



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Detección de hemoglobina S utilizando
cromatografía de líquidos de alta resolución
(HPLC) vs. electroforesis y su asociación con
la inducción de drepanocitos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GUADALUPE GARCÍA MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: QFB. PABLO DIAZ PIEDRA

ASESORA DE TESIS: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE



México, D.F. a 19 de Junio de 2013.

"Si se siembra la semilla con fe y se cuida con perseverancia, sólo será cuestión de tiempo recoger sus frutos"

Tomás Carlyle

"Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte."

Leonardo Da Vinci

"Ten paciencia y también tendrás una recompensa."

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los compañeros que laboran en el departamento de Hematología del laboratorio Carpermor por el apoyo brindado para realización de este trabajo.

Al QFB. Pablo Díaz Piedra por la paciencia que me tuvo durante todo éste tiempo.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde con inmensa gratitud por su disposición y paciencia en todo momento.

A mis sinodales la M. en C. Rosa Elba Galván Duarte, a la M. en C. Araceli García del Valle y a la Mtra. Leonor Aguilar Santelises, por el tiempo que dedicaron para la revisión, los comentarios y a las correcciones realizadas para la tesis.

Muchas gracias a todos ustedes

DEDICATORIAS

A Dios, por haberme permitido llegar a este punto de mi vida y dejarme lograr mis metas, por estar conmigo iluminando mi camino, dándome salud y fortaleza en todo momento.

A mis padres, que son el pilar más importante en mi vida y que siempre han creído en mí, por los sacrificios que hacen día a día, su paciencia, sus enseñanzas, el apoyo, la entrega, la motivación constante y por estar en los momentos difíciles.

A mis hermanos: José, Vicente, Juan, Santiago, Jesús, Adrian, Manuel, Aurora, Isidro, María, al pequeño Héctor y a mis sobrinos. Gracias porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado.

A mis amigos, gracias por su amistad, por la ayuda y las palabras de aliento que me brindaron hasta el final de este gran trabajo.

A Víctor M. Cruz, por tu comprensión, tus consejos y el apoyo en los momentos difíciles. Te quiero mucho.

Contenido

1.	Resumen.....	2
2.	Introducción	3
3.	Marco teórico	4
3.1.	Estructura de la hemoglobina	4
3.1.1	Hemo.....	5
3.1.2	Globina	5
3.1.3	Molécula completa	6
3.1.4	Biosíntesis	7
3.1.5.	Destrucción eritrocitaria	9
3.1.5.1.	Hemólisis extravascular	9
3.1.5.2.	Hemólisis intravascular	10
3.1.6	Hemoglobina normal y sus variantes.....	11
3.2	Hemoglobinopatía.....	13
3.2.1	Hemoglobinopatía S.....	14
3.2.2	Genética de la hemoglobinopatía S.....	15
3.2.3.	Fisiopatología	17
3.3	Anemia de células falciformes (drepanocitosis).....	18
3.3.1.	Manifestaciones clínicas	19
3.4	Hemoglobinopatía S en la población mexicana	21
3.5.1	Electroforesis	22
3.5.2	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	24
3.5.3	Inducción de drepanocitos.....	26
3.5.4	Biometría hemática.....	26
4.	Planteamiento del problema.....	27
5.	Hipótesis.....	27
6.	Objetivos	28
7.	Material y método.....	28
7.1	Tipo de estudio.....	28
7.1.1	Criterio de inclusión.....	28
7.1.2	Criterio de exclusión.	28
7.2	Variable	29

7.3	Diseño estadístico	29
8.	Procedimiento	30
9.	Resultados	32
10.	Discusión	40
11.	Conclusión	44
12.	Sugerencia	45
13.	Referencias	46

1. Resumen

Introducción: La molécula de la hemoglobina está compuesta por cuatro grupos hemo y dos pares de cadenas diferentes de polipéptidos, actúa como vehículo para el transporte de oxígeno en el organismo. La molécula de hemoglobina que contiene dos cadenas alfa y dos beta se le llama hemoglobina A, en la cual se encuentran las fracciones: Hb A1a, Hb A1b y Hb A1c. Esta última es importante para realizar el seguimiento de la diabetes mellitus. La hemoglobinopatía S (Hb S) se caracteriza por la anomalía estructural, se encuentra en la cadena de globina β en la posición 6 con una sustitución de aminoácidos: ácido glutámico por valina. Existen pruebas de laboratorio para determinar la Hb S como la inducción de drepanocitos, prueba de solubilidad, la observación de células falciformes en el frotis sanguíneo. Actualmente se han empleado diversos métodos para la detección y cuantificación de Hb como electroforesis y HPLC.

Objetivo: Determinar por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) la concentración de Hb S en muestras sanguíneas.

Material y método: Se llevó a cabo un estudio de 150 pacientes, presentaban edades entre 25 a 80 años, a los cuales se detectó la presencia de Hb S empleando HPLC, debido a que en el cromatograma se observó la fracción señalada como S-window. A todas las muestras se les realizó biometría hemática, inducción de drepanocitos, a 60 muestras se les procesó electroforesis de hemoglobinas; a éstas se les realizó la correlación para comparar ambos métodos (HPLC y electroforesis), los resultados obtenidos fueron analizados mediante prueba de Pearson con una $p < 0.05$ (95% de confianza).

Resultados: Se obtuvieron 130 inducciones positivas y 20 inducciones negativas. Los porcentajes detectados de Hb S oscilan entre 35 a 45%, éste rango lo presentaron 149 pacientes, los cuales fueron clasificados como heterocigotos, presentaron valores normales en los parámetros hematológicos. Se presentó el caso de una paciente homocigota de 32 años a la cual se detectó un porcentaje de 73.2% de Hb S. En el frotis de sangre se observaron poiquilocitosis, abundante basofilia difusa, abundantes células falciformes, 18% de eritroblastos y presentó 10% de reticulocitos. Los valores de los parámetros hematológicos estaban alterados. La inducción de drepanocitos fue positiva. De las 150 muestras, se seleccionaron 60 muestras, las cuales se procesaron mediante electroforesis para realizar la correlación entre HPLC. La correlación experimental obtenida entre ambos métodos fue de 36.2 %.

Conclusión: La detección de la hemoglobinopatía S se llevó a cabo por medio de electroforesis y HPLC, en ambos métodos se observan la separación y cuantificación de las fracciones normales y anormales de la hemoglobina.

2. Introducción

La hemoglobina es una proteína globular, presente en los eritrocitos que transporta el oxígeno en el organismo. A su vez la hemoglobina de los seres humanos está compuesta por tres variedades de hemoglobina llamadas: hemoglobina A, hemoglobina A₂ y hemoglobina F. La hemoglobina A es la más abundante porque sola representa el 97%. Dentro de ésta misma fracción se encuentran las siguientes hemoglobinas: Hb A1a, Hb A1b y Hb A1c.

Las hemoglobinopatías son trastornos hereditarios en los que la anomalía estructural es resultado de una alteración del código genético para una o más cadenas de la globina. La hemoglobinopatía S (Hb S) se caracteriza por la formación de células drepanocíticas, la anomalía estructural se encuentra en la cadena de globina β en la posición 6 con una sustitución de aminoácidos: ácido glutámico por valina. La sustitución de un aminoácido genera cambios en la solubilidad molecular de la hemoglobina.

En este sentido la drepanocitosis es una enfermedad genética, cada individuo tiene dos genes para las cadenas beta de cada uno de los padres; si un individuo hereda un gen de una cadena beta anormal es un heterocigoto AS; si hereda los dos genes es un homocigoto SS.

Así mismo, las complicaciones clínicas generalmente se manifiestan en estado homocigoto siendo las principales: crisis vaso oclusiva, crisis hemolítica, alteraciones óseas, etc. La condición heterocigota en ocasiones pasa desapercibida y es diagnosticada como hallazgo. En condiciones de baja tensión de oxígeno se puede inducir la aparición de hematuria e infartos esplénicos en estos heterocigotos.

Por otro lado existen, pruebas de laboratorio utilizadas para determinar la presencia de Hb S incluyen estudio electroforético, inducción de drepanocitos, presencia de células falciformes en frotis sanguíneo. De ahí que existen pocos artículos que incluyen estas pruebas mencionadas para el diagnóstico de esta hemoglobinopatía, así como también de la correlación entre HPLC y electroforesis.

3. Marco teórico

3.1. Estructura de la hemoglobina

La molécula de la hemoglobina es una proteína conjugada, está formada por 4 subunidades, 2 cadenas alfa y 2 cadenas beta del tipo de globina, el gen para la beta globina está localizado en el cromosoma 11, éste es un miembro de la familia de los genes de la globina, que es un grupo involucrado en el transporte del oxígeno.¹ La hemoglobina es un pigmento rojo con un peso molecular de 68 000 daltons y actúa como vehículo para el transporte de oxígeno en el organismo.² (Figura 1).

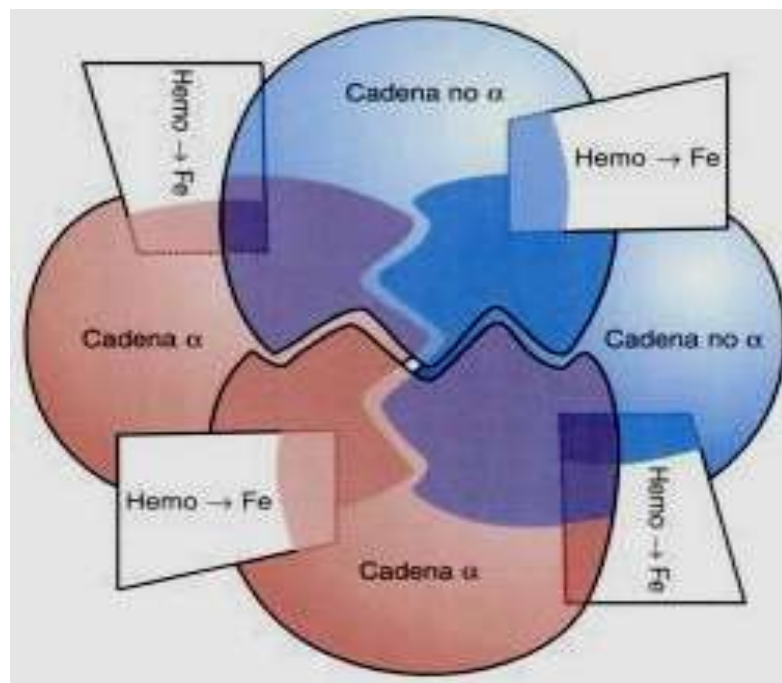


Figura 1. Molécula de la hemoglobina. Tomado de Rodak FB. (2004)⁵

3.1.1 Hemo

El grupo hemo es un anillo de átomos de carbono, hidrógeno y nitrógeno denominado protoporfirina IX con un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}) unido (ferroprotoporfirina). Cada grupo hemo se ubica en un área de la cadena de polipéptidos cerca de la superficie de la molécula de hemoglobina.³ (Figura 2)

El componente hemo puede combinarse de forma reversible con una molécula de oxígeno.^{2,3}

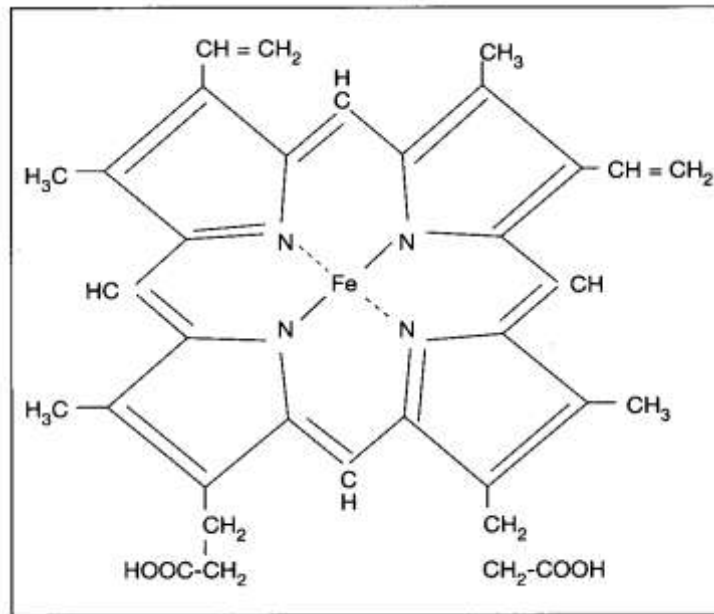


Figura 2. Protoporfirina IX+ Fe^{2+} (ion ferroso). Tomado de Rodak FB. (2004)⁵

3.1.2 Globina

La globina de la molécula de hemoglobina presenta dos pares de cadenas de polipéptidos, se forman por 141 a 146 aminoácidos cada una. Las variaciones en las secuencias de aminoácidos dan origen a diferentes tipos. Cada tipo de cadena de polipéptidos se designa con una letra griega.⁴

Cada una de las cadenas de polipéptidos se divide en 8 hélices y en siete segmentos no helicoidales. Las hélices, designadas de la A a la H, contienen subgrupos numerados para la secuencia de aminoácidos en cada hélice, las cuales son rígidas y lineales. Los segmentos no helicoidales son más flexibles y se ubican entre los helicoidales, según lo reflejan sus designaciones: NA para los residuos que se encuentran entre el extremo N y la hélice A, CD para los residuos que se encuentran entre las hélices C y D, y así sucesivamente con EF, FG, GH y HC.⁵

3.1.3 Molécula completa

Las cadenas de globina son curvas para formar una hendidura para el hemo, éste se encuentra suspendido entre las hélices E y F de la cadena de polipéptidos. El átomo de hierro que se encuentra en el centro del anillo de protoporfirina IX forma una unión con F8 (histidina proximal) y por medio del oxígeno ligado, con E7 (residuo histidina distal). Los aminoácidos en la hendidura son hidrófobos y cada cadena contiene un grupo hemo con el hierro posicionado entre dos radicales de histidina. Los aminoácidos en el exterior son hidrófilos, lo que hace que la molécula sea hidrosoluble. La organización molecular de la hemoglobina también colabora para que el hierro se mantenga en estado ferroso.⁶ (Figura 3).

