

# EL HEMOGLOBINOGRAMA. SU INTERPRETACIÓN DIAGNÓSTICA. II SÍNDROMES TALASÉMICOS Y HEMOGLOBINAS ANORMALES

DR. GERMAN F. SAENZ\*  
DR. MARIO CHAVEZ\*  
DR. GUIDO ARROYO\*  
DR. ELIECER VALENCIANO\*  
SR. JAVIER JIMENEZ\*  
SR. ALBERTO G. MONTERO\*

---

## RESUMEN

*Se analizan aspectos teóricos, clínicos y de laboratorio, así como algunas perspectivas diagnósticas de los síndromes talasémicos y de las hemoglobinas anormales, conceptualizados bajo el término "hemoglobino-grama", definido en un trabajo anterior.*

*Se discuten aspectos analíticos diferenciales de los distintos síndromes talasémicos y de deficiencias nutricionales como lo es la anemia ferropénica. Asimismo, se discuten los principales aspectos técnico-analíticos en el diagnóstico de las hemoglobinas anormales que prevalecen en nuestro país.*

## SUMMARY

*Theoretical, clinical and laboratory aspects, as well as diagnostic perspectives with relation to the thalassemic and abnormal hemoglobin syndromes are analyzed, as visualized under the term "hemoglobino-gram", described in a previous paper.*

*Differential analytical aspects for the different thalassemic syndromes and nutritional deficiencies (e.g. iron deficiency anemia) are described. The main technical and analytical aspects for the diagnosis of those abnormal hemoglobins prevalent in Costa Rica are also discussed.*

---

En un artículo anterior (21) nos permitimos formular la conveniencia de establecer el término Hemoglobino-grama para incluir aquellos análisis hematológicos que se requieren para el diagnóstico de hemoglobinopatías, de eritroenzimopatías o de problemas relacionados con trastornos de la membrana del glóbulo rojo. Asimismo, dejamos claro la conducta analítica que debe prevalecer a través de la integración clínica y laboratorio, al sentarse las bases de un hemoglobino-grama de escrutinio y luego de otro confirmatorio o específico. En este trabajo señalaremos las

diversas perspectivas diagnósticas que en cuanto a síndromes talasémicos y hemoglobinas anormales nos puede brindar el Hemoglobino-grama así conceptualizado.

## ENFERMEDADES TALASEMICAS:

El diagnóstico precoz de enfermedades genéticas ofrece una oportunidad insoslayable para el tratamiento temprano y el abordaje adecuado hacia la prevención de casos ulteriores a través del consejo genético. El avance vertiginoso que se ha suscitado en torno a los defectos moleculares en talasemia (tal), ha permitido que en la actualidad se puedan llevar a cabo diagnósticos de certeza de estas enfermedades aún en fetos de quince semanas. Los procedimientos

---

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

comprenden la obtención de sangre fetal y su incubación con leucina radioactiva, a fin de determinar posteriormente las cantidades relativas de síntesis de cadenas alfa, beta y gama. Más recientemente se ha utilizado el extraordinario método de hibridación de DNA (cDNA) con DNA de fibroblastos obtenidos de líquido amniótico para el diagnóstico prenatal tanto de alfa-tal (13) como de beta-tal y anemia drepanocítica (10), sea por estudios de hibridación (9) como por el de mapeo de genes con el uso de endonucleasas de restricción (3). Se ha comprobado que la alfa-tal es debida a la pérdida de uno o ambos genes estructurales de alfa-globina del genoma haploide del cromosoma 16. El genoma diploide de la mayoría de las razas humanas posee una duplicación de los loci alfa, con cuatro genes activos (6).

