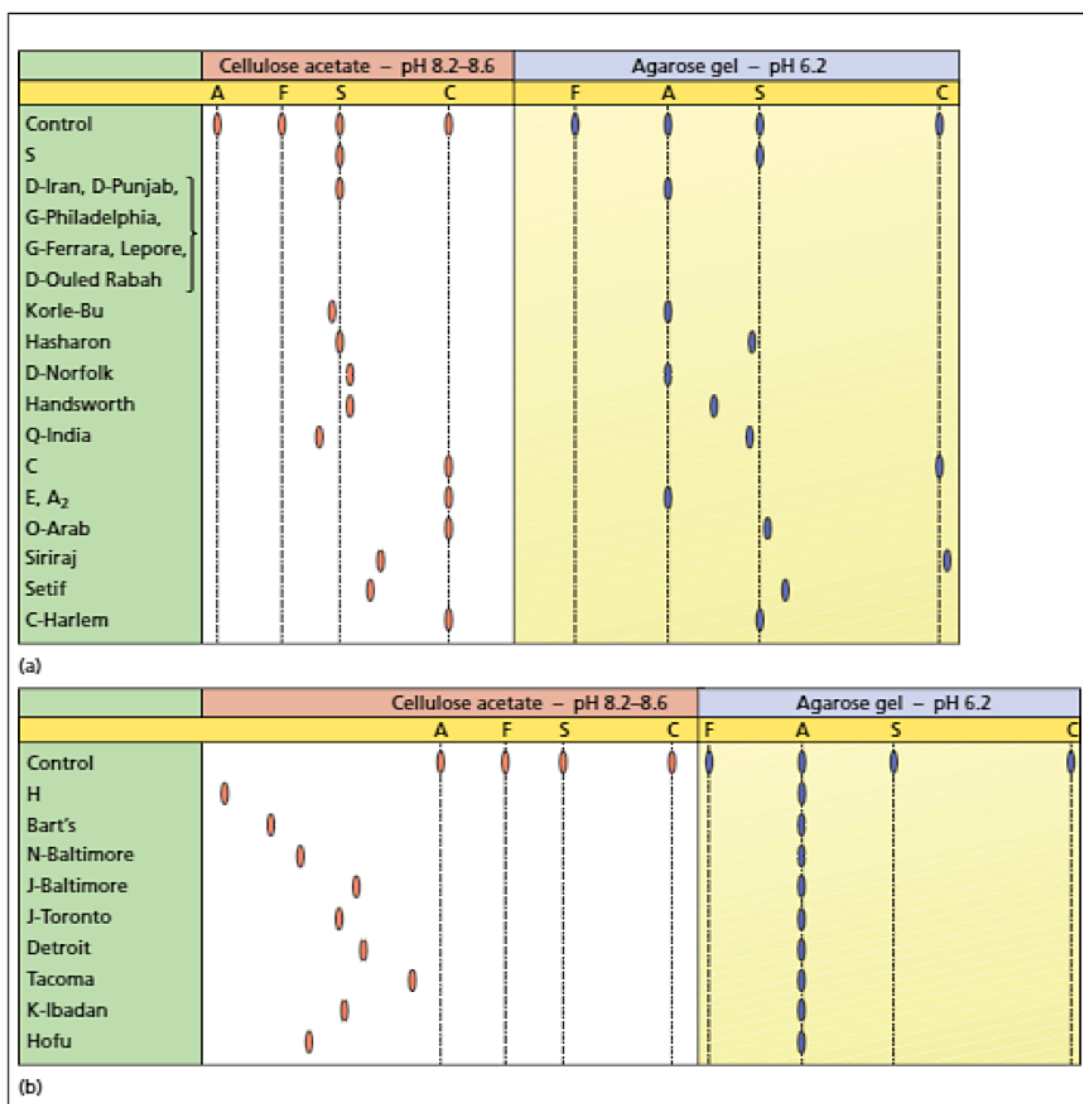


Figura 12: Representación de la movilidad de diferentes variantes de hemoglobina en electroforesis alcalina y ácida. Bain B. Hemoglobinopathy diagnosis, 2006