La molécula completa de hemoglobina es esférica, posee cuatro grupos hemo unidos a cuatro cadenas de polipéptidos y puede portar hasta cuatro moléculas de oxígeno.⁷

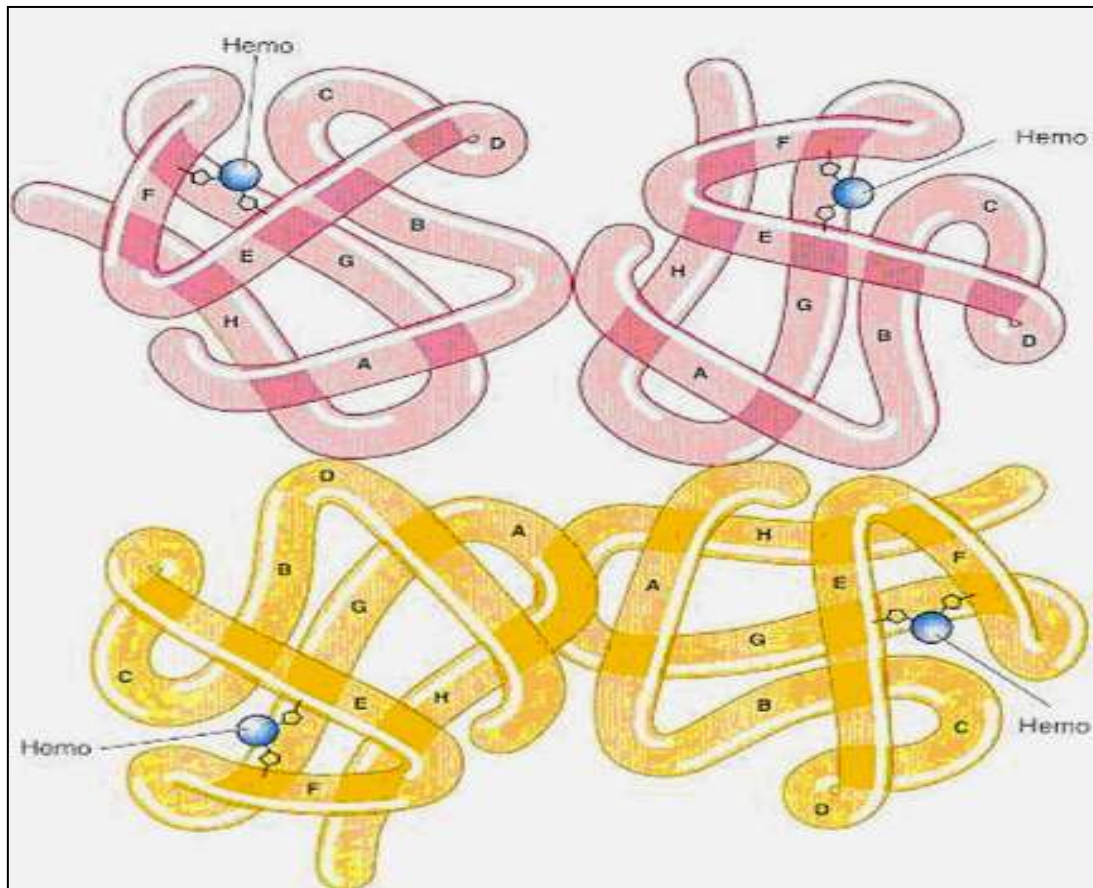


Figura 3. Molécula de hemoglobina completa. Tomado de Rodak FB. (2004)⁵

3.1.4 Biosíntesis

La biosíntesis del hemo se produce en la mitocondria y el citoplasma de los precursores del eritrocito, del pronormoblasto al reticulocito en la médula ósea. Comienza con la condensación de la glicina y la succinil coenzima A, catalizada por la ácido aminolevulínico (ALA) sintetasa para formar ALA. La ALA sintetasa requiere piridoxal 5'-fosfato como cofactor. Esta vía continúa hasta que en el último paso de la producción final del hemo el Fe^{2+} se combina con la protoporfirina IX en presencia de la ferroquelatasa para producir hemo.⁸ (Figura 4).

La transferrina, es una proteína plasmática, transporta hierro en estado férrico (Fe^{3+}) para producir eritrocitos. El hierro se dirige a través de la membrana eritrocitaria hacia la mitocondria, se une a la protoporfirina IX para producir hemo. Éste abandona a la mitocondria y se une a las cadenas de globina en el citoplasma.^{6,7,8}

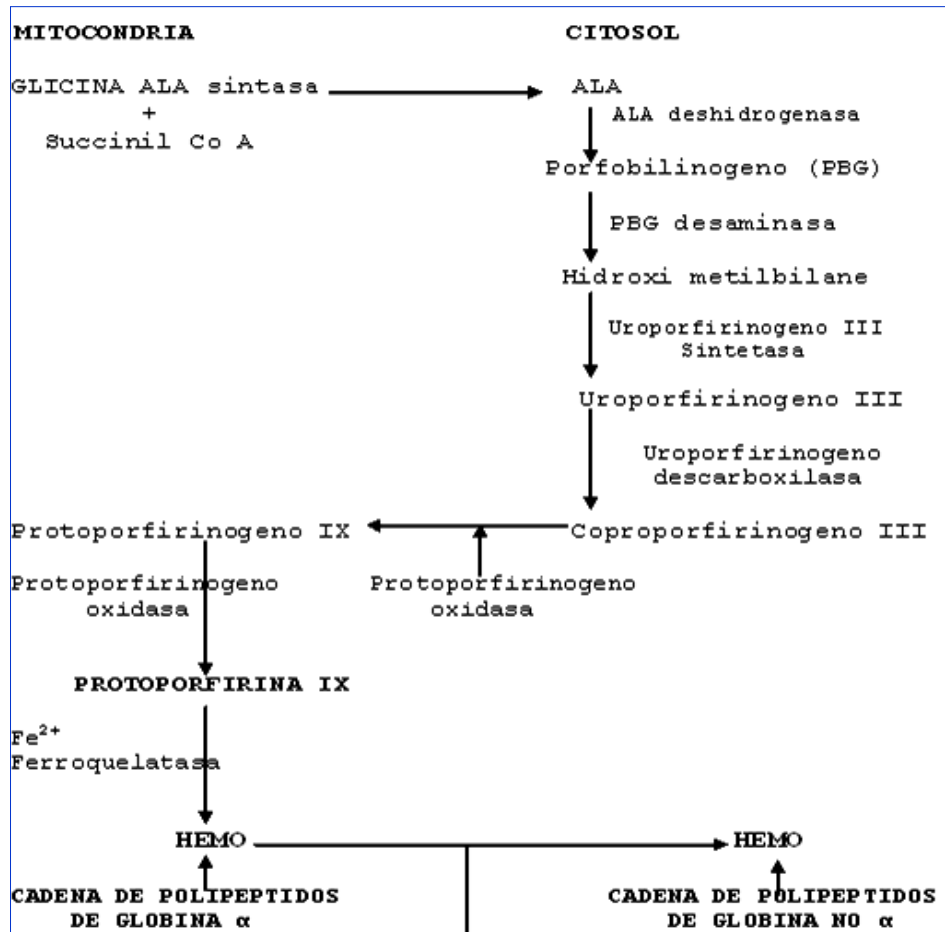


Figura 4. Armado de la molécula de hemoglobina completa. Tomado de Rodak FB. (2004)⁵

Seis genes estructurales controlan la síntesis de las seis cadenas de globinas. Los genes alfa y zeta se encuentran en el cromosoma 16, los genes gamma, beta, delta y épsilon están en el cromosoma 11. La vía de la síntesis proteica continúa en la traducción del código genético de la cadena final del polipéptido de globina. Cada grupo de cadenas simples se sintetiza en cantidades iguales y las cadenas se liberan de los ribosomas hacia el citoplasma.⁹

Luego de su liberación de los ribosomas, las cadenas de globina se unen a hemos, posteriormente se aparean. Una cadena alfa y una no alfa se combinan para formar dímeros y dos dímeros se combinan de manera espontánea para formar tetrámeros, es así como se forma la molécula de hemoglobina.⁹

3.1.5. Destrucción eritrocitaria

En los trastornos hemolíticos la vida media del eritrocito puede reducirse a 15-20 días. El término anemia hemolítica designa enfermedades en las que hay aumento de la destrucción de los eritrocitos, lo que hace que la médula ósea responda acelerando la producción.^{5,6}

Los trastornos asociados con la anemia hemolítica se basa en el sitio en que tiene lugar la hemólisis, esto es si la hemólisis es intravascular (dentro de la circulación) o extravascular (dentro de los macrófagos tisulares).^{5,8} (Figura 5).

3.1.5.1. Hemólisis extravascular

Los eritrocitos se producen en la médula ósea y se liberan hacia la circulación periférica, donde tienen una vida media de 120 días. Durante este tiempo se producen cambios metabólicos y químicos a medida que el eritrocito envejece.⁵

En circunstancias normales, los macrófagos del sistema reticuloendotelial reconocen estos cambios y fagocitan los eritrocitos viejos. Los órganos de este sistema son el bazo, la médula ósea, el hígado y los ganglios linfáticos. Los macrófagos del bazo son sensibles a las anomalías de los eritrocitos, se produce la fagocitosis, el eritrocito se degrada por la fuerte actividad enzimática digestiva del macrófago. Cuando las moléculas de hemoglobina se desarman, el hierro se une a la transferrina y se transporta a los hepatocitos para su almacenamiento. Los aminoácidos se transfieren a los depósitos corporales de aminoácidos. Los componentes de la protoferrina se separan: el carbono alfa se exhala como CO₂ y el anillo tetrapirrol abierto se convierte a biliverdina, que cuando se transporta al hígado se conjuga en glucorónido de bilirrubina, la cual ingresa en el intestino con la bilis y se excreta como urobilinógeno.^{5,6}

Esta destrucción rutinaria de eritrocitos seniles se produce en el tejido linfoide y representa el 90% de su degradación.^{5,6}

3.1.5.2. Hemólisis intravascular

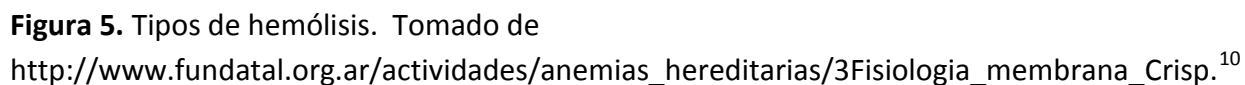
La hemólisis intravascular es la destrucción de eritrocitos muy defectuosos a medida que circulan, con la consecuente liberación de hemoglobina directamente en el plasma sanguíneo. Alrededor del 10% de la destrucción normal de eritrocitos tiene lugar de esta manera. Cuando la membrana del eritrocito se lisa, su contenido ingresa en la sangre circulante, donde proteínas de transporte específicas presentes en suero, unen, eliminan y transportan estas sustancias a sitios designados para su almacenamiento o desmontaje.^{5,8}

La combinación de suero sin haptoglobina y hemopexina con la formación de metahemoglobina y metahemalbumina indica hemólisis intravascular. Otros hallazgos son aumento de la bilirrubina indirecta, incremento de los depósitos de hierro, elevación de lactato deshidrogenasa, aumento de reticulocitos.^{5,6,8} Cuadro 1.

Cuadro 1. Pruebas de laboratorio que indican destrucción acelerada de eritrocitos

Muestra para la prueba	Prueba	Resultado	Intrínseco (I), extrínseco (E) o ambos (I/E)
Suero	Bilirrubina no conjugada	aumentada	I/E
	Actividad de lactato deshidrogenasa	aumentada	I/E
	Ausencia de haptoglobina		
	Metahemalbumina	aumentada	I
	Hemopexina	disminuida	I
Sangre anticoagulada	Hematocrito	disminuida	I/E
	Hemoglobina	disminuida	I/E
	Eritrocitos	disminuidos	I/E
Orina	Urobilinógeno	aumentado	I/E

(Tomado de Rodak FB. 2004)⁵



La molécula de hemoglobina que contiene dos cadenas alfa y dos beta se le llama hemoglobina A. La hemoglobina A₂ contiene dos cadenas alfa y dos delta.¹¹ La hemoglobina fetal, es el componente principal de la hemoglobina del recién nacido. Posee dos cadenas alfa y dos cadenas gamma.^{3, 11} (Figura 6)

11

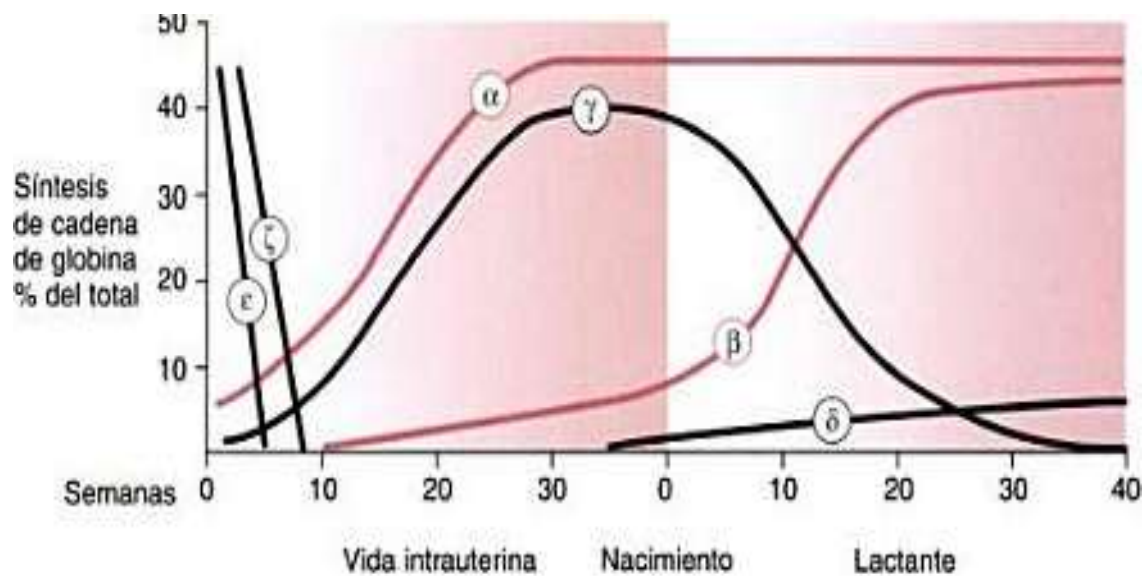


Figura 6. Síntesis de cadena de globina. Tomado de Rodak FB. (2004)⁵

La hemoglobina humana está compuesta por tres variedades de hemoglobina: hemoglobina A, hemoglobina A₂ y hemoglobina F.¹⁴ La hemoglobina A representa el 97%, dentro de la misma fracción se encuentran: Hb A1a, Hb A1b y Hb A1c.¹⁵ (Cuadro 2). Existen cientos de variantes de hemoglobinas surgidas por mutaciones ocurridas en los genes globínicos. La variante estructural más importante de la Hb A es la Hb S.¹⁶

Cuadro 2. Hemoglobinas humanas.