El diagnóstico neonatal de talasemias ha venido haciéndose cada vez más un procedimiento de rutina en algunos centros de hematología pediátrica. Se ha citado como procedimiento de escrutinio para alfa-tal (22), la determinación del VCM y de la HCM en sangre del cordón umbilical. Asimismo, la Hb Bart generalmente se asocia en el período neonatal con la presencia de alfa-tal (26). Dicha Hb puede demostrarse sin dificultad por electroforesis en acetato de celulosa y en gel de almidón a pH alcalino. Wasi y col. (25) señalan que las cantidades de Hb Bart al nacimiento de 1-2 por ciento, de 5-6 por ciento y de 20-40 por ciento, corresponden, respectivamente, a los genotipos de alfa-tal 2 o gene silencioso (-, alfa/alfa, alfa), alfa tal 1 o rasgo (-, -/alfa, alfa) y de alfa-tal 1/alfa-tal 2 o enfermedad por Hb H (-, -/-, alfa). También por métodos de biosíntesis de globina en sangre de cordón se puede demostrar el desequilibrio sintético entre cadena alfa y beta, evidenciándose un incremento del índice de la relación gama-beta/alfa, en los diversos cuadros de alfa-tal. Dado que los niveles de HbA<sub>2</sub> son prácticamente nulos al nacimiento no se puede realizar en base a este parámetro el diagnóstico de beta-tal en esa etapa. Sin embargo los estudios biosintéticos sí permiten detectar desequilibrio en la síntesis de cadenas alfa y beta, con un índice inferior para la correspondiente edad gestacional de la relación gama-beta/alfa. Por idénticos procedimientos, también ha sido posible la identificación de un raro caso de gama-beta-tal al nacimiento (8), haciéndose ver que dicha enfermedad debe ser sospechada en casos de anemia hemolítica hipocrómica del recién nacido. Para el diagnóstico postnatal de beta-tal clásica (tipo HbA<sub>2</sub> alta) uno puede esperar que los valores de la Hb A<sub>2</sub> lleguen a tener valor diagnóstico luego de los seis meses de edad, y si se tratara de la variedad delta beta-tal (F-tal), para efectos de la Hb F, lo recomendable sería hacer los estudios luego del primer año de edad (15).

Salvadas estas consideraciones, el diagnóstico de los cuadros de beta-tal menor se puede plantear y discutir seguidamente. Pearson y col. (19) consideran que la determinación del VCM por método electrónico permite hacer el diagnóstico presuntivo de beta-tal si este índice es menor de 79 fl, siempre y cuando se descarte la anemia por deficien-

cia de hierro, para lo cual será necesario practicar posteriormente las determinaciones de FeS y obtener el I.S. Los autores consideran que es posible asimismo con este procedimiento hacer también el diagnóstico de alfa-tal, al menos del rasgo (alfa-tal 1), y con mayor razón de la enfermedad por HbH. Sin embargo, al basarse el escrutinio únicamente en aquel índice eritrocítico absoluto (VCM), dejan de lado la no infrecuente variedad de delta/beta-tal, toda vez que se preconiza que luego del análisis del VCM se proceda a la cuantificación de la HbA<sub>2</sub>, y en la F-tal esta hemoglobina se halla en límites normales o disminuidos, en tanto que la HbF -que no la estudian- se encuentre en este fenotipo en el rango de 5 a 20 por ciento. Por otro lado Pierce y col. (20), y Knox Macaulay y col. (12), han propuesto que un buen escrutinio para talasemia es la determinación de la HCM, considerándose un valor menor de 27 pg como dato sugere de talasemia, siempre y cuando se excluya la anemia ferropriva. Este abordaje adolece de las mismas deficiencias apuntadas anteriormente para el uso del VCM como parámetro seleccionador de escrutinio, pues de nuevo se omite la pesquisa de F-tal. Es bien sabido que en síndromes talasémicos heterocigotas es usual una eritrocitosis, por lo que el VCM tiende a ser más bajo que en la deficiencia de hierro. Mentzer (17) al relacionar el VCM y el cómputo de eritrocitos, propone que esta razón puede servir para diferenciar la beta-tal de la anemia ferropriva, ya que según su experiencia esa relación es menor de 13 en tal y mayor de 13 en la anemia por deficiencia de hierro. Por otro lado, England y Fraser (5) propusieron para el mismo fin la llamada función discriminante (FD):  $FD = VCM - (Hb \times 5) - \text{eritrocitos} (10^6/\text{ul}) - 3.4$ . Cuando el valor es negativo se considera el diagnóstico de beta-tal, en tanto que si lo es positivo se sugiere anemia ferropriva. Otras tantas fórmulas se han propuesto para lograr la diferenciación presuntiva de estas dos entidades clínicas, todas ellas basadas también en índices eritrocíticos (cuadro 1), sin que sean definitivamente diagnósticos toda vez que los valores obtenidos en casos de beta-tal se traslapan no sólo con los de la anemia ferropriva, sino también en ocasiones con valores normales, y no son útiles en policitemia con deficiencia de hierro o en estados clínicos con hemodilución, como esplenomegalia y embazo (5, 7).

Por lo tanto, nosotros consideramos, al igual que otros autores que el diagnóstico convencional de los síndromes de beta-tal requiere de la electroforesis de la hemoglobina, la cuantificación de las fracciones menores (por ejemplo Hbs A<sub>2</sub> y F) y, si es pertinente, la medición cuantitativa del FeS y la determinación del I.S. y una fragilidad osmótica (F.O.) presuntiva.