Como ventajas, la EF es una técnica sencilla y coste-efectiva para laboratorios con bajo volumen de muestras, permitiendo la identificación de la mayoría de hemoglobinas anómalas. En cuanto a inconvenientes, se trata de una técnica relativamente laboriosa, ya que requiere una preparación manual. Es necesario lavar los hematíes con solución salina, ya que la presencia de paraproteínas plasmáticas puede interferir en la separación de hemoglobinas. No permite la cuantificación de HbA2 y HbF siendo preferible el uso de HPLC o EC y no permite la diferenciación de algunas hemoglobinas variantes. No es sensible a la detección de variantes con un porcentaje bajo. No es un método utilizado inicialmente en el cribado diagnóstico de hemoglobinopatías, pero sí es una buena técnica complementaria.

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es un método incorporado hace relativamente pocos años en la detección de las principales variantes de hemoglobina, así como para la cuantificación de la HbA2 y HbF. La separación de hemoglobinas se lleva a cabo en el interior de un capilar de sílice de unas 25 micras de diámetro aproximadamente (Figura 13). El interior del capilar está constituido por una solución buffer o tampón de electrolitos con pH alcalino, el cual es conductor de la corriente eléctrica. La muestras son diluidas con una solución hemolizante e introducidas en el ánodo por aspiración de manera automatizada. La separación de las hemoglobinas tiene lugar en función de su relación masa/carga al aplicar un alto voltaje (hasta 10000 voltios) entre los extremos del capilar, permitiendo así una separación rápida y de alta resolución. La migración de las hemoglobinas se produce hacia el cátodo (-) gracias a la fuerza que ejerce el flujo electroosmótico. Las hemoglobinas son detectadas en una burbuja de lectura situada en la parte catódica mediante absorbancia a una longitud de onda de 415 nm. Cada tipo de hemoglobina presenta una velocidad específica de migración y se separa en una zona determinada. Los resultados de las migraciones se representan en forma de picos y se muestran en 15 zonas distintas, siempre en relación a la zona de migración de la HbA.

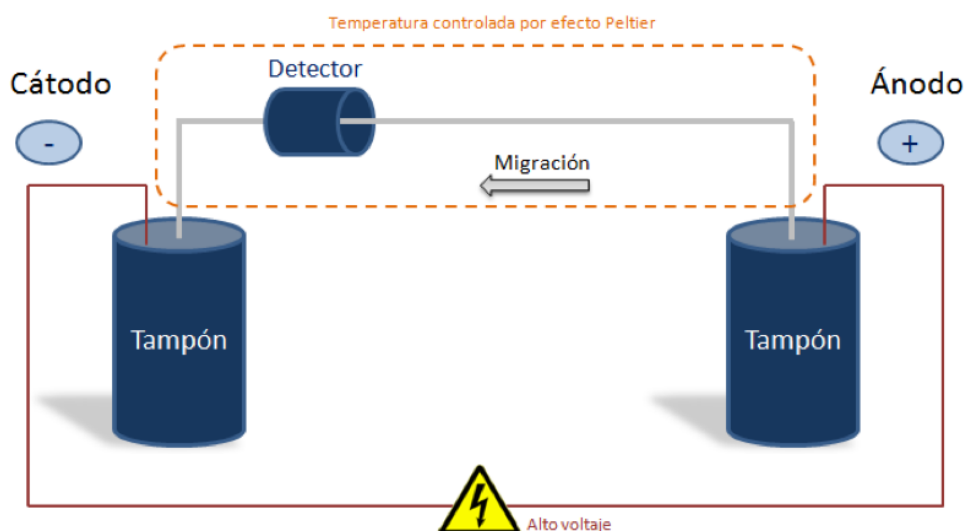


Figura 13: Esquema del principio de la electroforesis capilar en la separación de hemoglobinas.