Nominación	Composición	Proporción	
		adultos (%)	neonatos (%)
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	97	20
Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$	2.5	0.5
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	<1	80

(Tomado de Peñuela OA.2005)³

3.2 Hemoglobinopatía

La hemoglobinopatía es la enfermedad producida por la alteración de la molécula de hemoglobina. La sustitución de un sólo aminoácido de cualquiera de las cadenas peptídicas de la globina origina alteraciones fisicoquímicas con implicaciones clínicas y patológicas.¹⁷⁻¹⁸

La Organización Mundial de la Salud calcula que anualmente nacen en todo el mundo más de 300, 000 niños con hemoglobinopatías, la mayoría en países de ingresos bajos y medios. Aproximadamente un 5% de la población mundial es portadora de un gen de drepanocitosis, alcanzando hasta un 25% en algunas regiones. Debido al aumento de los fenómenos migratorios, estas enfermedades están apareciendo con mayor frecuencia en muchas zonas.¹⁹

Las hemoglobinopatías son las alteraciones más frecuentes en el mundo.¹⁹ Se dividen en: hemoglobinopatías estructurales, producidas por la síntesis de una cadena de globina estructuralmente anormal y talasemias que se manifiestan por la disminución total o parcial de la síntesis de globina.²⁰

La expresión clínica de la hemoglobinopatía varía según el tipo de cadena de globina implicada ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$), la gravedad de la hemólisis y la producción compensadora de otras cadenas de globina normales.²¹

Se han descrito más de 600 variantes de hemoglobinopatías.²² (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de las anomalías moleculares de las hemoglobinas variantes.

	Número de variantes				Total
	Cadena α	Cadena β	Cadena δ	Cadena γ	
Sustitución de un solo aminoácido.	199	337	28	70	634
Dos sustituciones de aminoácidos.	1	18	0	0	19
Eliminaciones, inserciones, o ambas.	6	16	0	0	22
Cadenas extendidas.	7	6	0	0	13
Fusiones	0	10	9	1	10
Totales	213	387	37	71	698

(Tomado de Rodak FB. 2004.)⁵

3.2.1 Hemoglobinopatía S

Actualmente en América, existen zonas con un fuerte componente poblacional indígena como ocurre en México, América Central y América del Sur. Desde la colonización han llegado a este continente: africanos, asiáticos y europeos para formar parte de lo que hoy en día es la sociedad Latinoamericana. Además de la contribución cultural, étnica y social que aportaron estos inmigrantes; también trajeron consigo rasgos genéticos y fisiológicos propios, que ahora están siendo reconocidos como causantes de algunas enfermedades en comunidades latinoamericanas. Un ejemplo es la hemoglobinopatía S (Hb S).²³ (Cuadro 4).

La Hb S surge por mutación en el continente africano y ha sido diseminada por migración a otras poblaciones a nivel mundial.^{24,25}

Cuadro 4. Antecedentes históricos de la Hemoglobinopatía S.

1910	James Herrick describió la existencia de eritrocitos en hoz, falciformes o drepanocitos en la sangre de un estudiante negro con anemia.
1917	Emmel demostró que la morfología de estos hematíes dependía de la tensión parcial de oxígeno, que al descender inducía la forma semilunar característica.
1927	Se demuestra la importancia de la desoxigenación con la falciformación.
1949	Pauling y colaboradores demostraron que la movilidad electroforética de la hemoglobina de los pacientes con drepanocitosis difería de la normal, y como consecuencia que su estructura básica era distinta.
1950	Perutz describe la transformación irreversible de la hemoglobina S en baja tensión de oxígeno.
1956	Ingram descubrió la naturaleza bioquímica del defecto, demostrando que el sexto aminoácido de la cadena β , ácido glutámico, se encontraba sustituido por valina.

(Tomado de Rodak FB. 2004)⁵

3.2.2 Genética de la hemoglobinopatía S

La Hb S es un desorden hereditario recesivo, sin embargo, la Hb anormal es transmitida como dominante. La herencia de la Hb S sigue las reglas de la genética mendeliana clásica.²⁶ Esta hemoglobinopatía se debe a un cambio en el codón GAC normal, que pasa a GTG que da como resultado la sustitución del aminoácido ácido glutámico por valina.²⁷⁻²⁸ (Figura 7)

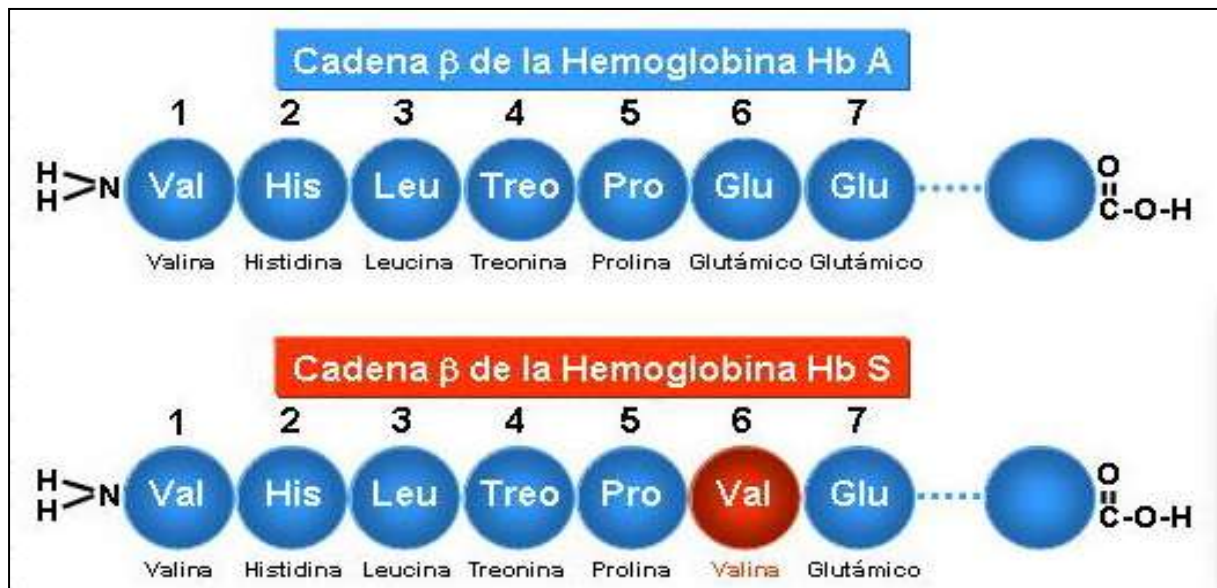


Figura 7. Sustitución de una base en el sexto codón de la cadena β. tomado de http://www.fundatal.org.ar/actividades/anemias_hereditarias/genética.Fisiologia_membrana.²⁹

Cada individuo tiene dos genes para las cadenas beta de cada uno de los padres; si un individuo hereda un gen de una cadena beta anormal es un heterocigoto AS; si hereda los dos genes es un homocigoto SS.³⁰

El término rasgo de células falciformes se refiere al estado heterocigoto (AS), los individuos son asintomáticos, presentan entre 35 a 45% de Hb S, sin embargo, en condiciones de hipoxia puede haber formación de células falciformes ocasionando oclusión vascular, necrosis focal e incluso la muerte.³¹ (Figura 8)

Los pacientes homocigotos a Hb S, carecen de cadenas polipeptídicas beta normales por lo que no tienen Hb A, no se puede cuantificar la Hb A1c, debido a que contienen un alto porcentaje de Hb S.³¹

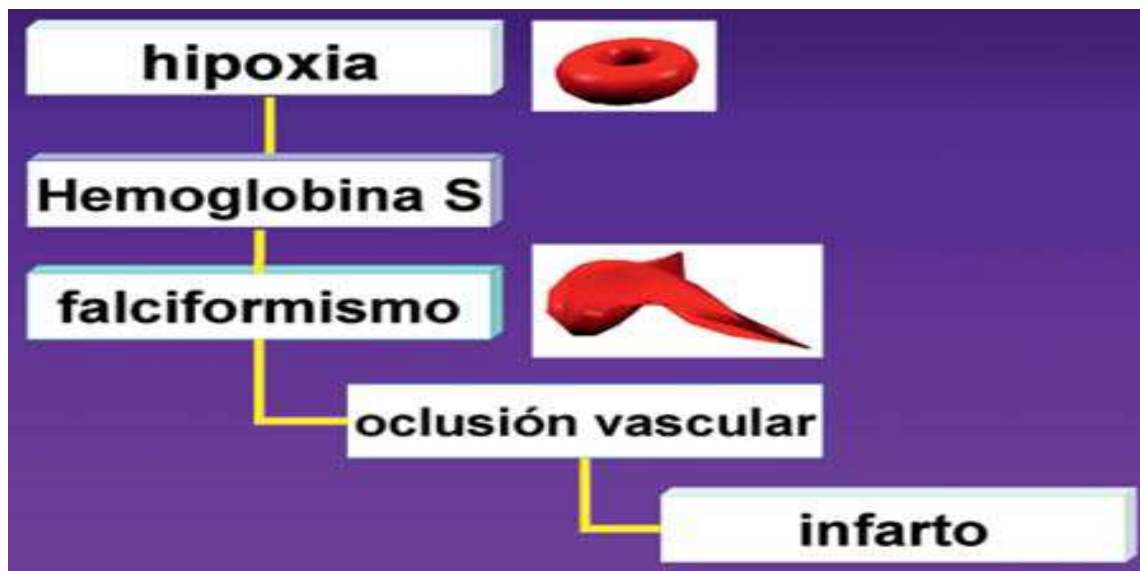


Figura 8. La hipoxemia deforma los eritrocitos en "media luna" y desencadena una serie de trastornos sanguíneos que originan oclusión vascular. Tomado de Frisancho EO (2012)⁴⁰

3.2.3. Fisiopatología

La sustitución de un aminoácido genera cambios profundos en la solubilidad molecular de la hemoglobina. La cadena lateral de la valina es apolar, por lo que aparece un "parche" hidrófobo en la superficie de la molécula, mientras que el glutamato es polar. Esta alteración reduce marcadamente la solubilidad.³² Cuando hay baja concentración de oxígeno se produce un aumento marcado en la viscosidad de la sangre, lo que indica polimerización de la hemoglobina; el cambio depende de la formación de fibras polarizadas o tactoides largas y rígidas que se organizan en paralelo esto se refleja en el aspecto de los eritrocitos que adoptan el tipo falciforme (en hoz). Estas células pueden cambiar de forma, según el grado de oxigenación (reversibles), hasta que llegan a ser irreversibles, muy densas, como las que se ven en los casos de los pacientes homocigotos. Tales eritrocitos tienen contenido bajo de potasio, concentraciones altas de sodio, calcio, agotamiento de ATP y del agua.³³ (Figura 9).