Muchos autores, especialmente de habla inglesa, no consideran de valor práctico la prueba de la F.O. como medida presuntiva en el diagnóstico de síndromes talasémicos, vale decir, de condiciones hipocrómicas. Nosotros hemos adoptado con singular éxito la prueba presuntiva de fragilidad osmótica disminuida preconizada por Kattamis y

col. (11), la cual se basa en el uso de 5 ml de una solución tamponada de NaCl al 0,36 por ciento y 20 ul. de sangre total. Tal y como lo señalan los autores mencionados, en casos de beta tal-menor la hemólisis es menor de 85 por ciento en el 96-100 por ciento de los casos. Por otra parte, un 68 por ciento de los individuos con anemia ferropriva (Hb menor de 10 g/dl) también la dan anormal, así como el 80 por ciento de pacientes con el rasgo de alfa-tal. Este valioso, práctico y rápido dato de la fragilidad osmótica en un solo tubo, en unión del estudio cuidadoso del frotis sanguíneo, nos ofrece la oportunidad de sospechar o de excluir un cuadro talasémico menor. Seguidamente se procede a una electroforesis de escrutinio en acetato de celulosa a pH alcalino. Corriendo estándares o controles conocidos con HbA<sub>2</sub> alta y baja, se comparan las incógnitas y se determinan en forma visual, semicuantitativamente, la densidad de las fracciones pequeñas (HbA<sub>2</sub> y HbF).

Ya a este nivel se puede presumir qué tipo de tal se presenta en un dado caso. En el flujograma que propusiéramos para el diagnóstico de talasemias en el primer artículo de esta serie (21) no se indicó posible presencia de las raras Hb Constant Spring (fenotipo de alfa-tal, en cantidades menores del 1-2 por ciento y con migración lenta, aún más que la HbA<sub>2</sub>), ni de la Hb Lepore (fenotipo de beta-tal, usualmente en concentraciones entre 5-15 por ciento y con una posición electroforética semejante a la de la Hb S), por cuanto complica el flujograma, habida cuenta de que fue diseñado para las condiciones talasémicas más frecuentes.

En cuanto al diagnóstico postnatal de alfa-tal, en la mayor parte de los casos se podrá demostrar desde el inicio del escrutinio analítico que en el fenotipo alfa-tal 1, y con mayor razón en enfermedad por Hb H, la Hb A<sub>2</sub> se halla disminuida. En el adulto es esperable no demostrar por electroforesis Hb H (la contrapartida postnatal de la Hb Bart) en el síndrome heterocigoto de alfa-tal 1. Sin embargo, en la enfermedad por Hb H, son usuales los valores de 3-30 por ciento de éste electroforéticamente rápido tetramero de cadenas beta. Siendo la Hb H fácilmente oxidable y precipitable por un colorante redox, tal y como lo es el útil y práctico azul de cresil brillante, la investigación de cuerpos de inclusión es obligada ante la sospecha de alfa tal. En alfa tal 2 no es posible evidenciar ni Hb H ni cuerpos de inclusión.

En el fenotipo alfa-tal 1 sí se encuentran cuerpos de inclusión, al menos en un eritrocito por cada 50.000-100.000 de ellos, hecho que hace tediosa la investigación cuando se estudian muchas muestras. Se ha sugerido que es posible obtener mayor positividad en estos casos si se usa sangre enriquecida con reticulocitos y eritrocitos jóvenes. Considerándose aún así que el diagnóstico de alfa-tal 1 y de alfa-tal 2 puede ser conflictivo, se ha sugerido el uso de índices eritrocíticos para tal fin, tal y como se expuso para beta-tal menor. En torno a la pesquisa del rasgo de alfa-tal, su diag-

nóstico se debe considerar en todos aquellos pacientes con origen étnico de "alto riesgo" que presentan anemia microcítica hipocrómica refractaria, luego que se ha excluido la deficiencia de hierro y el rasgo de beta-tal. En el mismo sentido, se ha sugerido que la combinación de microcitosis, valores normales o bajos de Hbs A<sub>2</sub> y F, y FeS e I.S. normales, debe sugerir rasgo de alfa-tal, en especial cuando los mismos hallazgos hematológicos se encuentran en familiares de primer grado.

