

# Aplicación de un algoritmo diagnóstico de laboratorio para la detección de hemoglobinopatías

## Performance of a diagnostic laboratory algorithm for the detection of hemoglobinopathies

Muñoz R<sup>1</sup>, Laso Bautista J<sup>2</sup>, Rapún L<sup>2</sup>, Banús C<sup>2</sup>, Prado MC<sup>2</sup>, Montero E<sup>2</sup>, Huete L<sup>2</sup>, López Andreoni L<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital del Mar. Paseo Marítimo 25-29. 08003. Barcelona (España)

<sup>2</sup>Laboratori de Referència de Catalunya

landreoni@lrc.es

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL EN EL MARCO DEL XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA

Fecha recepción: 29/06/2018

Fecha aprobación: 27/12/2018



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA

Volumen 22 nº 3: 269-276

Septiembre - Diciembre 2018

**Palabras claves:** talasemia, hemoglobinopatía estructural, algoritmo, diagnóstico.

**Keywords:** thalassemia, structural hemoglobinopathy, algorithm, diagnosis.

### Resumen

Las hemoglobinopatías son alteraciones genéticas cualitativas o cuantitativas que afectan a las cadenas de globina, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural (hemoglobinopatías estructurales) o una disminución de la síntesis de una cadena de globina estructuralmente normal (talasemias). Su expresión clínica es muy variable y una detección precoz es crucial para un correcto manejo y consejo genético. Presentamos una propuesta de algoritmo diagnóstico del laboratorio de hematología para el estudio de estas enfermedades y los resultados obtenidos durante su aplicación durante un año y cuatro meses. En el estudio se incluyeron 626 muestras de

pacientes provenientes de varios hospitales terciarios de Barcelona y otras ciudades cercanas de Cataluña. El cribaje se realizó mediante resultados de parámetros del hemograma (volumen corpuscular medio, anemia, conteo de glóbulos rojos), de HPLC, electroforesis básica y ácida, y técnicas de biología molecular. El diagnóstico se concretó en un 83% de los pacientes (517 muestras). En el resto no se llegó a finalizar el estudio por falta de relevancia clínica en la mayoría de los casos. La interpretación racional y protocolizada de varios resultados analíticos pone de manifiesto la importancia del laboratorio en el diagnóstico integrado de este tipo de patologías.

**Abstract**

Hemoglobinopathies are qualitative or quantitative genetic disorders that affect the globin chains, whose consequence may be a structural modification (structural hemoglobinopathies) or a decrease in the synthesis of a structurally normal globin chain (thalassemias). Its clinical expression is very variable and early detection is crucial for proper management and genetic counseling. We present a diagnostic lab algorithm for the study of these conditions and the results obtained during its application during one year and four months. The study included 626 samples from patients of several tertiary hospitals in Barcelona and other nearby cities in Catalonia. Screening was performed by means of results of blood cell parameters (mean corpuscular volume, anemia, red blood cell count), HPLC and molecular biology techniques. The diagnosis was made in 83% of the patients (517 samples). In the rest, the algorithm was not completed due to lack of clinical relevance in most cases. Rational and protocolized interpretation of several analytical results highlights the importance of the laboratory in the integrated diagnosis of this type of pathology.