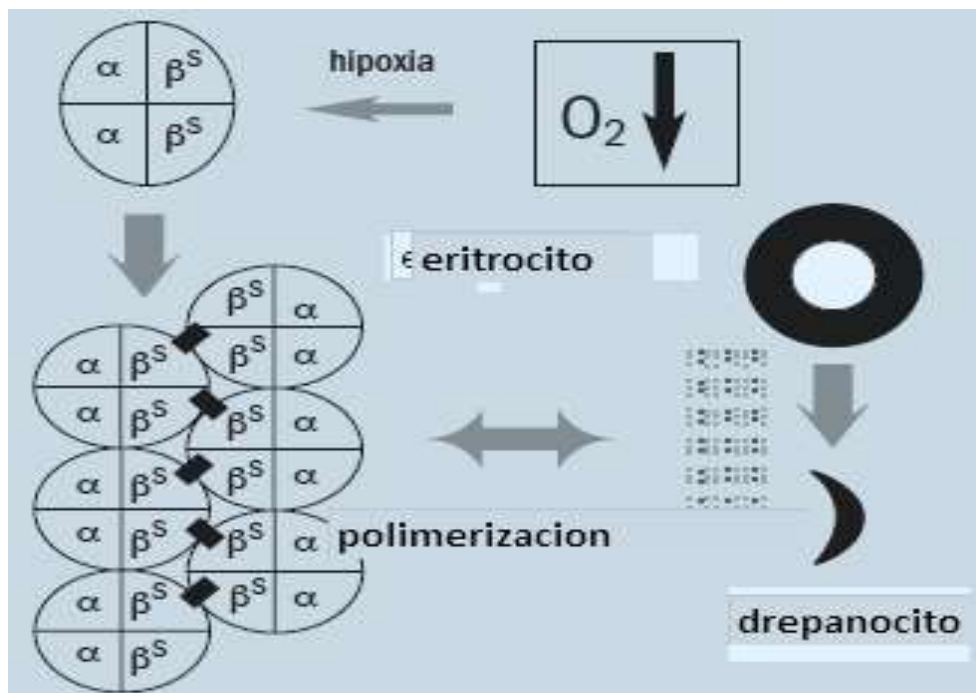


Figura 9. Representación esquemática del proceso de inducción a la falciformación de los eritrocitos por la polimerización de la desoxihemoglobina debido a la baja concentración de oxígeno. Tomado de Galiza N. (2003).¹⁴

3.3 Anemia de células falciformes (drepanocitosis)

La drepanocitosis o anemia de células falciformes, es una enfermedad que dura toda la vida.³⁴ La gravedad clínica es variable, desde formas asintomáticas (rasgo falciforme) hasta formas homocigotas las cuales son severas. Los pacientes homocigotos presentan hemólisis de predominio extravascular, la cual causa anemia y puede concurrir con eritropoyesis disminuida.³⁵

Las células falciformes sólo viven unos 15 días, mientras que las normales viven hasta 120 días. Además, corren el riesgo de ser destruidas por el bazo debido a su forma y rigidez.³⁶

Los eritrocitos falciformados colapsan la microcirculación sanguínea provocando las denominadas crisis vaso-oclusivas, ocasionando infartos. La alteración de la deformabilidad del eritrocito ocasiona la destrucción del mismo.³⁷

Los infartos subclínicos suelen ser más frecuentes principalmente en la médula renal debido al medio hipertónico. Otros órganos en los que con frecuencia aparecen infartos son: cerebro, pulmón, riñón y bazo.³⁸

El bazo es uno de los órganos que se ve más afectado en los pacientes que padecen anemia falciforme. Aumenta de tamaño durante las primeras décadas de la vida para luego sufrir una atrofia progresiva debido a los ataques repetidos de oclusión vascular e infartos.³⁹

3.3.1. Manifestaciones clínicas

Aunque la enfermedad puede afectar a órganos y sistema, en los niños se caracteriza por crisis repetitivas e infecciones, mientras los adultos empiezan a sufrir los efectos crónicos de los sucesos precedentes con daño estructural u orgánico. Un efecto notable en los niños es el retardo marcado en el crecimiento corporal. La expectativa de vida se afecta debido las crisis vasooclusivas.⁴⁰ (Figura 10).

- **Crisis vasooclusivas.** Son las más comunes, muy dolorosas, afectan sobre todo los huesos y los músculos, se pueden iniciar muy temprano en la vida (síndrome mano-pie) por compromiso de los huesos de estas extremidades. En el caso de huesos, a veces es muy difícil distinguir de la osteomielitis.⁴⁰
- **Crisis de secuestación.** En los niños pequeños homocigotos puede haber acumulación masiva de sangre en el bazo, con estados de hipovolemia aguda. Estos fenómenos pueden ser repetitivos.¹³
- **Crisis aplásica.** Consiste en una parálisis temporal de la producción eritroide, casi siempre asociada con infecciones, con disminución de la hemoglobina.^{5,6}
- **Infecciones.** Son la causa principal de muerte; el problema es más grave entre más pequeño es el niño, en especial por debajo de 5 años. El suero es deficiente en la actividad opsonica relacionada con la vía de la properdina, que es específica para la fagocitosis de pneumococos.³²

- ***Daños orgánicos.*** Todos los órganos y sistemas se afectarán con el tiempo. En el corazón se presentan soplos de diversa magnitud, dilatación cardíaca y cardiomegalia.³⁵
- En el sistema urinario hay hipostenuria con disminución de la capacidad de concentración de la orina desde muy temprano en la vida, con pérdida de agua; la hematuria es común puede haber síndrome nefrótico y al final insuficiencia renal.³⁶
- En el sistema hepatobiliar hay cálculos de bilirrubina que progresan con la edad y se pueden descubrir en forma precoz con ultrasonido. Puede haber episodios oclusivos intrahepáticos y daño hepático.³⁵
- En los ojos se presenta oclusión de los vasos de la conjuntiva y la retina, también puede haber desprendimiento retiniano o hemorragia del vítreo.³²
- Las úlceras de las piernas no se presentan en los niños, pero empiezan a ser un problema a partir de la adolescencia.⁴⁰
- En los oídos hay una frecuencia notable de pérdida auditiva.^{40,5,8}
- Los cambios esqueléticos son muy comunes por expansión de la médula ósea, lo que puede causar deformidades en la cara y el cráneo; además, los episodios repetidos de infarto óseo pueden generar deformidades vertebrales; la necrosis aséptica es común.³²

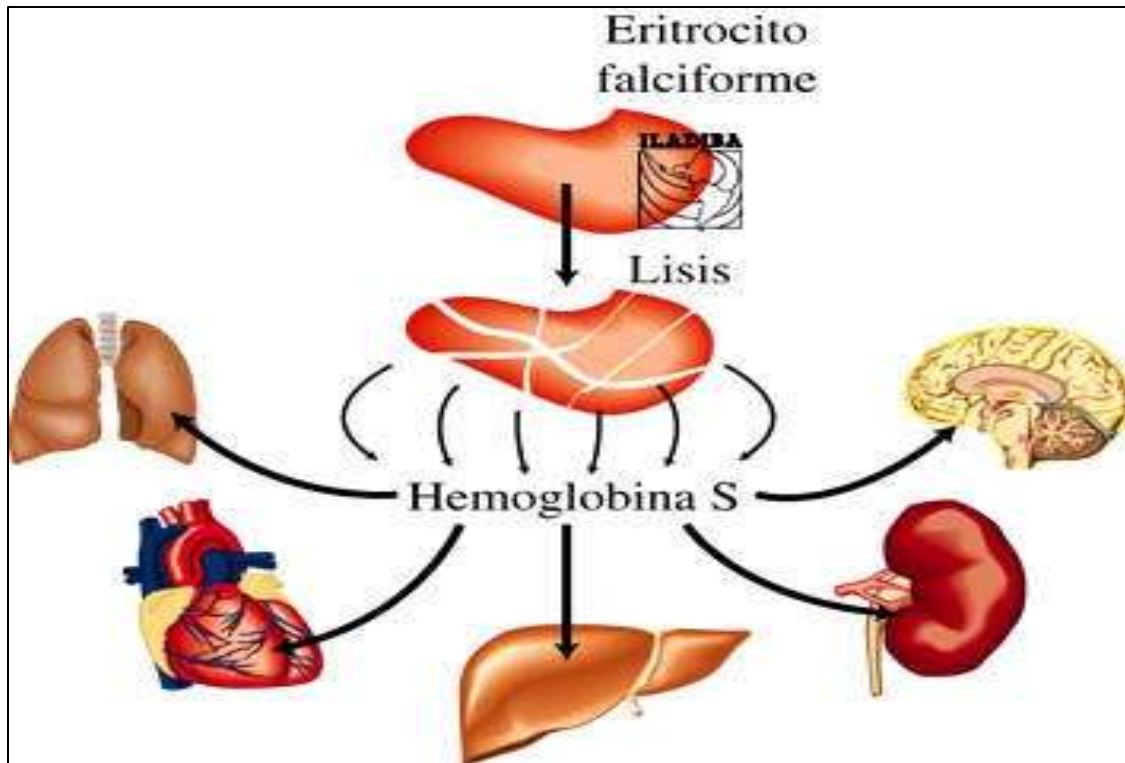


Figura 10. Órganos afectados por la anemia falciforme. Tomado de http://www.fundrepa.organos_afectados.hbS.⁴¹

3.4 Hemoglobinopatía S en la población mexicana

En México se ha encontrado una frecuencia variable en individuos mestizos, desde menos de 1% en el centro del país hasta más de 14% en las costas.⁴³

En un estudio se encontró que de 22 poblaciones indígenas estudiadas, sólo en dos (coras y chontales) se identificaron portadores de Hb S en 1 y 2%, respectivamente. Lo mismo sucede en los indígenas totonacos, pobladores de la región norte de Veracruz y Puebla, en quienes también se ha informado la misma proporción de heterocigotos AS, lo que sugiere que son el resultado de mestizaje con africanos. En relación con los mestizos de la costa de Veracruz, la frecuencia de hemoglobina S, de 14%, es un poco mayor de lo comunicado en ambas costas de México, lo que se explica por el mestizaje indígena-caucásicoafricano con africanos que llegaron a México en la época de la Colonia.⁴⁴

Actualmente se ha empleado HPLC para la detección de hemoglobina S, sin embargo la electroforesis confirma esta hemoglobinopatía, así como también la prueba de inducción de drepanocitos y la observación del frotis sanguíneo.⁴⁵ A continuación se presentan las pruebas para la identificación de Hb S.

3.5.1 Electroforesis

La electroforesis es el movimiento de moléculas cargadas en un campo eléctrico. Consiste de un ánodo (+) y un cátodo (-) separado por acetato de celulosa en el cual migran las moléculas de hemoglobina. Se considera como el mejor método para separar e identificar hemoglobinopatías, permite distinguir hemoglobinas normales y anormales. Cabe mencionar que a escala analítica, el método electroforético es de alta sensibilidad. Cuando una corriente eléctrica pasa a través del medio permite que las diferentes fracciones de la hemoglobina con cargas eléctricas distintas migren a lo largo de la tira a velocidades diferentes. Después, la tira se retira y se tiñe. La cantidad de hemoglobina en cada banda se cuantifica.⁴⁶

El protocolo para la electroforesis de hemoglobina implica dos etapas. Inicialmente la electroforesis se lleva a cabo en amortiguadores alcalinos, el acetato de celulosa solía ser medio de soporte principal, sin embargo, agarosa también produce una separación rápida de la Hb A, F, S y C con tiempo de preparación mínimo. Sin embargo, debido a la similitud electroforética de muchas hemoglobinas estructuralmente diferentes, la evaluación debe ser complementada por electroforesis con agar citrato la cual mide una propiedad distinta de la carga eléctrica.⁴⁷

El procedimiento de electroforesis alcalina requiere cantidades mínimas de hemolizado y proporciona una mejor separación para la presencia de hemoglobinas anormales, tales como la Hb S y Hb C. Es importante señalar que las hemoglobinas C, D y S migran con el mismo patrón en acetato de celulosa y es necesario repetirla a un pH alcalino.⁴⁸ (Figuras 11 y 12).

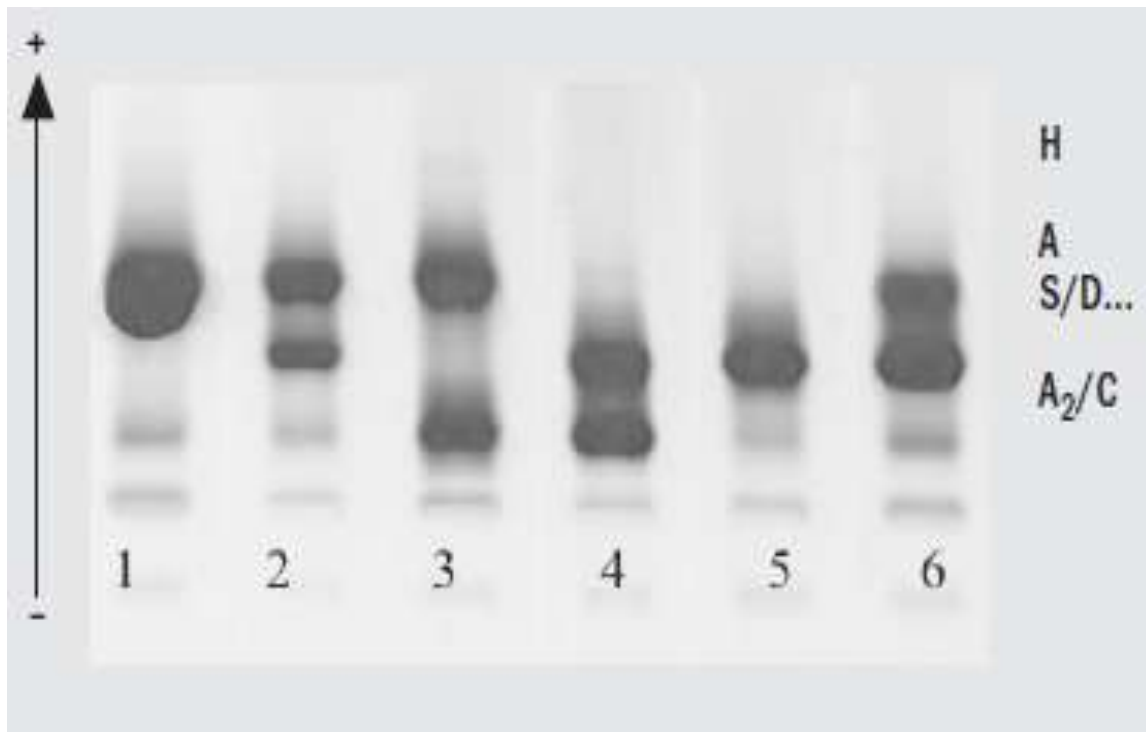


Figura 11. Electroforesis a pH alcalino. 1.Hb AA; 2. Hb AS; 3. Hb AC; 4.Hb SC; 5. Hb SS; 6. Hb S/beta mas talasemia. Tomado de Antoniazio Z. (2002).²⁷