Se ha sugerido que la HbA<sub>2</sub> se halla elevada en la beta-tal heterocigota como resultado de la disminución en la síntesis de cadenas beta que ocasiona un incremento compensatorio en la síntesis de cadenas delta. Se sabe también que el déficit de hierro causa una disminución de la síntesis de la HbA<sub>2</sub> tanto en individuos normales como en los portadores del estigma beta-tal, pudiendo encontrarse en estos últimos, bajo tal circunstancia, la HbA<sub>2</sub> dentro del rango normal. De lo anterior se infiere que el rasgo de beta-tal debe por lo tanto sospecharse en aquellos casos en los cuales la respuesta a una anemia hipocrómica es sólo

parcial, persistiendo la microcitosis y la hipocromía luego del tratamiento para la supuesta deficiencia de hierro. Como es posible entonces que coexista deficiencia de hierro y beta-tal (combinación bastante común en niños jóvenes y durante el embarazo) puede ser necesaria la determinación del índice de saturación de hierro al suero o la cuantificación de ferritina sérica, como también la investigación de hemosiderina en médula ósea para identificar estos casos. Algunos hallazgos de laboratorio que permiten la diferenciación de los más frecuentes rasgos de beta-tal de la anemia por deficiencia de hierro, se han presentado en el Cuadro 1.

En síndromes de alfa-tal, detectados en la etapa postnatal, los niveles de HbA<sub>2</sub> se encuentran reducidos, especialmente en la enfermedad por Hb H, en vista de que las cadenas beta compiten más ávidamente que las delta en su unión con las cadenas alfa asequibles. Por otra parte, en la Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHbF), una condición hereditaria estrechamente ligada a las beta-tal, los bajos niveles que se pueden observar de Hb A<sub>2</sub> son el resultado de un trastorno molecular, pues en el estado heterocigoto se ha perdido un gene de cadenas delta, y en el homocigoto hay ausencia total de esa Hb. Por otro lado, la Hb A<sub>2</sub> puede encontrarse ligeramente alta si se heredan concomitantemente genes de beta-tal y de PHHbF, aunque otros autores señalan que tal Hb puede ser tan alta en esta doble combinación como en beta-tal no complicada (16). En la variedad de F-tal los niveles de la Hb A<sub>2</sub> son normales o ligeramente disminuidos, interpretándose estos hallazgos en base al mecanismo molecular que se halla implicado, cual es la pérdida de actividad de un gene delta en el heterocigoto. La ausencia de Hb A<sub>2</sub> y de Hb A en el paciente homocigoto por F-tal (una variedad de Enfermedad de Cooley), no hace sino corroborar la ausencia total de síntesis de cadenas delta y beta por pérdida del complejo de genes delta/beta.

CUADRO No. 1

**DIFERENCIACION ENTRE RASGO DE BETA TALASEMIA  
Y ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO**  
(Hb de 9 a 11 g/dl)  
( 2), ligeramente modificado)

	Rasgo de beta talasemia	Anemia por deficiencia de hierro	
<b>I</b>	Pruebas presuntivas		
a)	frágilidad osmótica ( < de 85 por ciento de hemólisis, NaCl 0,36 por ciento)	más del 96 por ciento de los casos	menos del 60 por ciento de los casos
b)	células en diana y punteado basófilo	frecuentes	negativas
c)	hipocromía	+	+
d)	microcitosis	(++)	(+)
e)	poiquilocitosis	(++)	(+)
f)	eritrocitosis	+	-
<b>II</b>	Pruebas definitivas		
a)	hierro sérico	normal	disminuido
b)	índice de saturación	normal o ↑	disminuido (< de 15 por ciento)
c)	cuantificación de HbA <sub>2</sub> (electroforesis o microcromatografía)	↑ (A <sub>2</sub> -tal)	normal o ↓
d)	Hb F (electroforesis y desnaturalización alcalina)	↑ (F-tal)	normal
<b>III</b>	Hallazgos asociados		
F.D.*	+ , usualm. >6,0	- , usualm. < de 6.0	
VCM/eritrocitos (10 <sup>6</sup> /ul)	< de 13	> de 13	
HCM/eritrocitos (10 <sup>6</sup> /ul)	< de 4,4	> de 4,4	
protoporfirina eritrocítica	normal	aumentada	
ferritina sérica	normal	baja	
reticulocitos	2-4 por ciento	normales	

\*Función discriminante – VCM–(5 X Hb) – eritrocitos –3.4.