**Introducción**

Las hemoglobinopatías son un grupo heterogéneo de enfermedades monogénicas (de herencia mendeliana) que se clasifican en dos categorías: las talasemias, que se caracterizan por una reducción en la síntesis de alguna de las cadenas de las globinas, que estructuralmente son normales, y las variantes estructurales. El genoma humano codifica para seis tipos diferentes de cadenas de globinas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) y zeta ( $\zeta$ ), con una síntesis y asociación diferencial en el estado embrionario, fetal, del recién nacido y adulto. Estos genes se encuentran en dos *clusters* separados. Por un lado, el gen  $\zeta$  y los dos genes  $\alpha$  (globinas *símil- $\alpha$* ), así como algunos pseudogenes no funcionales, se encuentran en el cromosoma 16. Los genes para las cadenas  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ , y las dos cadenas  $\gamma$  (globinas *símil- $\beta$* ) están en el cromosoma 11<sup>(1,2)</sup>. Hasta los 3 meses del desarrollo embrionario se expresan dímeros de cadena  $\zeta$  que se pueden combinar con las cadenas  $\epsilon$  o  $\gamma$ . También existen combinaciones  $\alpha_2\epsilon_2$ . Durante el desarrollo fetal se expresa mayoritariamente la Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), cuyo nivel va disminuyendo hasta estabilizarse en torno a los 12-24 meses de vida postfetal<sup>(3)</sup>.

Durante toda la vida adulta tan sólo se forman tres tipos de hemoglobina en individuos sanos, que son el resultado de la unión de dos cadenas  $\alpha$  con sendas cadenas *símil- $\beta$* . Aparte de la Hb F, éstas son la Hb A<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ), que oscila en torno al 97% de toda la Hb funcional en el adulto y está formada por dos cadenas  $\alpha$  (141 aminoácidos) y dos cadenas  $\beta$  (146 aminoácidos); y la Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), constituida por dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\delta$ , que difieren de las cadenas  $\beta$  en 10 de los 146 aminoácidos<sup>(4)</sup>. En el individuo adulto oscila entre el 1,5% y el 3,5%, no aumentando excepto en circunstancias excepcionales debido a una transcripción ineficiente del gen de la globina  $\delta$  por diferencias en el promotor<sup>(5)</sup> y el segundo intrón<sup>(6)</sup>.

En las  $\beta$ -talasemias, hay una gran heterogeneidad de mutaciones posibles, aunque la mayoría están asociadas con sustituciones de una sola base que producen defectos en la región promotora, en el empalme del RNA o en la traducción, resultando en un mRNA inestable o en menor cantidad. Algunas mutaciones provocan la ausencia total de proteína ( $\beta^0$ ) o la presencia de una menor cantidad ( $\beta^+$ )<sup>(7)</sup>.

Las  $\alpha$ -talasemias son causadas generalmente por deleciones génicas de diferentes longitudes debidas generalmente a la recombinación desigual entre unidades homólogas que flanquean los genes de  $\alpha$ -globinas. Es lo que ocurre, por ejemplo, con las deleciones  $-\alpha^{3,7}$  y  $-\alpha^{4,2}$ . En las  $\delta\beta$ -,  $\gamma\delta\beta$ -talasemias, grandes deleciones afectan a los genes implicados. La severidad de las manifestaciones clínicas de estas enfermedades se relaciona con la cantidad de cadenas de globina producidas y la estabilidad y la capacidad de las cadenas residuales presentes en exceso para unirse entre sí<sup>(8)</sup>. Los síndromes denominados "talasemia menor" se caracterizan clínicamente por una anemia leve con microcitosis persistente. La talasemia intermedia (por ejemplo la enfermedad de Hb H  $-\beta_4^-$ ) está tipificada como una anemia hemolítica variablemente compensada que puede presentarse con síntomas clínicos durante periodos de estrés fisiológico, como una infección, el embarazo o una cirugía. Los síndromes denominados "talasemia mayor" producen una anemia hemolítica severa, con potencial riesgo vital. La  $\alpha$ -talasemia mayor (Hydrops fetalis con Hb de Bart  $-\gamma_4^-$ ) es habitualmente incompatible con la vida extrauterina, mientras que la forma  $\beta$ -mayor se suele presentar desde la infancia y requiere una terapia transfusional de por vida o

trasplante de médula ósea para un control exitoso de la enfermedad<sup>(9)</sup>.