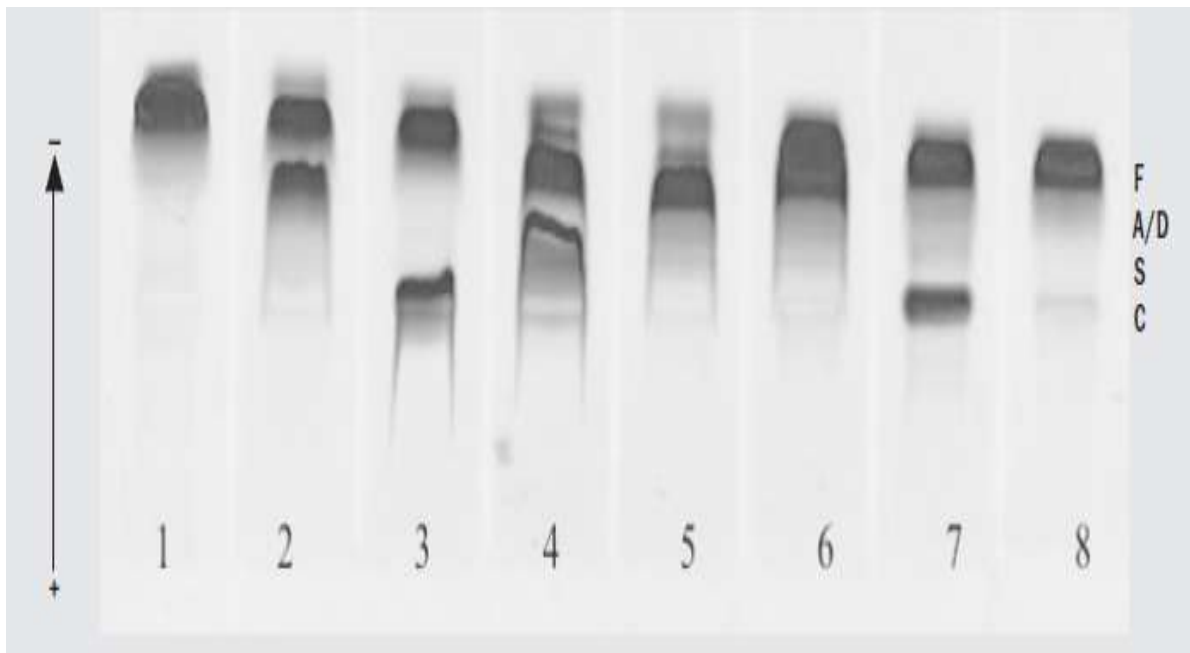


Figura 12. Electroforesis a pH ácido. 1. Hb AA; 2. Hb AS; 3. Hb AC; 4. Hb SC; 5. Hb SS; 6. Hb AD; 7. HbS/beta mas talasemia; 8. Hb A Lepore. Tomado de Antoniazzi Z (2002).²⁷

En la electroforesis, los pacientes heterocigotos tiene alrededor de un 40% de Hb S y un 60% o más de Hb A. En pacientes homocigotos con Hb S, la Hb A no está presente.⁴⁹

3.5.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es ampliamente difundida en los estudios biológicos, se basa en los tiempos de retención de las moléculas de interés, en este caso la hemoglobina, sobre una columna de intercambio iónico que es eluida con disolventes de concentración salina.⁵⁰

Las variantes hemoglobínicas son detectadas en este sistema por variaciones en los tiempos de retención en la columna de intercambio iónico. El reporte generado por el equipo, refleja el porcentaje de hemoglobina glucosilada respecto del total de hemoglobina y los porcentajes en las variantes hemoglobínicas presentes en las muestras respecto del total.⁵¹

Las muestras se diluyen con el hemolizado específico/buffer y se inyecta en la columna analítica. Las bombas ofrecen un gradiente de tampón programado de fuerza iónica creciente en la columna, donde las fracciones de hemoglobina se separan en base a su interacción iónica.⁵²

La separación de las diferentes fracciones de hemoglobina pasa a través de una celda de flujo, donde la absorbancia es de 415 nm. El software proporciona la imagen de un cromatograma en donde se observan las diferentes fracciones de hemoglobinas, con los respectivos tiempos de retención, las áreas de los picos y los porcentajes de diversas fracciones de la hemoglobina.⁵³ (Figura 13).

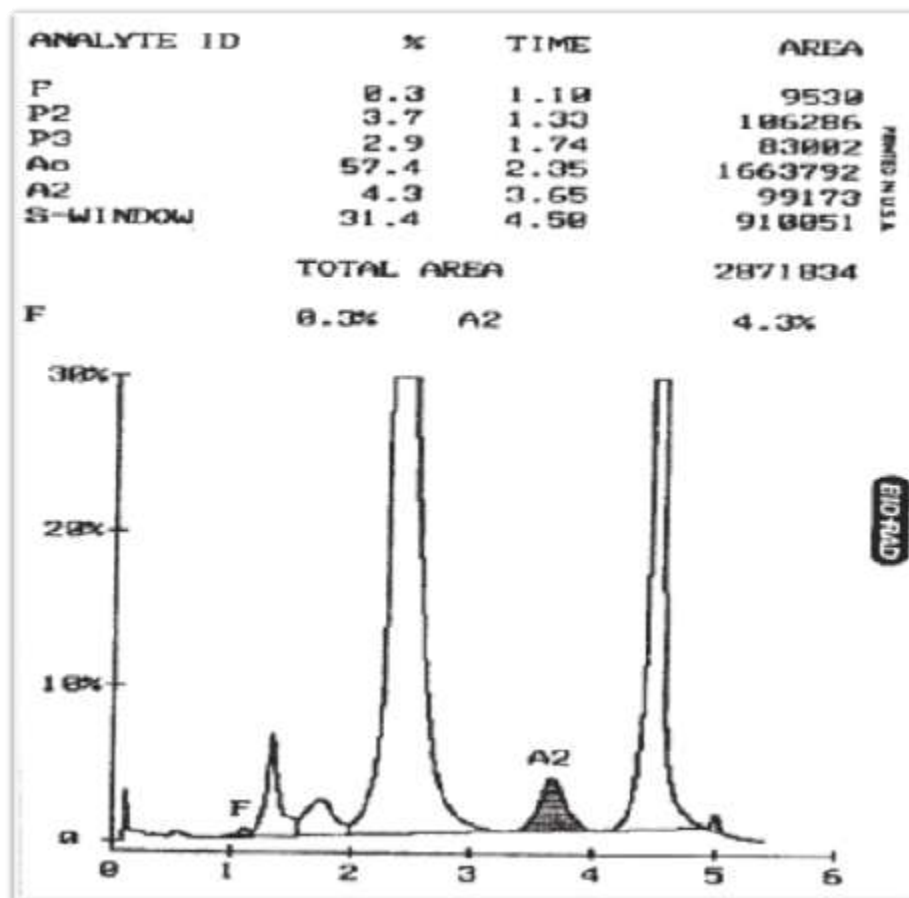


Figura 13. Cromatograma donde se ilustra la presencia de un heterocigoto a Hb S. Tomado de Bravo U. (2004).⁴⁹

3.5.3 Inducción de drepanocitos

La inducción de drepanocitos se realiza con metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 2% es un agente reductor fuerte y desoxigena el oxígeno presente en la hemoglobina. Cuando se exponen eritrocitos que contienen Hb S a esta sustancia, adquieren la forma de media luna y la inducción es positiva.^{5,8} (Figura 14).

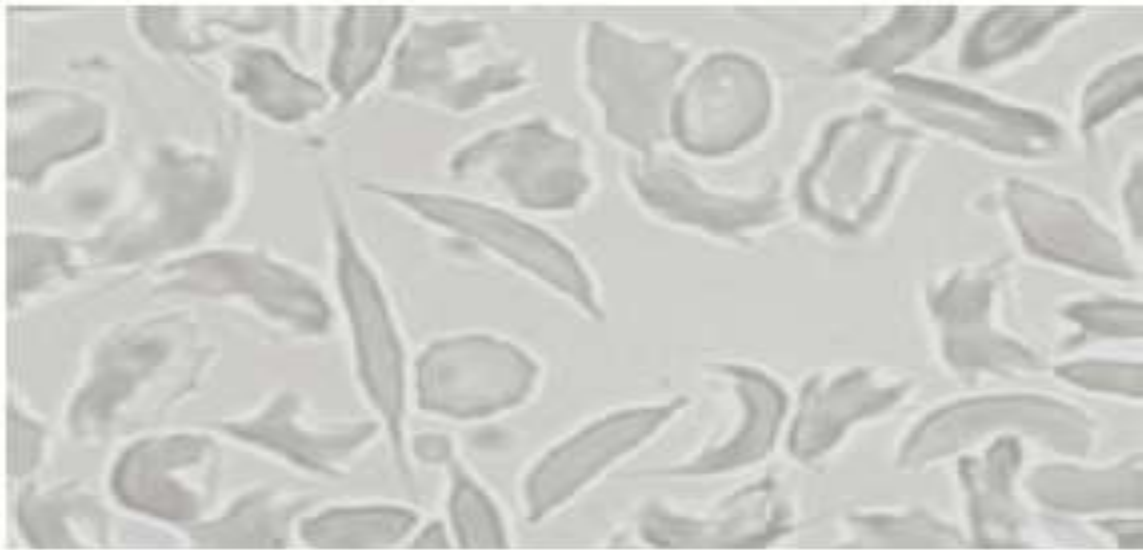


Figura 14. Drepanocitos inducidos *in vitro* por desoxigenación. Tomado de Duarte (2008)⁵⁴

3.5.4 Biometría hemática

En el frotis de sangre de pacientes homocigotos (SS) se observan poiquilocitosis, anisocitosis, células falciformes, punteado basófilo, cuerpos de Pappenheimer y cuerpos de Howell Jolly. También se incrementa la hemólisis y desciende el valor de la hemoglobina y el hematócrito aproximadamente a la mitad del valor normal.^{13,33}

Los pacientes heterocigotos (AS) muestran cifras y morfología sanguínea normales, presentan anemia normocítica- normocrómica.^{13,33}

4. Planteamiento del problema

Mediante HPLC se cuantifica la fracción A1C, sin embargo, se pueden detectar variantes hemoglobínicas entre ellas se observa la fracción que corresponde a la hemoglobina S, que cuando está presente se considera una hemoglobinopatía. Los pacientes heterocigotos pueden desarrollar crisis dolorosas crónicas debido a infartos consecutivos a la oclusión vascular en numerosos órganos, lo cual ocurre porque la Hb S tiende a polimerizarse cuando hay baja tensión de oxígeno, lo que provoca rigidez de los eritrocitos y tiende a aumentar la viscosidad sanguínea, con oclusiones vasculares recurrentes y hemólisis crónica. En los pacientes homocigotos el cuadro clínico es grave, debido a la hemólisis extravascular que presentan y las personas fallecen en los primeros años de vida si no se tratan de manera oportuna.

Así mismo, se realizan otras pruebas de laboratorio utilizadas para determinar la presencia de Hb S que incluyen un estudio electroforético, inducción de drepanocitos, presencia de células falciformes en frotis sanguíneo, biometría hemática, sin embargo existen pocos estudios que correlacionan la presencia de Hb S detectada mediante HPLC y electroforesis, de ahí se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Existirá una correlación entre la detección de Hb S por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y electroforesis en muestras positivas a inducción de drepanocitos?

5. Hipótesis

De acuerdo a la literatura que reporta una correlación entre la detección de Hb S por HPLC y electroforesis en un 97%, suponemos que existirá una asociación entre ambos métodos en muestras positivas a la inducción de drepanocitos.

6. Objetivos

Determinar por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) la concentración de Hb S en muestras sanguíneas.

Realizar biometría hemática, inducción de drepanocitosis a las muestras que son detectadas con más del 30% de Hb S por el método de HPLC.

Correlacionar el método de HPLC y el de electroforesis en muestras positivas a la inducción de drepanocitos para la presencia de Hb S.

7. Material y método

7.1 Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio descriptivo, observacional y transversal. Se evaluaron 150 muestras de sangre de pacientes que llegaron al laboratorio de referencia internacional Carpermor para la determinación de la fracción A1C, las cuales presentaban la región de Hb S señalada en el cromatograma.

A las 150 muestras detectadas con Hb S por el método de HPLC, se les realizó la inducción de drepanocitos y biometría hemática. Se seleccionaron 60 muestras para ser procesadas mediante electroforesis, posteriormente se realizó la correlación en ambos métodos.

7.1.1 Criterio de inclusión.

Muestras de sangre de pacientes que llegan para la determinación de Hb A1C, detectados con más de 30% de Hb S.

7.1.2 Criterio de exclusión.

Muestras de sangre de pacientes que no son detectadas con Hb S.

7.2 Variable

Dependiente

- ✱ % Hemoglobina S

Independiente

- ✱ HPLC
- ✱ Electroforesis

7.3 Diseño estadístico

Los datos fueron analizados utilizando medidas descriptivas de los datos cuantitativos, para la correlación se empleó prueba de Pearson con una $p < 0.05$ (95% de confianza) mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0.

8. Procedimiento

➤ Determinación de A1c mediante HPLC

Para la cuantificación de la fracción A1c se empleó el equipo Variant II Turbo certificado ante la NGSP (Nacional Glycohemoglobin Standardization Program), el cual tiene una metodología de HPLC. Se utilizaron dos niveles de controles Lyphocheck control 1, Lyphocheck control 2 de la marca Bio-Rad. Se separaron las muestras que en el cromatograma se detectaba la presencia de Hb S señalada como S-window.

➤ Realización de biometría hemática

La biometría hemática se realizó en un equipo automatizado Celldyn 3700 y ADVIA 120. Antes de procesar las muestras se pasaron los controles de los tres niveles (alto, normal y bajo). Si los resultados de los controles fueron satisfactorios se procesaron las muestras de lo contrario se repite el análisis de control de calidad.

➤ Lectura de frotis sanguíneo

En un portaobjetos se colocó una pequeña gota de sangre, se realizó el extendido con otro portaobjetos, posteriormente se tiñó la preparación con el colorante de Wrigth, se observó al microscopio la morfología de los eritrocitos.