El cuadro guarda estrecha semejanza con la forma homocigótica de PHHbF, aunque la distinción hematológica es obvia —a pesar de que en ambas sólo se sintetice Hb F—, pues en esta última no hay anemia hipocrómica ni otros hallazgos de clásico estigma talasémico. La rara variedad de beta-tal con Hbs A<sub>2</sub> y F altas se ha descrito tanto en caucásicos, como en raza negra. En algunos casos de anemia sideroblástica se han observado valores bajos de Hb A<sub>2</sub>, desconociéndose el efecto bioquímico específico que condiciona tal anomalía, aunque se sugiere que la síntesis de cadenas delta se halla disminuida o suprimida. Estudios previos habían señalado un incremento de la Hb A<sub>2</sub> en pacientes con anemia megaloblástica y que los valores más altos eran correspondientes con la mayor severidad de la anemia, retornándose a los valores normales luego del tratamiento respectivo. Alperin y col. (1) han observado niveles normales de Hb A<sub>2</sub> en beta-tal heterocigota complicada con anemia debida a deficiencia de ácido fólico, contrario de lo que se esperaría, es decir, de valores inusualmente altos de Hb A<sub>2</sub>. En estos casos, luego del tratamiento con ácido fólico, los valores de esa pequeña fracción se encontraron dentro del rango esperable para beta-tal. Los mismos autores demostraron que en pacientes con beta-tal complicada con anemia perniciosa, los niveles de la Hb A<sub>2</sub> eran altos, no alterándose luego de instaurado el tratamiento con vitamina B<sub>12</sub>. Estos hallazgos difieren de los comunicados por Lee y Fielding (14), los cuales sí observaron cambios apreciables positivos en los niveles de la Hb A<sub>2</sub> luego del tratamiento específico. También han sido descritos valores sobre lo normal de la Hb A<sub>2</sub> en ciertas hemoglobinas inestables de cadena beta.

En raros casos, un portador obligado de beta-tal puede presentar niveles normales de Hbs A<sub>2</sub> y F, sin anemia y con una morfología roja normal. Estos portadores “silenciosos” pueden demostrar, sin embargo, una disminución de la razón sintética beta/alfa. Otros portadores silenciosos pueden presentar anemia ligera, disminución de los índices eritrocíticos, ligeros cambios en la morfología roja y valores normales de Hbs A<sub>2</sub> y F, con disminución de la razón beta/alfa.

Millard y col. (18) han demostrado en población negra de Jamaica, que los niveles de Hb y el valor de los índices VCM y HCM fueron significativamente más bajos en el tipo de beta<sup>0</sup>-tal heterocigota (gene supresor) en comparación con el beta<sup>+</sup>-tal (gene depresor), no habiendo diferencia en cuanto al nivel de la Hb A<sub>2</sub>. Sin embargo no es posible diferenciar claramente casos individuales de estos dos tipos de beta-tal, a no ser que medien estudios familiares en donde se halle asociada la beta-tal con una variante de Hb de cadenas beta. Lo interesante del trabajo de los autores mencionados es el haber demostrado que en algunos individuos con beta<sup>+</sup>-tal los valores de VCM, HCM y Hb A<sub>2</sub> ocasionalmente se traslapan con aquéllos observados en la población normal, quedando la duda acerca de la exactitud de esos criterios analíticos en la identificación de todos los casos de be-

ta<sup>+</sup>-tal. Por lo tanto, los autores plantean que los estudios tendientes a descubrir el gene beta<sup>+</sup>-tal en base únicamente a mediciones de Hb A<sub>2</sub> o del índice VCM, puede dar lugar a una subestimación acerca de la prevalencia de ese gene beta<sup>+</sup>-tal. La frecuencia relativa de los genes beta<sup>+</sup> y beta<sup>0</sup> en otras comunidades aparte de la jamaicana no se conoce, pues su distinción depende de la medida de la biosíntesis de globina (un procedimiento técnico muy complejo), o como se indicó, de su interacción con variantes de la Hb de cadenas beta. En todo caso, lo que sí se sabe es que los síndromes talasémicos en raza negra, comparados con los propios de la población mediterránea u oriental, son menos expresivos tanto clínica como hematológicamente.

La presencia de Hb Bart más allá del período neonatal, sin elevación importante de la Hb H, se ha sugerido como producto de la presencia concomitante de genes de alfa-tal y de beta o delta/beta-tal, presentándose un cuadro clínico y hematológico muy variable de acuerdo a los tipos y al número de genes talasémicos presentes. En este tipo de combinación genética la Hb A<sub>2</sub> puede estar incrementada, aunque también lo puede ser normal o disminuida, precisamente por la complejidad y diversidad de los genotipos hemoglobínicos implicados.