La EC presenta una gran cantidad de ventajas comparables con el método de HPLC. Se trata de un método automatizado, preciso y con alto rendimiento, ya que permite el análisis simultáneo de varias muestras (hasta 8). Necesita un volumen de muestra de 100 μ L para su análisis. Permite la separación de las hemoglobinas así como de las variantes más comunes, tales como HbS, HbC, HbD, HbE y la cuantificación de manera precisa de la HbF y HbA2 sin que interfiera la presencia de HbS, HbE o HbC (Figura 14). Además, las hemoglobinas post-traduccionales por glicosilación o acetilación como la fracción glicosilada de la HbS no interfieren en la detección y cuantificación de HbA2 y HbF, ya que no se separan de sus fracciones originales. Detecta fácilmente hemoglobinas rápidas como la HbH o la HbBart.

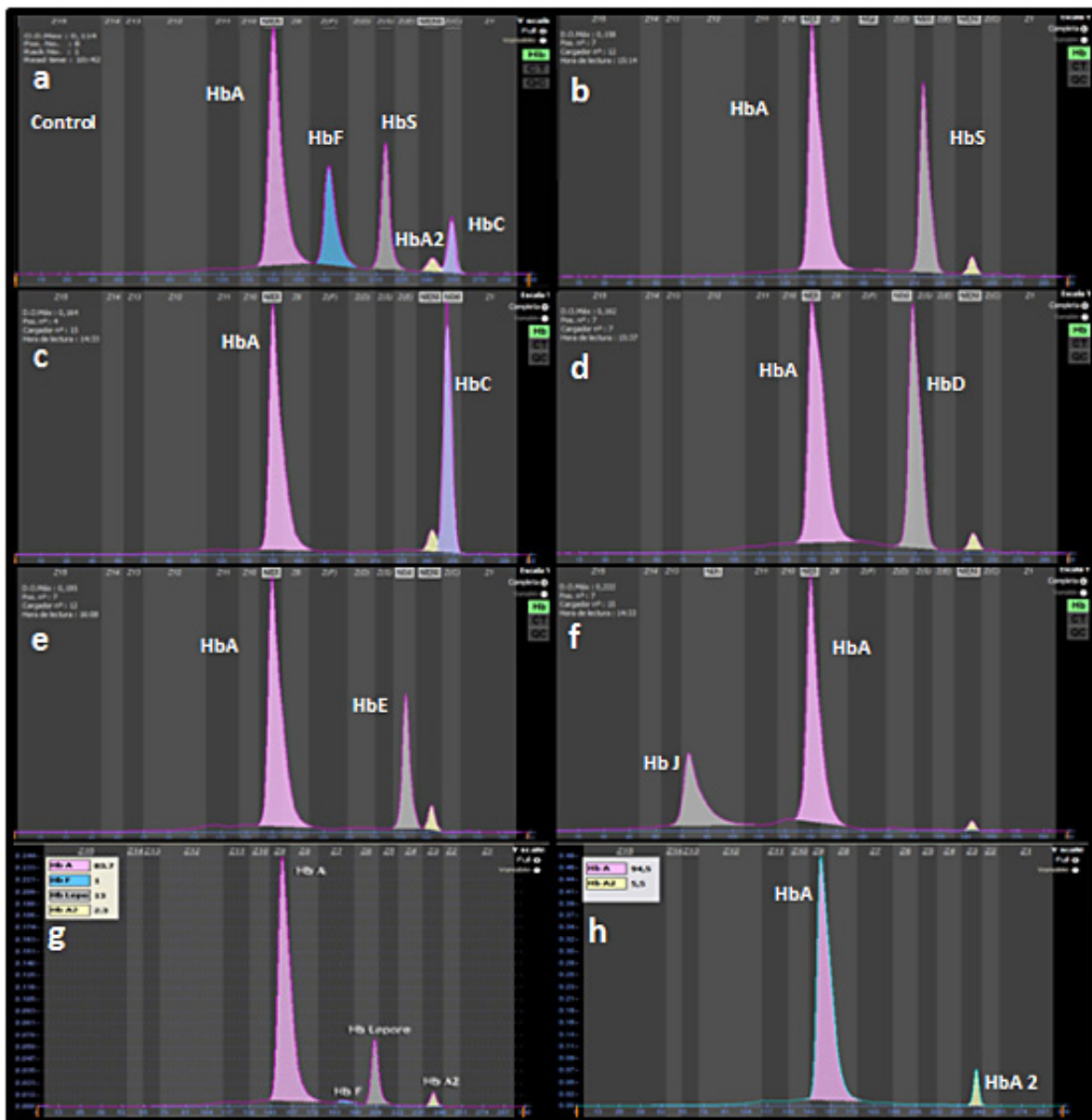


Figura 14: Diferentes perfiles de hemoglobinas variantes procesadas por electroforesis capilar. a) control interno que contiene HbA, HbF, HbS, HbA2 y HbC. b) Hemoglobina S heterocigota. c) Hemoglobina C heterocigota. d) Hemoglobina D heterocigota. e) Hemoglobina E heterocigota. f) hemoglobina J heterocigota (variante alfa). g) Hemoglobina Lepore. h) Beta-talasemia (HbA2: 5.5 %, HbF: no detectable).

↑ HbA2		↓ HbA2		↑ HbF	
Hipertiroidismo	Ferropènia	Persistencia a la hemoglobina fetal hereditaria (PHFH)	Anemia perniciosa		
Anemia megaloblàstica	Anemia sideroblàstica	β-talasemia	Anemia aplàsica		
Terapia antiretroviral	δβ-talasemia	δβ-talasemia	Tratamiento Hidroxiurea		
HbSS + α-talasemia	Variantes de cadena α	Enfermedad de células falciformes	Hipertiroidismo		
Algunas hemoglobinas inestables	Variantes de cadena δ	Hb variante con el mismo tiempo de retención que la HbF	Anemia sideroblàstica		
Triplicación del gen α (ααα)	Enfermedad de la HbH	Hb variante con el misma movilidad electroforética que la HbF			
	Hb Lepore				