Por su parte, las hemoglobinopatías estructurales son causadas por variantes de secuencia de la Hb que en un 90% se deben a mutaciones puntuales que provocan la sustitución de un único aminoácido, con frecuencia de los casos en la proximidad del grupo hemo. En el 10% restante, la cadena polipeptídica es anormalmente corta o larga como resultado de errores de terminación, cambio de marco de lectura, inserciones, deleciones o cadenas fusionadas o híbridas. La mayoría afectan a las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ , y una buena cantidad de variantes que han sido descritas no causan ningún fenotipo clínico. Su nomenclatura se basa en la asignación de una letra del abecedario, una localización geográfica, o el nombre de la familia donde se encontró el caso índice de la variante. En las variantes homocigotas de cadena  $\beta$ , no existen cadenas  $\beta$  normales (y por tanto tampoco hay Hb A<sub>1</sub>). Como las cadenas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  son normales, la Hb F y Hb A<sub>2</sub> son estructuralmente normales, aunque su cantidad puede estar más elevada. Las variantes estructurales más prevalentes por mucho son las Hb S, C, D y E, todas ellas mutaciones puntuales de la cadena  $\beta$ . En los heterocigotos para variantes estructurales de cadena  $\alpha$ , los tres tipos de hemoglobinas del adulto se verán afectadas y, por tanto, se observarán seis formas de hemoglobina, tres normales y tres anormales. Existen también los dobles heterocigotos para todas estas hemoglobinopatías, tanto estructurales como talasémicas<sup>(10)</sup>.

El cuadro clínico es muy variable y depende en definitiva del tipo y la localización de la mutación, que determinan la configuración espacial de la molécula y sus propiedades físicas, que se manifestarán como: polimerización intracelular (Hb S, Hb C), alteración de su afinidad por el oxígeno (Hb Kansas), inestabilidad de la molécula (Hb inestables), acumulación de metahemoglobina (Hb M), o con expresión talasémica (Hb Lepore).

La prevalencia de cada hemoglobinopatía es particular en las diferentes regiones del planeta, pero de forma general, son más frecuentes en poblaciones originarias del Mediterráneo y zonas tropicales de África y Asia<sup>(11)</sup>. Muchos de los movimientos migratorios de los últimos años nos han permitido observar un aumento en el diagnóstico de algunas de estas hemoglobinopatías en nuestra zona.

Aunque ya en 1975 el *International Committee for*

*Standardization in Hematology* (ICSH) realizó un documento con una serie de recomendaciones para el diagnóstico de hemoglobinas anormales y talasemias<sup>(12)</sup>, el avance de algunas de las tecnologías ha cambiado este enfoque y la disponibilidad y avances de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha simplificado mucho la investigación de estas enfermedades<sup>(13,16)</sup>. La investigación inicial, sobre todo en el caso de las talasemias, debe comenzar con el hemograma completo, prestando atención a algunos componentes clave: concentración de Hb, conteo de hematíes, volumen corpuscular medio (VCM) y, como apoyo, la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE).

Las talasemias son anemias microcíticas hipocrómicas, con un aumento en el recuento de hematíes<sup>(13)</sup>. Se han desarrollado varios índices empleando estos componentes del hemograma para intentar proveer de una medida matemática cuantitativa para diferenciar de forma orientadora la anemia ferropénica (la otra causa fundamental de anemia microcítica) de una talasemia menor. Sin embargo, no se han demostrado útiles en un entorno clínico y ninguno supera el valor del VCM solo en el tamizaje de talasemias<sup>(14)</sup>.

Por su parte, la HPLC de intercambio catiónico ha emergido como el método de elección para el tamizaje de hemoglobinopatías estructurales<sup>(15)</sup> y para la cuantificación de la concentración de Hb A<sub>2</sub> y Hb F, existiendo equipos automatizados que separan, identifican y cuantifican estas hemoglobinas y variantes como Hb S y C<sup>(16)</sup>. Estudios del *College of American Pathologists* han mostrado una capacidad diagnóstica equivalente o superior a los tradicionales métodos electroforéticos. Tras la identificación presuntiva de una hemoglobinopatía, se puede recurrir a la identificación de la mutación, de cara sobre todo al consejo genético, y para ello existen diferentes técnicas de genética molecular: PCR con posterior unión de productos a sondas alelo-específicas, amplificación con cebadores alelo-específicos, o amplificación dependiente de deleción con cebadores de las regiones flanqueantes etc. También se pueden investigar mutaciones no conocidas o minoritarias con otros métodos de amplificación<sup>(13)</sup>.

