

El hemoglobinograma

I. Conceptualización y consideraciones analíticas

Dr. German F. Sáenz

Dr. Mario Chaves

INTRODUCCION

En vista de la importancia médica, genética y antropológica de las hemoglobinopatías y de los trastornos relacionados, como lo son las deficiencias enzimáticas del eritrocito y los defectos de la membrana de esta célula —entre otras, la esferocitosis hereditaria y la hemoglobinuria paroxística nocturna—, se han establecido una serie de protocolos analíticos que tienden a facilitar los diagnósticos presuntivos y luego a establecer derivaciones analíticas subsiguientes de certeza. Nosotros, en publicaciones referentes a hemoglobinopatías, hemos enfatizado algunos de estos aspectos de laboratorio (11,12,13,15). En otros informes se ha intentado lo mismo (6,10,17,19,20,21). La simpleza o complejidad de un determinado protocolo analítico para estos fines, depende de si lo que se desea es la busca de la frecuencia de genes o de fenotipos anormales en poblaciones (escrutinios, tamizajes, pesquisas) o la aplicación de tales abordajes de laboratorio en pacientes individuales o seleccionados. Nuestra presente proposición al respecto, permitirá ofrecer una disciplina analítica que, salvo pequeños cambios, puede aplicarse para ambas circunstancias, es decir, para estudios de población y para el diagnóstico de pacientes que se estudian individualmente.

Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA); Cátedra de Hematología, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.

DEFINICION

El Hemoglobinograma comprende un grupo de análisis hematológicos que permite estudiar o evaluar la presencia de hemoglobinas anormales, de síndromes talasémicos, de las principales enzimas de las vías glucolíticas, de ciertos trastornos hereditarios y adquiridos de la membrana eritrocítica y del estado coloidsmótico de su contenido celular. Bajo una premisa clínico-analítica, el hemoglobinograma puede ser de escrutinio o confirmatorio.

Hemoglobinograma de escrutinio: éste se realizaría como metodología de pesquisa con el fin de investigar Hbs anormales y síndromes talasémicos, a través de un hemograma completo con reticulocitos e índices (VCM, HCM y CHCM), cuidadosa inspección de la morfología roja, fragilidad osmótica (F.O.) simplificada para evaluar resistencia osmótica disminuída, electroforesis convencional de la Hb a pH alcalino y, una prueba de solubilidad. Este tipo de hemoglobinograma debe incluir una prueba rápida para investigar deficiencia de G6PD. La secuencia analítica de los exámenes arriba señalados permitirá a este nivel decidir si se cuantifican diversas pruebas presuntivamente positivas, así como fracciones de Hb (A₂, F, etc.) que se requieran para definir un determinado fenotipo hemoglobínico, sea talasémico, de variantes hemoglobínicas, como de éstas más genes talasémicos. Es importante destacar que en toda enfermedad hemoglobinopática el origen racial del paciente permite orientar

el abordaje analítico-diagnóstico. De esta suerte, en individuos de raza negra es imperativa la búsqueda de síndromes drepanocíticos y de la deficiencia de G6PD. En caucásicos, lo sería para enfermedades beta talasémicas y esferocitosis hereditaria, y en pacientes de extracción oriental, de alfa talasemia.

El contador electrónico de eritrocitos ofrece un índice confiable del VCM. El de la CHCM puede determinarse manualmente y, en todo caso, es más exacto evaluar hipocromia ($< 31\%$) por este último procedimiento (22).

Hemoglobinograma confirmatorio: comprendería aquellos análisis especializados que se realizan como alternativas diagnósticas del presuntivo, para establecerlas con certeza o para investigar por exclusión padecimientos más raros.