Figura 15: Principales factores que pueden modificar los valores de la HbA2 y HbF.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La correcta interpretación de los resultados obtenidos ante la sospecha de una hemoglobinopatía requiere de la valoración conjunta tanto de las manifestaciones clínicas del paciente, como de los resultados del conjunto de pruebas relacionadas, tales como el hemograma, la revisión del frotis y el metabolismo del hierro en primera línea, así como otras técnicas como HPLC, EF o EC posteriormente. Además, es importante tener presente todos aquellos factores, genéticos y adquiridos (Figura 15), que pueden interferir en los resultados obtenidos reportando un comentario interpretativo del estudio completo. Este comentario aportará un valor añadido a los resultados con el objetivo de facilitar el diagnóstico y manejo del paciente por parte del clínico. Debemos evitar la simple validación de resultados.

BIBLIOGRAFIA

Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis. Second edition, 2006.

Bain BJ. Blood Cells: A Practical Guide. London. Blackwell Publishing; 2009.

Greene DN., Pyle AL., Chang JS., et al. Comparison of Sebia Capillarys Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies.

Harteveld CL, Higgs DR. Alpha Thalassemia. Orphanet Journal of Rare Disease 2010, 5:13.

Merino Anna. Manual de citología de sangre periférica. Acción Médica; 2005.

Oyaert M., Van Laer C., Claerhout H., et al. Evaluation of the Sebia Minicap Flex Piercing capillary electrophoresis for hemoglobinopathy testing. Int J Lab Hematol. 2015;37(3):420-5.

Ryan K., Bain B., Worthington D., et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. British Journal of Haematology 2010: 149, 35–49.

Traeger-Synodinos J., Harteveld CL., Old MJ., et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. European Journal of Human Genetics 2015: 23, 426–437.

Villegas A. Talasemias: Clasificación y diagnóstico. Hematologica/edición española 2010;95 (Extra 1).

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (*Residente*), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (*Residente*), M. Rodríguez (*Presidente*), N. Rico, MC. Villà.

ISSN 1887-6463 – Febrero 2017 (recibido para publicación Diciembre 2016).