Como se ha visto, muchos desórdenes hereditarios y adquiridos pueden alterar los niveles de Hb A<sub>2</sub>, y por lo tanto el diagnóstico de beta-tal menor clásica como el del rasgo de alfa tal no pueden ser establecidos o excluidos simplemente con base en la medición de dicha Hb. Por ello, deben ser considerados datos clínicos, familiares y de laboratorio, cuando se evalúan los resultados obtenidos en su cuantificación. Al reiterar que los síndromes de beta-tal comprenden al menos otros dos cuadros genéticos más como son la F-tal y el rasgo de Hb Lepore, pareciera conveniente que los análisis diagnósticos se lleven a cabo bajo una concepción analítica integral.

Por tales motivos, nos parece prudente recomendar nuestro protocolo o flujograma analítico que señaláramos en el artículo anterior (21), no sin antes destacar que en el mismo no se incluyen los importantes estudios de biosíntesis de globina, pues fue nuestro interés ofrecer una marcha analítica convencional, asequible y práctica para cualquier laboratorio de hematología.

Una importante fase en la prevención de las deletéreas formas de alfa y beta-tal homocigotas, es la detección de los estados heterocigotas en la edad adulta. Estos abordajes analíticos deben ser aún más exigentes en aquellas poblaciones en donde se haya detectado una alta incidencia de las taras o rasgos talasémicos. En este sentido son necesarias pruebas de escrutinio en todos aquellos individuos con anemia hipocrómica refractaria al tratamiento con hierro. Los análisis presuntivos, así como los confirmatorios fueron esbozados en el primer artículo (21). Una vez identificados los individuos con el trastorno, deben recibir edu-

cación a través de un consejo genético que les permita comprender la naturaleza de la enfermedad y de sus implicaciones genéticas. Baste con recordar que dos individuos heterocigotas afectados que deseen contraer matrimonio tendrán una posibilidad en cuatro de engendrar un hijo homocigoto severamente enfermo.

### HEMOGLOBINAS ANORMALES:

Desde un punto de vista práctico, son hemoglobinas anormales, clínicamente importantes, aquéllas que forman parte de los síndromes drepanocíticos (AS, SS, SC, s/betal, etc.), las hemoglobinas inestables (de las cuales hay como 85 variantes), y las hemoglobinas con una afinidad alterada hacia el oxígeno (existiendo 30 variantes) con alta afinidad y, por lo tanto, con eritrocitosis; y 3 con baja afinidad, con cianosis familiar, y 5 hemoglobinas M, también con cianosis hereditaria (2).

En cuanto a hemoglobinas anormales, tal y como lo indicáramos en nuestro artículo anterior (21) el escrutinio inicial para éstas lo hacemos a partir de la electroforesis de Hb en acetato de celulosa a pH alcalino, ya que es el medio que ofrece en menor tiempo la mejor discriminación analítica de las variantes. Especial valor tiene para el hallazgo de las mutantes tanto rápidas como lentas y permite asimismo una semicuantificación de las varias fracciones que se observan. El uso de la electroforesis en gel de agar ácido es un procedimiento que se utiliza cuando se ha encontrado alguna fracción anormal a pH alcalino o cuando haya una sospecha razonable de hemoglobinopatía no dilucidada en el estudio inicial a pH alcalino. Por otra parte, la electroforesis en agar a pH 6.1 es un método electivo para la detección de nuestras principales hemoglobinas anormales (S, C) en sangres de neonatos y niños de pocos meses. La combinación de los dos métodos ofrece una información muy valiosa en torno a la identificación de las hemoglobinas mutantes más frecuentes, así como de posibles variantes nuevas. Ante una fracción que migre en la posición de la Hb S o de la Hb C se debe practicar la prueba de solubilidad de la oxiHb a fin de corroborar la presencia de la frecuente Hb S (la cual es insoluble) y diferenciarla de las Hbs D, G, Korle-Bu (que son solubles), así como de la Hb C (que es soluble) de la Hb C Harlem (que es insoluble). La ventaja de la prueba de solubilidad sobre la obsoleta prueba de inducción de drepanocitos con metabisulfito de sodio, estriba en su rapidez y sensibilidad, así como por el hecho de que puede cuantificarse en 20 minutos, lo que da una información de gran valor acerca de si se trata del rasgo AS (solubilidad entre 25-35%) y la anemia drepanocítica (8-15%).