### Objetivo

Describir y analizar los resultados de la implementación de un algoritmo diagnóstico en el laboratorio

de hematología para la detección de talasemias y hemoglobinopatías estructurales.

### Materiales y métodos

Entre los meses de noviembre de 2015 y febrero de 2017 se analizaron las muestras recibidas en nuestro laboratorio procedentes de un hospital de tercer nivel, el Parc de Salut Mar de Barcelona, y de otros hospitales comarcales de ciudades cercanas de la costa catalana (Hospital de Mataró, Hospital de Calles, Hospital de Blanes y Hospital de Reus). No se realizó una selección de pacientes en función de criterios clínicos, por lo que éstos podían ser tanto de atención primaria como hospitalizados y provenir de cualquier servicio. Los criterios de aplicación del algoritmo fueron estrictamente parámetros de laboratorio, siendo los criterios de inclusión los parámetros que se explican en el diseño del algoritmo, y el único motivo de exclusión el hecho de poseer ya un diagnóstico previo de alguna de estas enfermedades. A pesar de la condición asintomática de muchas de estas patologías, es importante su filiación de cara a un potencial consejo genético en pacientes en edad reproductiva, sobre todo si provienen de poblaciones endógamas.

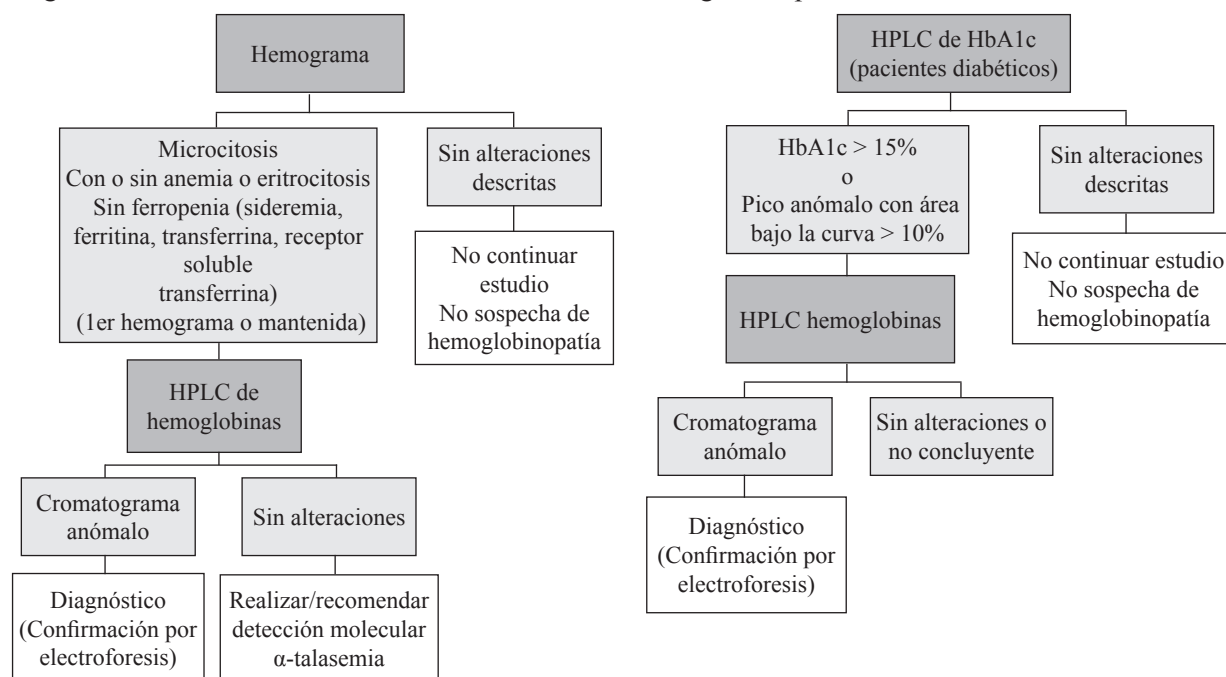
Se emplearon los autoanalizadores de hematimetría Sysmex XN-1000 para la determinación del hemograma, así como los sistemas automatizados de