➤ Inducción de drepanocitos

Se preparó metabisulfito de sodio al 2%, posteriormente se colocó una pequeña gota de sangre en un portaobjetos. Se mezcló bien y se colocó un cubreobjetos, tratando de que no se formen burbujas. El exceso de sangre se eliminó con papel, ejerciendo una suave presión sobre el cubreobjetos. Se sellaron los bordes con cera, posteriormente la preparación se observó después de dejar reaccionar la gota de sangre con el metabisulfito de sodio entre 20 a 30 minutos en el microscopio utilizando aumento de 100 X.

➤ Electroforesis

Se centrifugó la sangre anticoagulada (EDTA) durante 10 minutos. Se separó el plasma del paquete eritrocitario, después se lavaron las células 3 veces con solución salina. Posteriormente se prepararon los hemolizados mezclando 10 µl de muestra con 100 µl de reactivo hemolizado. Se agitó durante 15 segundos. Se colocaron las muestras en los pozos del gel, es fundamental realizar este paso sin que haya contaminaciones cruzadas entre los distintos pozos. Posteriormente se llenó la cámara con el amortiguador de corrida. Se colocó el gel en la cámara y se realizó el corrimiento de las muestras a 200 V (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel (aproximadamente 60 min).

Se realizó una electroforesis en tampón alcalino sobre la placa de acetato de celulosa, para permitir una mayor separación de la Hb A, F, S y C. Después, una electroforesis en tampón ácido con soporte de agar citrato.

9. Resultados

Este estudio se realizó en el laboratorio Carpermor en donde llega una gran cantidad de muestras sanguíneas para la cuantificación de la hemoglobina glucosilada (A1c). Cabe mencionar que al cuantificar la fracción A1c, en algunas muestras se observó la presencia de Hb S señalada en el cromatograma, de las cuales se tomaron 150 muestras.

En las 150 muestras analizadas mediante HPLC se encontró la presencia de Hb S señalada en el cromatograma como S-window, a las cuales se realizó inducción de drepanocitos, biometría hemática y 60 muestras se procesaron mediante electroforesis. En la figura 15 se observan las diferentes fracciones de la hemoglobina como la Hb A, Hb A1a, Hb A1b, Hb A1c y Hb F. Así como también el porcentaje cuantificado de cada una y tiempo de retención presentes en cada fracción. Es importante señalar que este cromatograma corresponde a un paciente heterocigoto a Hb S.

Fracción	% Área	Tiempo de retención (min)
A1a	0.5	0.156
A1b	1.1	0.187
F	0.5	0.263
A1c	5.6	0.496
A	60.3	0.821
S-Window	33.4	0.916

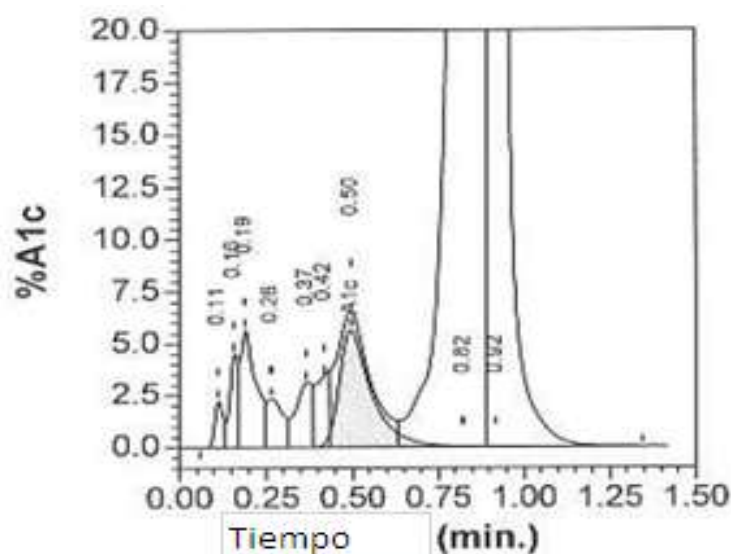


Figura 15. Fracciones de hemoglobinas observadas en el cromatograma obtenido por HPLC.

De las 150 inducciones realizadas se obtuvo 13.4% de inducciones negativas y 86.6% inducciones positivas. Asimismo, 64 correspondieron al sexo femenino y 66 al sexo masculino. En las inducciones negativas, 10 fueron del sexo femenino y 10 del masculino. En la figura 16 se observa inducción positiva.

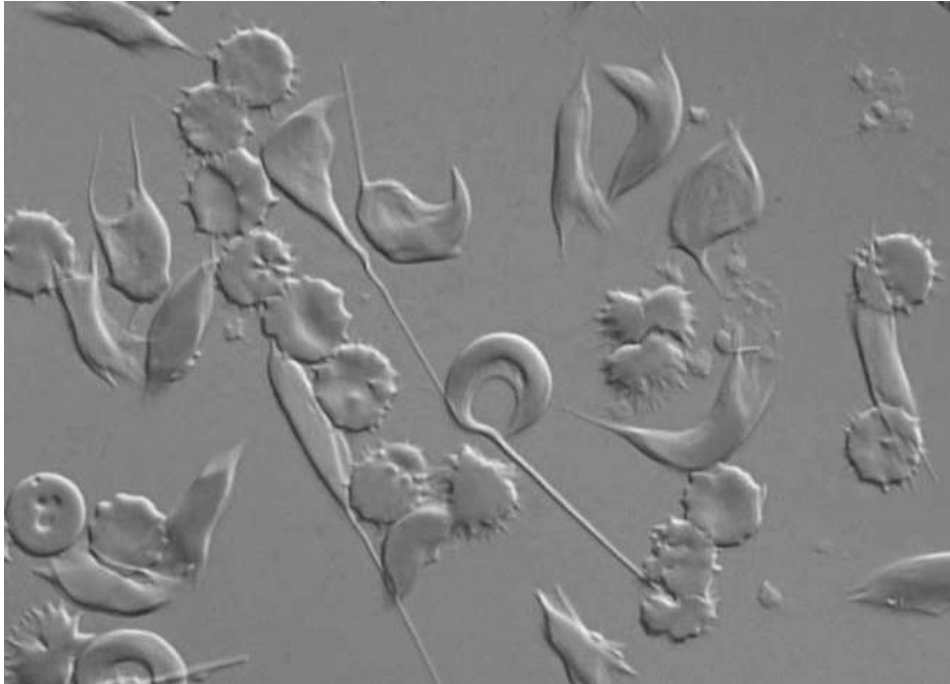


Figura 16. Inducción de drepanocitos positiva

En el cuadro 5 se presentan los valores promedios y desviación estándar de la concentración de Hb S detectados en HPLC y electroforesis.

Cuadro 5. Medias de Hb S en ambos métodos.

	HPLC Media $\pm$ DE	Electroforesis Media $\pm$ DE
Hemoglobina S	37.7 $\pm$ 1.8	41.7 $\pm$ 1.7

En la figura 17 se observa los porcentajes cuantificados de Hb S empleando HPLC, es importante señalar que solo una muestra presentó un porcentaje alto de 73.2 % de Hb S, en este sentido, se trata de una paciente homocigota a esta hemoglobinopatía. Asimismo de las 150 muestras analizadas, 149 son pacientes heterocigotos presentaron media de 37.7 ± 1.8 de Hb S.

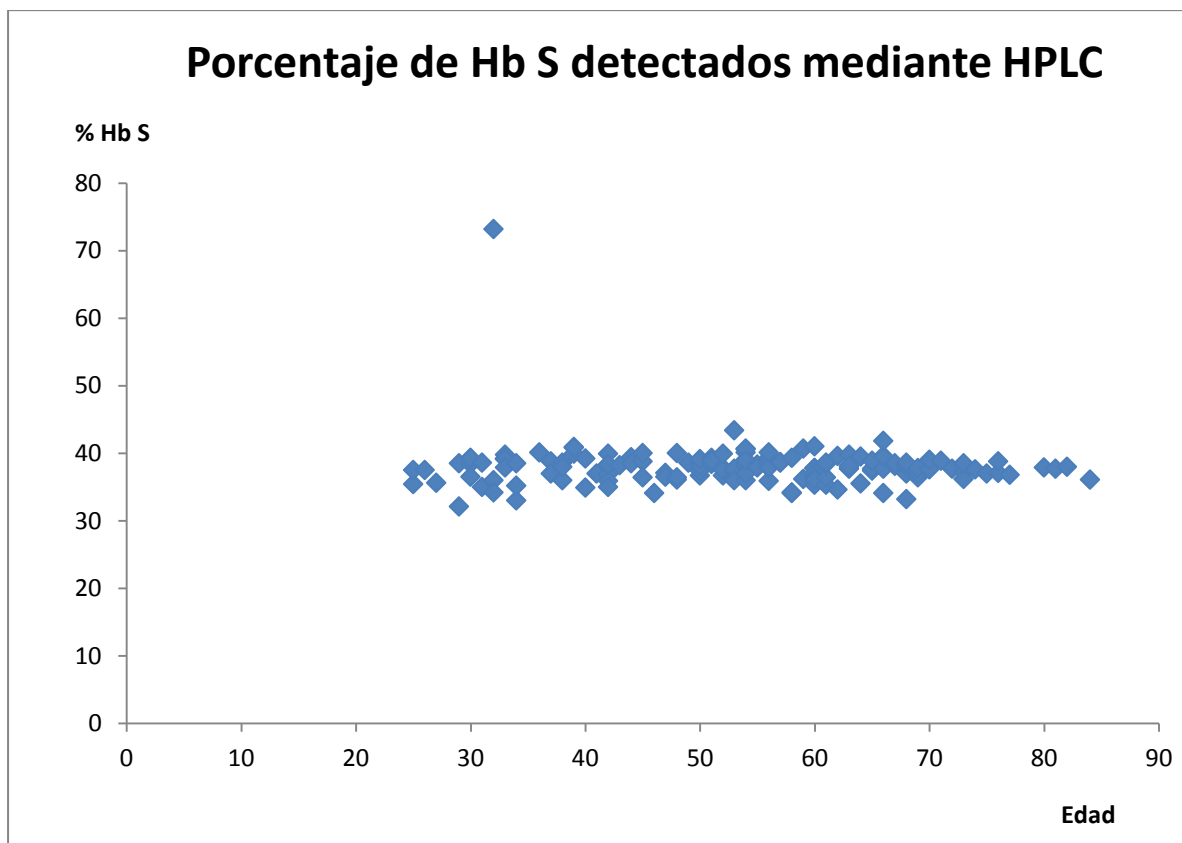


Figura 17. Porcentajes de Hb S en las 150 muestras detectados mediante HPLC

En la figura 18 se presenta una gráfica de las 60 muestras procesadas mediante HPLC y electroforesis, como se puede observar existen variaciones de los porcentajes de Hb S en ambos métodos, es decir el porcentaje de Hb S es mayor utilizando electroforesis.

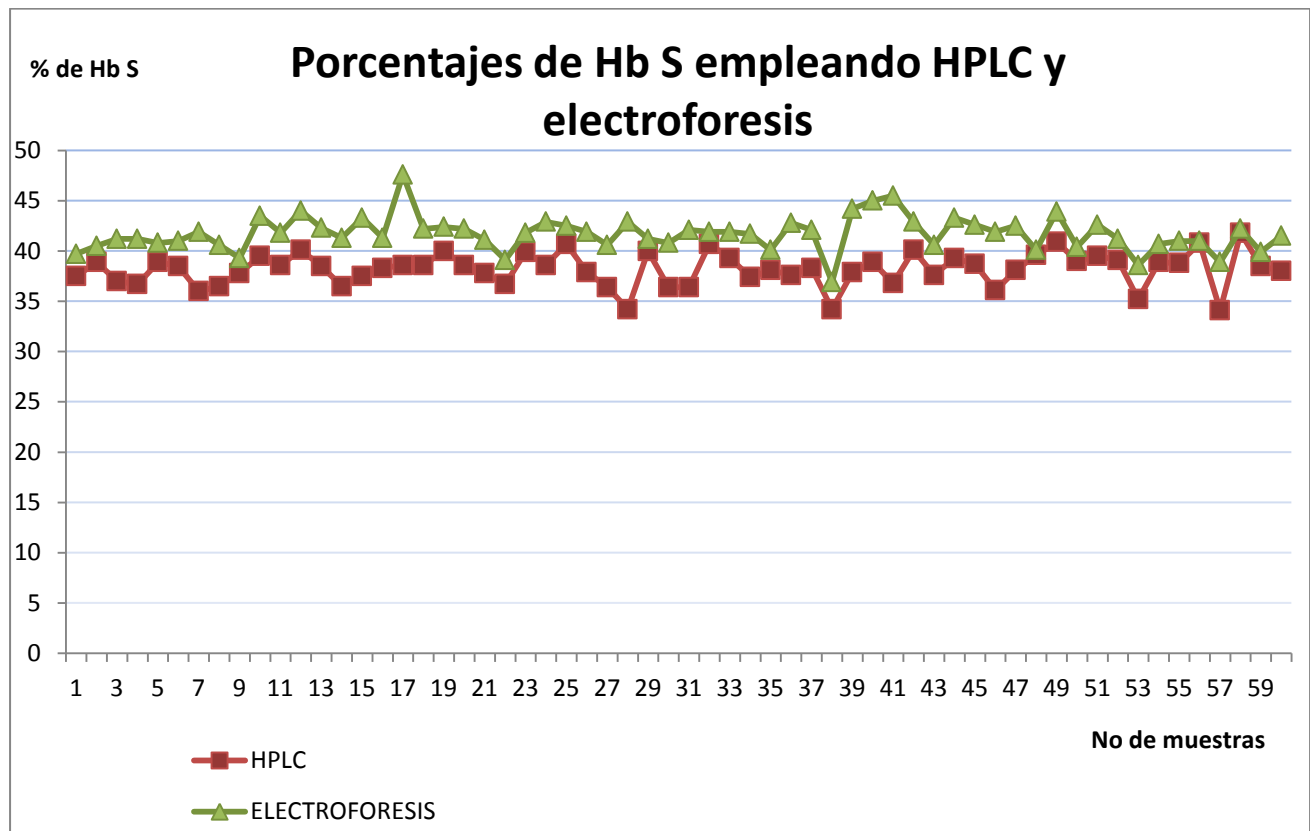


Figura 18. Gráfica de los porcentajes de Hb S en las 60 muestras procesadas en ambos métodos.