En cuanto a la detección de variantes hemoglobínicas inestables muchas de ellas silenciosas (es decir, con migración igual a la Hb A), es prudente consignar la valoración de métodos que hacen Efremov y Huisman (4) en este sentido, al sugerir que la presencia de una Hb inestable se establezca en base a los siguientes hallazgos:

1. Los eritrocitos de una muestra de sangre fresca pueden formar cuerpos de Heinz en presencia o ausencia de fenilhidracina en mayor número que los eritrocitos de una muestra similar de un control normal.
2. La estabilidad de la hemoglobina en un hemolizado de eritrocitos preparado en fresco a temperaturas variables entre 50 y 70°C, es mucho menor que la de un control normal. Igualmente, un hemolizado preparado en fresco que contenga una variable inestable puede mostrar una mayor precipitación a 37°C en presencia del amortiguador isopropanol-tris pH 7.4.
3. Aumento en la disociación de la molécula de hemoglobina en monómeros puede demostrarse después del tratamiento con mercuribenzoato; con frecuencia, la subunidad inestable puede precipitarse de forma irreversible.
4. Cadenas libres  $\alpha$  y  $\beta$  pueden demostrarse en un hemolizado preparado en fresco en el que se emplea electroforesis en gel de almidón a un pH alcalino.

Nosotros preconizamos la siguiente marcha analítica: hemoglobinograma de escrutinio, investigación de cuerpos de inclusión luego de inducirlos a 37°C por 3 horas con el uso de azul cresil, como también luego de incubarse la sangre por 24-48 horas a 37°C; pruebas de estabilidad con alcohol isopropílico a 37°C y luego a 50°C, pruebas de solubilidad y autohemólisis (con pre y post medición de metHb), y electroforesis de la Hb en gel de almidón.

A pesar de la gran variabilidad clínica con que se presenta la patología hemolítica por hemoglobinas inestables (anemias hemolíticas congénitas con cuerpos de Heinz), se puede señalar que se trata de procesos que se agravan por infecciones virales o bacterianas y por la administración de drogas oxidantes, caracterizándose por la emisión de orina oscura o "dipirrólica", reticulocitosis, aumento de las bilirrubinas, disminución de las haptoglobinas, morfología eritrocítica básicamente normal con ligera hipocromía y presencia de cuerpos de Heinz en muestra de sangre incubada a 37°C por 24 horas (2).

La investigación de Hb F eritrocítica, se realiza en aquellas muestras que presentan niveles aumentados de Hb F en electroforesis, lo cual se confirma mediante el método cuantitativo de Singer et al. (24). Con aquel procedimiento se demuestra si la distribución de Hb F es homogénea o heterogénea. Una distribución homogénea de Hb F indica PHHbF, mientras que un patrón heterogéneo o irregular se observa en cualquiera de las hemoglobinopatías primarias y enfermedades talasémicas asociadas con un aumento secundario de los niveles de aquella Hb, así como también en otras condiciones y en un fenotipo hereditario de tipo persistencia, denominada PHHb heterocelular. La electroforesis en acetato de celulosa en tampón de fosfatos, pH 6.5-7.0 se hace para discriminar fracciones rápidas, toda vez que en este medio solamente migran hacia el ánodo las Hb H y Bart, las cuales, por otra parte, podrán ofrecer característi-

cas que les son particulares, tanto en acetato, como en geles de agar y almidón, y, para la Hb H, la formación de cuerpos de inclusión y su señalada insolubilidad en ditionito, de acuerdo con su concentración.