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico Variant-D100 y Variant-II (Bio-Rad) para analizar el porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) y de hemoglobinas en la sangre, respectivamente. La confirmación de las posibles hemoglobinas variantes detectadas mediante HPLC se realizó mediante electroforesis alcalina y ácida en gel de agarosa con el equipo comercial Hydrasis (Sebia). Las mutaciones más frecuentes de  $\alpha$ -talasemia se confirmaron con el kit  $\alpha$ -globin Strip Assay (ViennaLab Diagnostic). Junto con la petición analítica, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes implicados en el estudio, de acuerdo con la normativa de cada uno de los centros.

### Diseño y justificación del algoritmo diagnóstico

El algoritmo aplicado se muestra en la **Figura 1**. Comienza con la realización del hemograma y la valoración del volumen corpuscular medio (VCM). Si es el primer análisis y el VCM se encuentra disminuido, se inicia el algoritmo. En cambio, si tiene histórico el protocolo se aplica sólo si el VCM siempre estuvo disminuido. Van a pasar desapercibidos pacientes con hemoglobinopatías que no alteran el VCM, como también talasemias sin microcitosis, por presentar déficit de ácido fólico o de vitamina B12 asociados.

El siguiente paso es el estudio del metabolismo del



**Figura 1.** Representación esquemática de algoritmo diagnóstico de laboratorio seguido para la detección de talasemias y hemoglobinopatías estructurales.

hierro, porque la falta del mismo es la causa más frecuente de microcitosis. Por ello, se debe analizar: la sideremia o concentración de hierro sérico, la ferritinemia, la transferrinemia y el índice de saturación de transferrina (IST). Aunque no está incluido en el algoritmo, la medida del ADE puede ser de ayuda, ya que un aumento en la variación del tamaño celular de los hematíes es más propio del déficit de hierro, mientras que los síndromes talasémicos tienden a producir una población de hematíes microcíticos más homogénea y con un ADE dentro del rango de la normalidad, con algunas variaciones y notables excepciones como en la Hb H y la  $\delta\beta$ -talasemia heterocigota. Descartada la ferropenia o una anemia asociada a procesos crónicos, procede seguir investigando una hemoglobinopatía. Para ello se emplea la HPLC de intercambio catiónico (**Tabla 1**): una alteración en los porcentajes de hemoglobinas normales en el adulto o en un niño mayor de 2 años nos hará sospechar o confirmar algunas hemoglobinopatías: un ligero aumento del porcentaje de Hb A<sub>2</sub>

(>3.5%), con una Hb F normal o aumentada muy ligeramente, confirma una  $\beta$ -talasemia heterocigota. Su cantidad está normalmente relacionada con la cantidad de cadena  $\beta$  sintetizada. Un aumento de Hb F superior al 60% y de hasta el 100%, siendo la práctica totalidad del resto HbA<sub>1</sub> confirma el diagnóstico de  $\beta$ -talasemia homocigota con diferentes grados de expresión residual de cadena  $\beta$ . Igualmente, diferentes grados de aumento de Hb F (desde el 5 al 100%) con un característico aumento del ADE confirman el diagnóstico de  $\delta\beta$ -talasemia hetero- u homocigota. La presencia de un porcentaje en torno al 5-30% de Hb H (mayor durante el primer año de vida) y un posible porcentaje residual de Hb de Bart indican una  $\alpha$ -talasemia intermedia. Normalmente, un portador silente (mutación que afecta sólo uno de los cuatro genes de  $\alpha$ -globinas) de  $\alpha$ -talasemia tiene un cromatograma normal y un hemograma en el que incluso todos los parámetros relevantes para el diagnóstico están dentro del intervalo de referencia. Puesto que la mayoría de hemoglobinopatías no cur-