En el cuadro 6 se muestran la media y desviación estándar (DE) de los parámetros hematológicos de pacientes heterocigotos, clasificados en mujeres y hombres. Cabe señalar que no existe variación con respecto a los valores de referencia en cada parámetro.

Cuadro 6. Parámetros hematológicos de pacientes heterocigotos.

Parámetros	HETEROCIGOTOS		RANGO
	MUJERES Media±DE	HOMBRES Media±DE	
Eritrocitos millones/ μ L	4.95±0.6	4.97±0.6	4.50-5.20
HGB g/dL	14.6±1.8	14.6±1.8	12.0-16.0
HCT %	44.3±4.8	44.6±4.8	37-47
MCV fL	90±6	90±6	78.0-99.0
HCM pg	31.6±2	31.7±2	27.0-31.0
CHCM g/dL	33±1.4	33±1.4	32.0-36.0

En el cuadro 7 se presentan los valores de los parámetros hematológicos de la paciente homocigota.

Cuadro 7. Resultado de la biometría de la paciente homocigota

Parámetros	HOMOCIGOTO	
	MUJER	
	RESULTADO	RANGO
Eritrocitos millones/ μ L	2.55	4.50-5.20
HGB g/dL	10.1	12.0-16.0
HCT %	30.5	37-47
MCV fL	120	78.0-99.0
HCM pg	39.5	27.0-31.0
CHCM g/dL	33	32.0-36.0

Después de realizar la biometría hemática a todas las muestras detectadas en HPLC con Hb S, se les realizó la observación de frotis.

En la observación de frotis sanguíneo de pacientes heterocigotos, algunos presentaron hipocromía y microcitosis.

Al paciente femenino fue remitida por el médico, para la determinación de biometría hemática y Hb A1c. Como se mencionó anteriormente el porcentaje de Hb S detectado fue de 73.2%, no se pudo cuantificar la fracción A1c, debido a la alta concentración de Hb S detectada. En el frotis de sangre se observaron poiquilocitosis, abundante basofilia difusa, abundantes células falciformes, 18% de eritroblastos y presentó 10% de reticulocitos. (Figura 19).

La inducción de drepanocitos fue positiva.

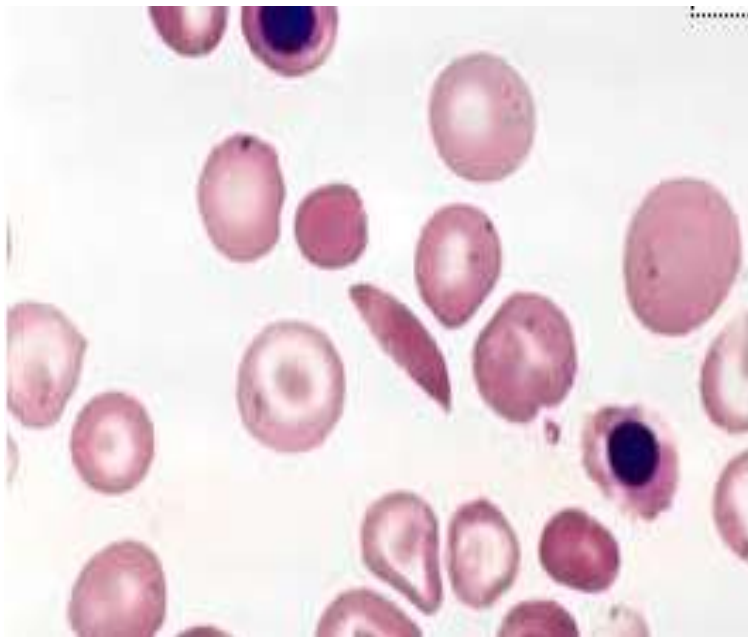


Figura 19. Frotis de paciente homocigota a Hb S

En las 60 muestras procesadas mediante electroforesis, todas presentaron el pico característico de Hb S.

El porcentaje cuantificado de Hb S en las 60 muestras se encontró una media de 41.7 ± 1.7 .

En la figura 20 se observa el resultado de electroforesis de un paciente heterocigoto a Hb S, se realizó el corrimiento a pH alcalino, el porcentaje cuantificado de Hb A en esta muestra fue de 55.2 % y Hb S de 41.8 %. La inducción de drepanocitos fue positiva.

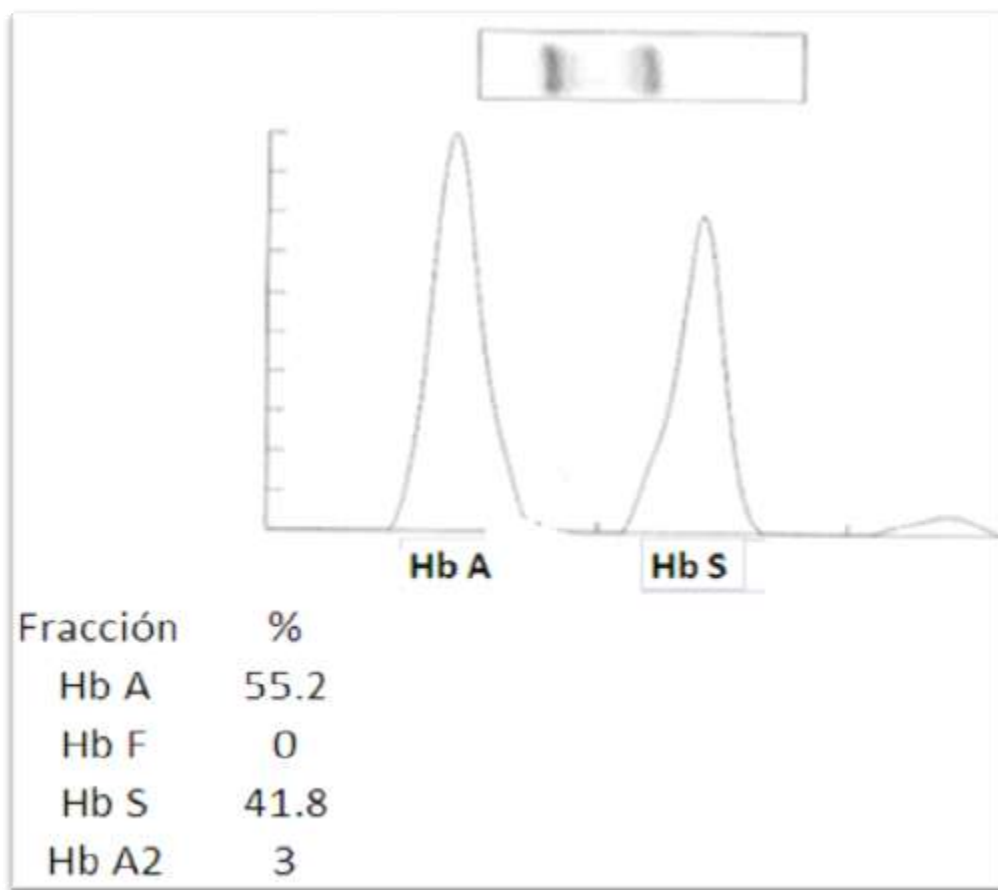


Figura 20. Electroforesis de paciente heterocigoto a Hb S

Se realizó la correlación entre HPLC y electroforesis a 60 muestras, para corroborar la detección de la fracción de Hb S en HPLC observada en el cromatograma, por lo que se empleó la electroforesis para confirmar la presencia de la hemoglobinopatía. Se obtuvo una correlación de 36.2 %. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Correlación en ambos métodos

		HPLC	Electroforesis
HPLC	Correlación de Pearson	1	.362
	Sig. (bilateral)		.004
	N	60	60
Electroforesis	Correlación de Pearson	.362	1
	Sig. (bilateral)	.004	
	N	60	60

La correlación que se obtuvo fue menor, debido a que hay dispersión en los datos, como se puede observar en la figura 21, sin embargo existe asociación en ambos métodos para la cuantificación de Hb S.

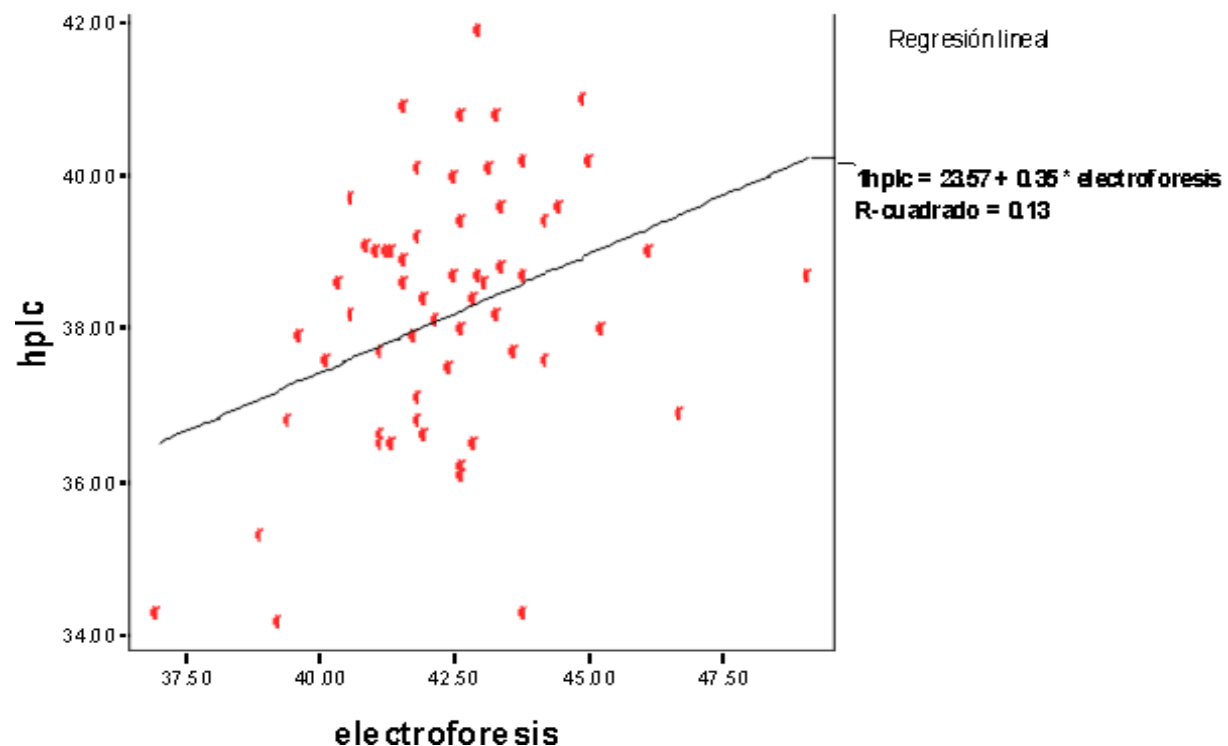


Figura 21. Gráfica de correlación en ambos métodos.

10. Discusión

Existen pruebas cualitativas y cuantitativas que permiten la detección de Hb S, entre ellos se encuentran la prueba de inducción de drepanocitos, pruebas de solubilidad, la electroforesis y HPLC.

El HPLC ha sido empleado para la detección de variantes hemoglobínicas. Entre ellos puede mencionarse a Joutovsky *et al*⁵¹, quienes reportan el estudio de 60 000 muestras de hemoglobina mediante HPLC, con electroforesis ácida y alcalina, enfoque isoeléctrico e incluso estudios de ADN, concluyeron que la proporción detectada de Hb S respecto a la hemoglobina total, constituye información suficiente para la identificación de hemoglobinopatías como la Hb S.

En este estudio se empleó método de HPLC, para la determinación de hemoglobina glucosilada y en su reporte final apareció un desglose de las diferentes fracciones de hemoglobina presentes en cada muestra, representándolas en un cromatograma, de ahí se observó la presencia de la hemoglobina anormal como la hemoglobina S, señalada como S-window, presentada en la figura 15.

Cuando se realizaron las inducciones de drepanocitos, se observó que los eritrocitos adquirirían la forma de media luna, debido a que perdían el oxígeno mediante el metabisulfito de sodio, se dejó reaccionar entre 20 a 30 minutos, la deformación de los eritrocitos indicó inducción positiva. Ferguson *et al*¹⁵ afirman que la hipoxemia deforma los eritrocitos en media luna, el fenómeno de drepanocitosis puede provocarse *in vitro* mediante inducción de drepanocitos, es útil ya que los eritrocitos son sometidos a un agente reductor, en un medio carente de oxígeno la Hb S se hace menos soluble y se forman los drepanocitos.

En las inducciones que resultaron negativas probablemente influyó el tiempo para la deformación de los eritrocitos, debido a que al parecer se requiere un mayor tiempo de reacción de la gota de sangre con el metabisulfito, inicialmente las inducciones se deberían observar después de una hora, sin embargo, Kotila *et al*²⁵ afirman que hay que observar la preparación después de una reacción de 24 horas.