Es lógico pensar que con las pruebas que se realicen en el Hemoglobinograma presuntivo se llegue a un diagnóstico definitivo. Sin embargo, es posible que los análisis no sean concluyentes, que se requiera de otros alcances analíticos para dilucidar un cuadro determinado, o que el hallazgo de una determinada anormalidad preliminar justifique un estudio más profundo de la variante anormal o del trastorno en estudio. Puede ser el caso, por ejemplo, de que no se evidencie ninguna alteración electroforética en un individuo en el cual el Hemoglobinograma inicial mostraba sospecha de una Hb inestable por la F.O., la reticulocitosis, la morfología eritrocítica y un cuadro clínico en el que se notaba la emisión de orinas oscuras y exacerbación del proceso por medicamentos oxidantes. Ante esta evidencia, se debe procesar la muestra de su hemolizado por electroforesis a diferentes pHs y con diversos medios de sostén, se debe investigar la presencia de cuerpos de inclusión eritrocitarios, la estabilidad de la Hb, la cadena mutante de la misma, etc., hasta llegar a una factible caracterización con la misma conducta. En este tipo de hemoglobinograma, la orientación del cuadro clínico podría imponer la investigación de otras eritroenzimopatías, la prueba de la autohemólisis, la cuantificación de metaHb, la medición de la afinidad de la Hb por el O_2 , la cuantificación de 2,3 DPG, y la cantidad (mEq) de cationes intracelulares. Estos alcances analíticos se encuentran en la lite-

ratura nacional (14) y extranjera (1,4,6,8,18).

VISION PARTICULARIZADA Y DE CONJUNTO DEL HEMOGLOBINOGRAMA

Ante la sospecha de enfermedades talasémicas, el hemoglobinograma incluirá el abordaje analítico que se indica en la figura 1, haciéndose la salvedad de que no son enteramente indispensables los índices VCM y HCM, los cuales, en toda forma, sólo adquieren valor si se establecen con base en cómputos electrónicos de los eritrocitos.

En la figura 2 se indica un flujograma analítico para el estudio de hemoglobinas anormales dentro del contexto del hemoglobinograma, indicándose en el mismo los ejemplos de mutantes de Hb más frecuentes y, por ende, factibles de encontrarse en nuestro país, con un señalamiento del abordaje de laboratorio de acuerdo a si la migración electroforética convencional a pH alcalino es igual a la Hb A o más lenta o rápida que ella.

El establecimiento de un flujograma para el diagnóstico de una deficiencia eritroenzimática, es difícil, ya que su estudio no es como el de las hemoglobinopatías, debido a la gran cantidad de enzimas involucradas en procesos de orden hemolítico, existiendo asimismo algunas variantes donde su hallazgo es fortuito, al no presentar los pacientes ningún trastorno de tipo hemolítico. Para poder lograr un diagnóstico en estos casos, la marcha analítica debe ser dirigida por la historia clínica, como lo sería la ingestión de drogas, exposición a ciertas condiciones alimenticias y la condición racial (Cuadro I). Este último dato es muy importante en la deficiencia de G6PD y de otras enzimas en donde la mayor frecuencia se presenta en ciertos grupos étnicos. Debido a la prevalencia de la deficiencia de la G6PD deben realizarse pruebas de escrutinio como la del cianuro ascorbato de Jacob y Jandl (7), Sass y Caruso (16) o Brewer et al. (2), para luego proceder con pruebas más específicas, como lo serían las de manchas fluorescentes de Beutler (1). De ocurrir un caso positivo de deficiencia de alguna de las enzimas eritrocíticas, se procedería desde el punto de vista de la investigación a realizar pruebas y técnicas con la enzima purificada que lleven a la caracterización de la enzima mutante, entre ellas, cinética, K_m , estabilidad térmica,

pH óptimo, siendo estos procesos propios de un laboratorio especializado.

Por otra parte, el cuadro clínico del paciente vuelve a ayudar para el diagnóstico de un caso determinado desde el punto de vista de laboratorio (Cuadro I). Entre los aspectos a analizar se encontraría la presencia de cianosis, lo cual nos guiaría hacia una deficiencia específica de NADH-reductasa de la metaHb, de Hbs M, o de Hbs mutantes con muy baja afinidad por el oxígeno.