**Tabla 1.** Resumen de criterios diagnósticos de HPLC de hemoglobinas.

\*La sospecha de una hemoglobinopatía se confirma posteriormente mediante electroforesis.

Criterios diagnósticos cromatográficos para hemoglobinopatías*	
$\beta$ -talasemia heterocigota	HbA <sub>2</sub> > 3,5%
$\beta$ -talasemia homocigota	HbF > 60%
$\beta/\delta$ -talasemia heterocigota	HbA <sub>2</sub> 2-3,4% y HbF 5-20% (con presencia de microcitosis)
Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF)	HbF 5%-100% (sin presencia de microcitosis)
Hb S, C, E, D heterocigotas	Pico de movilidad electroforética específica para cada variante <50% pero cercano
Doble heterocigoto SC	Hb S = Hb C en torno a 50%
Doble heterocigoto S/ $\beta^0$ -talasemia	Hb S 75-90%; Hb A <sub>1</sub> 0%; HbA <sub>2</sub> > 4,5%; HbF 5-20%
Doble heterocigoto S/ $\beta^+$ -talasemia	Hb S > 50%; Hb A <sub>1</sub> 15-30%; HbA <sub>2</sub> > 4,5%; HbF 1-20%
Hb Lepore	Pico en A <sub>2</sub> entre 8-20 % con una base generalmente amplia
Hb O-árabe	Pico desconocido con tiempo de retención 4.8 minutos
Otras hemoglobinopatías	Cualquier pico de movilidad electroforética anormal

san con las alteraciones mencionadas del hemograma, o son muy ligeras (salvo aquéllas con expresión talasémica, como Hb Lepore o Hb E), su hallazgo en la cromatografía siguiendo el algoritmo será accidental en la mayoría de los casos. Se orienta el diagnóstico de las hemoglobinopatías estructurales más prevalentes, como la S, C o D por su presencia

en un porcentaje cercano pero menor del 50% en los heterocigotos, o cercano al 100% en los homocigotos. Los dobles heterocigotos más comunes (Hb SC, Hb SD, HbS/ $\alpha$ - o  $\beta$ -talasemia etc) también tienen perfiles cromatográficos característicos con los que podemos afinar el diagnóstico. Cuando su desplazamiento cromatográfico se solape con el de otras

hemoglobinas, se debe confirmar con un segundo método, como la electroforesis ácida y básica, o capilar. En todos los casos, salvo si se trata de una talasemia menor típica o de portador de Hb S, con movilidad y cuantificación electroforética típicas y prueba de falciformidad positiva, el diagnóstico se confirmará mediante métodos moleculares.

Dado el coste económico del estudio molecular de alfa talasemia, sólo se realizó dicho estudio en los pacientes con historia clínica accesible en la que no constaba el diagnóstico y que, por su edad, pudieran beneficiarse de consejo genético.

La otra aproximación de nuestro algoritmo se realiza a partir de las muestras de diagnóstico o monitorización de pacientes diabéticos, a los que se le determina el porcentaje de HbA<sub>1c</sub>, que correlaciona con el nivel medio de glucemia en los últimos tres meses. Siendo una aplicación de HPLC con ajustes ligeramente diferentes, se pueden diagnosticar de forma incidental hemoglobinopatías estructurales. Los criterios a partir de los que se lleva a cabo una HPLC de hemoglobinas como la anterior son: presencia de un pico de HbA<sub>1c</sub> > 15% que pueda ocultar alguna variante con el mismo desplazamiento cromatográfico o presencia de un pico anómalo con un área bajo la curva mayor del 10%. Si se confirma o sospecha una hemoglobinopatía en la HPLC, los pasos a seguir son los ya descritos anteriormente.