Las 149 muestras analizadas mediante HPLC se obtuvieron porcentajes de área entre 34 y 42% de Hb S, 48 y 57% de Hb A, con tiempo de retención entre 0.90 y 0.92. A estos pacientes se identificaron como heterocigotos. Por otra parte, en un estudio realizado por Vega *et al*⁴⁴ encontraron que los pacientes heterocigotos presentaban entre 35% a 45% de Hb S y Hb A entre 50-60%. Lo cual indica que mediante la técnica de HPLC es posible la identificación de la hemoglobinopatía S.

En los resultados de la biometría hemática de los pacientes heterocigotos, presentaron valores hematológicos normales. En el frotis de sangre de algunos pacientes, se observó hipocromía y microcitosis, sin embargo, Bustamante *et al*³³ señalan que en el frotis de sangre de estos pacientes presentan morfología eritrocitaria normal. Generalmente estos pacientes heterocigotos son asintomáticos, pero en circunstancias de hipoxia severa pueden llegar a presentar crisis vaso-oclusivas.

Dentro de las 150 muestras se obtuvo el resultado de una paciente de 32 años, la cual se detectó Hb S con un porcentaje de 73.2%, fue la única que presentó este porcentaje alto. Por otro lado, Vega *et al*⁴⁴ mencionan que aquellas muestras detectadas con niveles de Hb S superiores al 70% son pacientes homocigotos. También Frisancho *et al*⁴⁰ refieren que los sujetos homocigotos poseen alto porcentaje de Hb S, presentan crisis de anemia hemolítica y fenómenos de oclusión vascular.

Es importante destacar que Rodak *et al*⁵ menciona que los homocigotos presentan la enfermedad de células falciformes, la cual es una anemia hemolítica crónica, cuya clasificación morfológica es normocítica normocrómica.

La paciente homocigota presentó 2.55 millones/ μ l de eritrocitos, 10.1 g/dL de hemoglobina, hematócrito de 30.5 %, el RDW de 19.4%. En la observación al frotis se encontró: hipocromía, anisocitosis con microcitos y macrocitos, poiquilocitosis, células falciformes, punteado basófilo, basofilia difusa y presencia de eritroblastos. Así mismo, Ferguson *et al*¹⁵ realizaron el frotis de un paciente homocigoto a Hb S, observaron alteraciones de la serie roja como hipocromía, poiquilocitosis, microcitosis y abundantes drepanocitos. Lo cual indica que mediante la lectura de frotis sanguíneo es posible observar las anormalidades eritrocitarias que son característicos a una hemoglobinopatía.

Cabe mencionar que Antoniazzi *et al*²⁷ señalan que los pacientes homocigotos a Hb S carecen de cadenas polipeptídicas beta normales, por lo que no tienen Hb A. Sin embargo, a la paciente homocigota no se pudo cuantificar la fracción de A1C debido a que no presenta Hb A. Esto es a que dentro de la Hb A se encuentran las tres diferentes fracciones: la A1a, A1b y A1c, siendo esta última la importante para el seguimiento de la diabetes.

Señalan Peñaloza *et al*⁴³ que la electroforesis alcalina es el primer paso para el diagnóstico definitivo de las hemoglobinopatías, debido a que algunas hemoglobinas presentan los mismos patrones de movilidad electroforética. Todas las hemoglobinas que muestran un patrón electroforético anormal a pH alcalino deben someterse a pH ácido para identificación definitiva.

De las 150 muestras detectadas en HPLC, 60 muestras se procesaron mediante electroforesis, en la gráfica de electroforesis de estas muestras se observaron el pico característico de Hb S, la media cuantificada de los porcentajes de Hb S fue entre 41.7 ± 1.7 .

Se realizó la correlación de 60 muestras analizadas mediante HPLC y electroforesis para corroborar el dato reportado por Henry *et al*⁵⁰, quienes obtuvieron coeficiente de correlación de 0.97, sin embargo, el número de pacientes fue de 81. Asimismo los porcentajes de Hb S cuantificados por ambos métodos oscilan entre 10 y 100%. Por otra parte la correlación experimental obtenida fue de 0.36, se obtuvieron porcentajes entre 30% a 50% de Hb S en los dos métodos. Cabe destacar que estadísticamente el coeficiente de correlación depende del rango de valores observados en la muestra y si se incluyen valores extremos el coeficiente aumenta. La correlación que se obtuvo fue debida a la gran dispersión que existe entre los datos.

Es importante mencionar que las muestras detectadas con Hb S mediante HPLC, son muestras de pacientes que llegaron para la determinación de hemoglobina glicosilada, esta prueba de laboratorio se emplea para monitorear los niveles de glucosa en el paciente diabético. En el cromatograma se observó el área de Hb S, así que éstos pacientes desconocen que son heterocigotos a Hb S. Además de presentar diabetes se complica aún más su estado de salud, porque al ser heterocigotos a Hb S, cuando son sometidos a baja concentración de oxígeno los eritrocitos se deforman y ocasionan crisis vasclusivas, llegando afectar diversos órganos.

11. Conclusión

Hipótesis

De acuerdo a la literatura que reporta una correlación entre HPLC y electroforesis de 97%, suponemos que existirá una asociación en ambos métodos en muestras positivas a la inducción de drepanocitos.

Conclusión

La correlación que se encontró entre electroforesis y HPLC fue del 36.2 %, asimismo se observó una asociación con la inducción de drepanocitos, reforzando el diagnóstico de la hemoglobinopatía S. Cabe destacar que empleando HPLC nos permite determinar la presencia de Hb S.

12. Sugerencia

- Se recomienda emplear inducción de drepanocitos con un tiempo más prolongado, en aquellas muestras que resultan negativas a la inducción.

13. Referencias

1. Argüelles R. Fundamentos de Hematología. 4ª ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 2009.
2. Franco VL. La hemoglobina: una molécula prodigiosa. Rev. Acad. Cienc. Exact. 2010; 104 (1): 213-232.
3. Peñuela OA. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. Colomb Med 2005; 36: 215-225.
4. González B, Arilla F, Sánchez P. Bioquímica Clínica. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 1998.
5. Rodak FB. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
6. Turgeon ML. Hematología clínica. Teoría y procedimientos. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2005.
7. Pagana K, Pagana T. Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. España, Mosby; 1994.
8. McKenzie S. Hematología clínica, 2ª ed. USA: Manual Moderno; 2000.
9. Turnpenny P, Ellard S. Emery: Elemento de Genética Médica. 13ª ed. Barcelona, España: Elsevier; 2009.
10. http://www.fundatal.org.ar/actividades/anemias_hereditarias/3Fisiologia_membrana_Crisp.
11. Perez P, Rodríguez W, Díaz G, Cabrera J. Mitos y realidad de la hemoglobina glicosilada. Met Int. Mex. 2009; 25(3): 202-209.
12. Floirián M, Soler BM, Cuadra BY. Análisis del trabajo en gestantes con hemoglobinopatías en el municipio de Santiago de Cuba. Rev Cubana Enfermer 1999; 15(3):174-8.
13. Pereira FD, Saenz I. Hemoglobinopatías en niños. Colombia Médica. 1996;27:146-149.
14. Galiza G, Da Silva M. Aspectos moleculares da anemia falciforme. Bras Patol Med Lab. 2003;39:51-66.

15. Ferguson D, Sánchez E, Rojo J. Prevalencia de hemoglobina AS en adolescentes. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2003; 66 (3): 136-141
16. Lezana F, Álvarez L, Álvarez M, Velázquez A, Ortiz S, Dávila L, Lara E. Hemoglobina glucosilada en 1,152 sujetos con diabetes, que participaron en la estrategia UNEMEs Recorridos por la Salud en México en 2009. *Med Int Mex* 2009-2010;26(4):337-345.
17. Roa D, Aguinaga M, Ruiz W, Ulloa V, Turner E. Búsqueda de hemoglobinas anormales en los recién nacidos en las grandes alturas. *Rev Med Hered* 1997; 8:87-91.
18. Sáenz GF. Hemoglobinas anormales. *AMC*. 2005;47(4):172-179.
19. De las Heras Flórez S, Pérez Hernández LM. Hemoglobinopatías diagnosticadas en el área sanitaria del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria de Santa Cruz de Tenerife durante un año. *An. Med. Interna*. 2008, 25;2:61-66.
20. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood. Rev.* 2003;17:43-53.
21. Wai KY. Prospects for research in hematologic disorders. *JAMA* 2001;285(5):640-642.
22. Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, Phanasgaonkar S, et.al HPLC Studies in Hemoglobinopathies. *Indian Journal of Pediatrics*. 2007; 657-662.
23. Fonseca P. Detección de hemoglobina S en población neoespartana autóctona mediante HPLC y estimación del aporte africano presente en esta población híbrida actual. *Revista Electrónica de Portales Médicos*. 2011; 25-31.
24. Roa D, Aguinaga M, Ruiz W. Búsqueda de hemoglobinas anormales en los recién nacidos en las grandes alturas. *Rev Med Hered* 1997; 8:87-91.
25. Kotila TR. Guidelines for the diagnosis of the haemoglobinopathies in Nigeria. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. 2010; 8(1):25-30.
26. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Reviews*. 2011; 25:205–213.

27. Antoniazio Z, Andréia A, Canalli, Silva J, Bonini D. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. Rio de Janeiro. 2002;38:261-266.
28. Pandey S, Ranjan R, Totej GS, Rao S, Mishra RM, Pandey Sw, Saxena R. Micronutrients status along with hematological and biochemical parameters in sickle cell types: preliminary report from India Rev Hematol Mex 2011;12(3):131-137.
29. http://www.fundatal.org.ar/actividades/anemias_hereditarias/genetica.Fisiologia_membrana
30. Gupta PK, Kumar H, Kumar LT, Brig MJ. Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography for Diagnosis of Haemoglobinopathies. MJAFI 2009;65:33-37.
31. Carrizosa J, Lopera J, Cornejo W. Enfermedad cerebrovascular en niños con anemia de células falciformes. Rev Neurol 2003; 37 (6): 511-514.
32. Rodríguez GM. Avances sobre anemia falciforme. Acta Medica Dominicana. 2010. 20 (6): 231-239.
33. Bustamante Z, García R, Martínez G. Genética, características de la hemoglobina S, anemia falciforme y haplotipos. UMSS. 2002.
34. Adorno E, Zanette A, Lyra I, Oliveira SM, Galvao RM, Goncalvez M. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. Genet Mol Biol. 2008;31:621-625.
35. Ruiz C, Hernández M, Nieva G. Anemia de células falciformes y hemoglobina fetal. Rev Med IMSS 2003; 41 (4): 299-303.
36. Salomon CJ, Gomez VL, Morales H. Estudio clínico y genético de tres casos de anemia de células falciformes. Salud en Tabasco. 2006; 12 (2); 440-442.
37. Fernández A, Pérez E, Lores M, Losada J. Influencia del método de obtención de la solución de hemoglobina S en el tiempo de demora medido por resonancia magnética. 2002; 14(2):59-64.

38. Bernal M, Collazos A, Bonilla D, Tascón P. Determination of the prevalence of hemoglobin S, C, D, and G in neonates from Buenaventura, Colombia. *Colomb Med.* 2010;41(2):141-147.
39. Tapia G, Gonzalez G, Sanchez A, Uzcategui E. Infarto esplénico por anemia falciforme relacionado con la altura. *Rev Venez Cir.* 2006;59 (2);60-65.
40. Frisancho EO, Ichiyanagui RC. Infarto de Bazo y Hemoglobinopatía S en la Altura. *Rev. Gastroenterol.* 2012; 32 (1): 68-78.
41. http://www.fundrepa.organos_afectados.hbS.
42. Prudencio BC, Covas DT. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, 2000, **22**(2): 99-109.
43. Peñaloza E, Buentello M, Hernández M, Nieva G, Lisker Y, Salamanca GF. Frecuencia de la hemoglobina S en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en la salud pública. *Salud Publica Mex* 2008;50:325-329.
44. Vega SM, Martínez MV, Ascencio R, Aguilar SC. Comparación entre los resultados del equipo D10TM Bio Rad (HPLC) y la electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa para la detección de hemoglobinas S y C en pacientes de la Clínica Dr. Marcial Fallas Díaz. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica.* 2009;15(4):15-18.
45. Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection & characterization. *Indian J Med Res.* 2011;15: 538-546.
46. Loi G, Danieli K, Najai B, Klein M, Pinarello P, Martins C, Arrua J, Edson P. Estudo comparativo entre metodologias de triagem para detecção de hemoglobina S em bancos de sangue. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47:137-140.
47. Uzquiano M, Semyon A, Risin MD. Premature Neonate With Apnea and Trace Amounts of Hemoglobin S and A Detected by High-Performance Liquid Chromatography. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130, 733-734.
48. Higgins TN, Ridley B, Clarke G. Novel method for screening for the presence of haemoglobin S in blood. *Transfusion Medicine.* 2005, 15, 493–497.

49. Bravo U, Arends A, Montilla S, Velásquez D, García G, Álvarez M, et. al. Ventajas de la Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC-CE) en el estudio de Hemoglobinopatías en Venezuela. *Invest Clin*. 2004;(4):309–315.
50. Henry DE, Hernan S, and Zak K. Rapid Quantitation of Hemoglobin S in Sickle Cell Patients Using the Variant II Turbo Analyzer. *Annals of Clinical & Laboratory S*. 2009;39:1:32-38.
51. Joutovsky A, HadziJ, Nardi A. HPLC Retencion Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: a study of 60 000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clinical Chemistry*. 2004; 50 (10); 1736-1747.
52. Rao S, Kar R, Kumar S, Chopra A. Spectrum of haemoglobinopathies diagnosed by cation exchange-HPLC & modulating effects of nutritional deficiency anaemias from north India. *Indian J Med Res*. 2010;12:513-519.
53. López I, Silva F, Marilda S, Gonçalves, E. Adôrno DP, Campos M. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2005;27(3):183-187.
54. Duarte M, Balderas V, Hinojosa M. Importancia en la detección temprana de hemoglobinopatías con el tamiz neonatal. *Ortin Lab*. 2010.