La electroforesis de globina tanto a pH 5 como de 9 permite en gran medida la identificación de la cadena mutante de una Hb en estudio (23). Estos procedimientos simples y rápidos permiten la caracterización preliminar de hemoglobinas y, en unión de los otros análisis ya mencionados permiten la diferenciación con un alto grado de especificidad de algunas hemoglobinas que presentan una carga eléctrica neta muy similar. La prueba de la P50 se debe hacer en aquellos casos en que se sospecha alteración hemoglobínica hacia la afinidad por el oxígeno. La duda puede presentarse desde el inicio en que se plantean valores elevados o disminuidos de Hto/Hb, ya sea porque el paciente presenta policitemia o cianosis, respectivamente, o porque el análisis estructural de la mutante sugiera posible relación con la función oxigenante de una hemoglobina en estudio.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alperin, J. B.; Dow, P. A.; Petteway, M. B. Hemoglobin A<sub>2</sub> levels in health and various hematologic disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 67: 219, 1977.
- 2.- Bunn, H. F.; Forget, B. G.; Ranney, H. M. Hemoglobinopathies, Vol. XII, Chapter 2, pp. 28-94. Series Major Problems in Internal Medicine. Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, USA, 1977.
- 3.- Dozy, A. M., Kan, Y. W., Embury, S. H. et al. Alpha-globin gene organization in blacks preclude the severe form of alpha-thalassemia. *Nature* 280: 605, 1979.
- 4.- Efremov, G. D. y T. H. J. Huisman. Diagnóstico de laboratorio en las hemoglobinopatías. En: Weatherall, D. J. (Ed.) Clínica hematológica (Hemoglobinas anormales) Barcelona: Salvat, 1976. Págs. 317-354.
- 5.- England, J. M.; Fraser, P.M. Differentiation of iron deficiency from thalassemia trait by routine blood-count. *Lancet* 1: 449, 1973.
- 6.- Frempong, K. O. & Schwartz, E. Clinical Features of Thalassemia. *Pediat. Clin. North Am.* 27: 403, 1980.
- 7.- Hedge, U. M.; Khunda, S.; Marsh, G.W.; Hart, G. H.; White, J. M. Thalassemia, iron, and pregnancy. *Brit. Med. J.* 234: 509, 1977.
- 8.- Kan, Y. W.; Forget, B. G.; Nathan, D.G. Gamma-beta thalassemia: A cause of hemolytic disease of the newborn. *No. Engl. J. Med.* 286: 129, 1972.
- 9.- Kan, Y. W.; Golbus, M. S.; Dozy, A. M. Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia. Clinical application of molecular hybridization. *N. Engl. Med.* 295: 1165, 1976.
- 10.- Kan, Y. W.; Trecartin, R.; Golbus, M.S.; Filly, R. A. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia and sickle cell anemia: Experience with 24 cases. *Lancet* 1: 269, 1977.
- 11.- Kattamis, C.; Efremov, C. D.; Pootrakul, S. Osmotic fragility screening for beta-thalassemia trait. The ICEH Expert panel in abnormal hemoglobins and thalassemia (reprint), 1978.
- 12.- Knox-Macaulay, H.H.M.; Weatherall, D.J.; Clegg, J. B.; Pembrey, M.E. Thalassemia in the British. *Brit. Med. J.* 3: 150, 1973.
- 13.- Koenig, H. M.; Vedvick, T. S.; Dozy, A.M.; Golbus, M.S.; Kan, Y. W. Prenatal diagnosis of hemoglobin H disease. *Pediatrics.* 92: 278, 1978.
- 14.- Lee, C.A.; Fielding, J. Combined dietary vitamin-B<sub>12</sub> deficiency and beta-thalassemia trait. *Lancet* 2: 127, 1975.
- 15.- Lehmann, H.; Hunstman, R. G. Man's hemoglobins. Revised edition, XI 478 pp. Publisher North-Holland. Publishing Amsterdam, 1974.
- 16.- Martínez, G.; Colombo, B. A new type of hereditary persistence of foetal haemoglobin: is a diffusible factor regulation gamma chain synthesis. *Nature* 252: 735, 1974.
- 17.- Mentzer, W. C. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1:882, 1973.
- 18.- Millard, D. P.; Mason, K., Serjeant, G. R. Comparison of haematological features of the Beta<sup>0</sup> and Beta<sup>+</sup> thalassaemia traits in Jamaican Negroes. *Brit. J. Haematol.* 36: 161, 1977.
- 19.- Pearson, H. A.; O' Brien, R.T., Muinstosh, S. I. Screening for thalassaemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume (MCV). *N. Engl. J. Med.* 288: 351, 1973.
- 20.- Pierce, H. I.; Kurachi, S.; Sofroniadou, K.; Stamatoyanopoulos, G. Frequencies of thalassemia in American Blacks. *Blood* 49: 981, 1977.
- 21.- Sáenz, G. F. y Chaves, M. El Hemoglobinograma. I. Conceptualización y Consideraciones Analíticas. *Act. Méd. Cost.* (en prensa).
- 22.- Schmar, A. H.; Harol, B. A.; Maurer, M.; Johnston, C.L., Scott, R. B.; Alpha thalassaemia screening in neonates by mean corpuscular volume and corpuscular hemoglobin determination. *J. Pediatrics.* 83: 794, 1973.
- 23.- Schneider, R. G. Differentiation of electrophoretically similar hemoglobin-such as SDG, and P., or A<sub>2</sub>, C. E, and O- by electrophoresis of the globin chains. *Clin. Chem.* 20:1111, 1974.
- 24.- Singer, K.; Chernoff, A. I.; Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle-cell anemia and other hematologic disorders by means alkali denaturation. *Blood* 6: 413, 1951.
- 25.- Wasi, P., Na-Nakorn, S; Pootrakul, S. Las talasemias alfa. En: Clínica Hematológica (Hemoglobinas Anormales), Cap. VII, Vol. 2, núm. 2, pp. 169-198, 1976.
- 26.- Weatherall, D. J. Abnormal haemoglobins in the neonatal period and their relationship to thalassaemia. *Brit. J. Haemat.* 9: 265, 1963.