## Resultados

Durante el tiempo de estudio, el algoritmo descrito se aplicó a un total de 626 muestras de pacientes que cumplían los criterios para realizar el tamizaje de hemoglobinopatías. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

De todas las muestras analizadas, se concretó un diagnóstico en 517 (83%), con una edad media al diagnóstico de 47 años y una distribución de sexos equitativa: 318 (51%) hombres y 308 (49%) mujeres. De éstas, la mayoría fueron heterocigotos para  $\beta$ -talasemia (53% del total de muestras), teniendo también una prevalencia relativamente alta la Hb S homo- o heterocigota (9%),  $\beta\delta$ -talasemia (5%) y  $\alpha$ -talasemia en su expresión más leve (5%). El resto de hemoglobinopatías mostradas en la **Tabla 2** tienen una frecuencia menor, y un total de 19 fueron otras variantes tanto de cadena  $\alpha$  como  $\beta$  con diferentes tiempos de elución en la cromatografía, así como movilidades electroforéticas distintas a las de

las hemoglobinas convencionales. En estos casos, debido a que no suelen tener repercusión clínica, se recomienda un estudio familiar, pero no consejo genético.

De las 30 muestras con diagnóstico molecular de  $\alpha$ -talasemia, las mutaciones más prevalentes detectadas en nuestra población fueron delecionales: 12 pacientes fueron homocigotos para la delección 3.7 Kb de un solo gen y 7 heterocigotos para la delección de dos genes SEA. Otras mutaciones delecionales, puntuales y triplicaciones estuvieron presentes en frecuencias más bajas (**Tabla 2**).

En cuanto a las 109 (17%) muestras en las que no se concretó un diagnóstico de hemoglobinopatía, 78 tenían una alta sospecha de alfa talasemia por lo que se dejó a criterio del clínico la decisión de completar el estudio.

Por el mismo motivo, no se completó el estudio de 12 muestras (2%) con un pico anómalo en la cromatografía al estudiar la HbA<sub>1c</sub>. Además, en 14 muestras (2%), picos cromatográficos de HbA<sub>1c</sub> >15% en pacientes diabéticos fueron coherentes con niveles de glicemia permanentemente muy elevados en el contexto de diabetes mal controlada, por lo que el estudio se debería repetir una vez estabilizada la glucosa sérica. Por último, fue curiosa la inclusión en el algoritmo de 5 pacientes con diagnóstico ya confirmado de policitemia vera (mutaciones en el gen JAK2) debido a las similitudes con las talasemias en los parámetros del hemograma, especialmente la eritrocitosis.

En todos los casos, se confirmó la presencia de ferropenia que justificaba el VCM y la HCM disminuidos, con un número total de hematíes por encima del límite superior del intervalo de referencia debido presumiblemente a su enfermedad hematológica (**Tabla 3**).

## Discusión

La aplicación de nuestro algoritmo en forma sistemática nos permitió diagnosticar un porcentaje elevado (83%) de talasemias y hemoglobinopatías estructurales. Gracias al diseño del algoritmo, muchas de ellas fueron un hallazgo casual (anomalías en el hemograma) y no una patología buscada por el clínico. El diagnóstico de este tipo de enfermedades, tiene mucha importancia en nuestro medio caracterizado por una alta prevalencia y elevadas tasas de endogamia, ya que permitiría una medicina preven-

tiva. En este estudio se demuestra la importancia de resultados analíticos.  
 una interpretación racional y protocolizada de los **Declaración de conflictos de interés:**

**Tabla 2.** Resultados de diagnóstico de hemoglobinopatías aplicando nuestro algoritmo. Se indican las frecuencias absolutas y relativas de cada condición diagnosticada, y de las muestras en las que no se completó el diagnóstico, señalando el motivo.