Dentro de los defectos de membrana de carácter hereditario, se encuentran la esferocitosis hereditaria, la eliptocitosis hereditaria, los desórdenes de permeabilidad a cationes y la composición anormal de lípidos. Dentro de los adquiridos, es relevante el caso de la hemoglobinuria paroxística nocturna. La acantocitosis puede ser hereditaria por déficit congénito de betalipoproteínas o adquirida en enfermedad hepática severa que cursa con anemia hemolítica y en la deficiencia de vitamina E (3). Aún más rara es la estomatocitosis hereditaria (9). El laboratorio debe estudiar estos trastornos en base a procedimientos iniciales y luego más sofisticados, propios de centros de referencia. Dentro de los primeros, se encuentra el Hemoglobino-grama completo con especial referencia a la morfología roja. Luego se practicaría F.O. y autohemólisis. En el caso de la HPN, las pruebas pertinentes (5). Puede justificarse la cuantificación de ATP, de 2,3 DPG y de

Na⁺ y K⁺ intracelulares, de acuerdo a una marcha analítica que vaya de lo más simple a lo más complejo.

CONCLUSIONES

El adoptar el término Hemoglobino-grama para definir aquel grupo de exámenes hematológicos que tienden al diagnóstico de eritroenzimopatías o de trastornos relacionados con la membrana del eritrocito, resulta de valor práctico pues sería una conducta analítica que le permite al laboratorio mantener de rutina una marcha analítica que se inicia por una serie de análisis de escrutinio (hemograma, reticulocitos, electroforesis de Hb, etc.) que logran discriminar con rapidez los casos normales de los anormales, para luego con éstos proseguir con un enfoque metodológico más avanzado (hemoglobino-grama confirmatorio) que puede permitir dilucidar un fenotipo hemoglobínopático determinado, una deficiencia enzimática en particular o un trastorno de membrana.

Para efectos clínicos, el hemoglobino-grama puede solicitarse al laboratorio dentro de la concepción que hemos indicado, como también puede ser tan definido que se indique en la orden médica del caso un interés especial, por ejemplo, hemoglobino-grama por esferocitosis, por deficiencia de PK o G6PD, por drepanocitosis o por Hbs inestables.

Cuadro I
CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO
QUE SE DEBEN TOMAR EN CUENTA PARA LOGRAR
DIAGNOSTICO DE UNA DEFICIENCIA ENZIMÁTICA

Cuadro clínico	<ul style="list-style-type: none"> - anemia - cuadro de hemólisis (agudo o crónico) - hemoglobinuria - ictericia (<i>neonatal</i>) - cianosis - hepatoesplenomegalia
Historia clínica	<ul style="list-style-type: none"> - anemia crónica - referencia de cianosis (congénita o adquirida) - ingestión de drogas - aspectos clínicos familiares (ictericia, anemia crónica, cianosis) - condición racial - alimentación (vicia fava) - infecciones
Cuadro de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> - anemia (normo-normo) - reticulocitosis - cuerpos de inclusión (+ crisis) - metahemoglobinemia - autohemólisis ↑ - F. O. † o normal - sobrevida de glóbulo rojo ↓ - hemoglobino-gramo (EH, AHA) negativas

BIBLIOGRAFIA

1. Beutler, E.: Red cell metabolism. A manual of biochemical methods, 1971. Grune & Stratton, Inc., N.Y.
2. Brewer, G.J.; Tarlov, A.R., & Alving, A.S.: The methemoglobin reduction test for primaquine type sensibility of erythrocytic. A simple procedure for detecting a specific hypersusceptibility for drug hemolysis. JAMA, 1962: 180, 386.
3. Brewer, G.J.: Inherited erythrocyte metabolic and membrane disorders. In: The Medical Clinics of North America, 64(4) (Symposium on Hematologic Disorders); 1980: 587-591. W.B. Saunders Co.
4. Dacie, J.V. & Lewis, S.M. Practical Haematology 5nd. Edition, 1974. Churchill Livingstone, N.Y.
5. Gordon-Smith, E.C.: Inherited Haemolytic anaemias. 176-188. In: Offrand, A.V. & Lewis, S.M. "Postgraduate Haematology". 2nd. Edit., 1981. William Heinemann Ltd., London.
6. Huisman, T.H.J. & Jonxis, J.H.P. The hemoglobinopathies. 1977; 290-293. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
7. Jacob, H.S., & Jandl, J.H.: A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide. New Eng. J. Med., 1966: 274, 1162.
8. Lehmann, H.; Hunstman, R.G.: "Man's hemoglobins". Revised edition 1974. Publisher North-Holland. Publishing Amsterdam.
9. Lux, S.E. & Glader, B.F. Hemolytic anemias III. Membrane and metabolic disorders. In: Hematology, 2nd. (Beck, W.S. Edit.). The MIT Press, 1977; 269-179.
10. Moo-Penn, W.F., Jue, D.L., Johnson, M.H., Bechtel, K.C. & Patchen, L.C.: Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center for Disease Control. Hemoglobin, 1980; 4: 347.
11. Sáenz, G.F.: Diagnóstico convencional de laboratorio de los síndromes talasémicos. Sangre, 1976: 25, 63.
12. Sáenz, G.F.: Hemoglobinopatías y trastornos afines. I. Esquemas analíticos para su detección, con especial énfasis en las pruebas de escrutinio en masa para la HbS: Análisis crítico. Sangre, 1978: 23, 358.
13. Sáenz, G.F., Alvarado, M., Elizondo, J., Arroyo, G., Atmetlla, F., Jiménez, J., Montero, G., Chávez, R., Valenciano, E. y Jiménez, R.: Hemoglobinopatías y trastornos afines. II. Presentación de la metodología preconizada. Sangre. 1978: 23, 489.
14. Sáenz, G.F. & Moreira, J.: Manual Latinoamericano: Laboratorio de Hemoglobinopatías. Depto. Publicaciones, Ministerio de Salud, Costa Rica, 1980.
15. Sáenz, G.F., Elizondo, J., Arroyo, G., Jiménez, J., Montero, G. y Valenciano, E.: Diagnóstico de hemoglobinopatías y de trastornos afines. Enfoque poblacional del problema. Bol. Of. Sanit. Panam., 1981: 90, 127.
16. Sass, M.D. y Caruso, C.J.: A simple and rapid dye test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency for routine use. J. Lab. Clin. Med., 1970: 76, 523.
17. Schmidt, R.M.: Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. JAMA, 1973: 224, 1276.
18. Schmidt, R.M.: Abnormal haemoglobins and thalassaemia. Diagnostic aspects, 1975. Churchill Livingstone, N.Y.
19. Schmidt, R.M. & E.M. Brousious: Basic laboratory methods of hemoglobinopathy detection. 6a. Edición. DHEW Publ. 77-8266. Centro para el Control de Enfermedades. Atlanta, Georgia, 1976: 1-111.
20. Schneider, R.G. y R.M. Schmidt. Electrophoretic screening for abnormal hemoglobin. En: Schmidt, R.M. (Ed.). Abnormal Haemoglobins and Thalassaemias. Diagnosis Aspects. Nueva York; Academic Press, 1975, 33.
21. Schneider, R.G., B. Hightower, T.S., Hosty, H., Ryder, G., Tomlin, R., Atkins, B., Brimhall y R.T. Jones. Abnormal hemoglobins in a quarter million people. Blood, 1976: 48, 629.
22. Seigneurin, D., Bravais, D. & Kolodie, L. Doit-on Enseigner encore la CHCM? Sem. Hosp. Paris, 18-25 Avril 1980; 75 1-754.