Resultado diagnóstico		Frecuencia absoluta (n)	Frecuencia relativa (%)
<b>Diagnóstico definitivo</b>			
β-talasemia heterocigoto		329	52.6
α-talasemias	Delección 3.7 homocigota	12	
	Delección 3.7 heterocigota	2	
	Delección FIL heterocigota	3	
	Delección SEA heterocigota	8	
	Delección MED heterocigota	1	
	Mutación α2 poly A-1 [AATAAA>AATAAG] heterocigota	1	
	Mutación α2 poly A-2 [AATAAA>AATGAA] heterocigota	1	
	A2 init cd [T>C] heterocigota	1	
	Doble heterocigoto para la delección 3.7 y la delección FIL	1	
	Total	30	
β/δ-talasemia		31	5
Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF)		3	0.5
Hb S heterocigoto		60	9.5
Hb C heterocigoto		18	2.9
Hb E heterocigoto		6	1
Hb D heterocigoto		9	1.4
Hb Lepore heterocigoto		9	1.4
Hb O-árabe heterocigoto		2	0.3
α-talasemia + HbS		1	0.2
Otras variantes no tipificadas		19	3
<b>TOTAL CON DIAGNÓSTICO</b>		<b>517</b>	<b>82.6</b>
<b>No diagnóstico</b>			
Cromatografía Hb normal. Se aconseja estudio molecular α-talasemia		78	12.4
Pico anómalo en cromatografía de HbA1c no estudiado		12	1.9
HbA1c > 15% coherente con la clínica		14	2.2
Policitemia vera		5	0.8
<b>TOTAL SIN DIAGNÓSTICO</b>		<b>109</b>	<b>17.4</b>

**Tabla 3.** Resultados de hemograma y del metabolismo de hierro de los pacientes con diagnóstico de policitemia vera que fueron incluidos en el algoritmo diagnóstico (IST: índice de saturación de la transferrina)

n	Edad	Sexo	Nº hematíes (x10 <sup>6</sup> /mL)	VCM fL	[Hb] g/dL	ADE	[Ferritina] ng/mL	[Transferrina] mg/dL	Sideremia µg/dL	IST %
1	37	H	7,53	63,2	20,3	19,7	10	300	23	8
2	60	D	8,4	69,8	16,6	22	8	310	20	7
3	61	H	7,15	62,9	17,5	21,4	5	397	25	5
4	67	H	7,38	68,6	18,3	25,1	21	322	30	16
5	80	D	7,1	69,3	16,4	21,7	6	332	19	4

**Declaración de conflictos de interés:**

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

**Bibliografía**

- Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principles of Biochemistry. Fifth ed. W. H. Freeman and Company. 2008, New York.
- Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha thalassemia. *Genet Mol Res.* 2008; 7(4):1045-53.
- Hedlund B. Hemoglobins of human embryos, fetuses, and neonates. In: Fairbanks VF, ed. Hemoglobinopathies and thalassemias. New York: Brian C. Decker, 1980:14-7.
- Bunn HF. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood.* 1987; 69(1): 1-6.
- Tang DC, Ebb D, Hardison RC, Rodgers GP. Restoration of the CCAAT box or insertion of the CACCC motif activates delta-globin gene expression. *Blood.* 1997 Jul 1;90(1):421-7.
- Kosche KA, Dobkin C, Bank A. DNA sequences regulating human beta globin gene expression. *Nucleic Acids Research.* 1985;13(21):7781-7793.
- Thein SL. The Molecular Basis of  $\beta$ -Thalassemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2013;3(5):a011700.
- Haemoglobinopathy Diagnosis, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2006, Massachusetts (USA).
- Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha thalassemia. *Genetics in Medicine.* 2011;13(2):83-8.
- Kohne E. Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International.* 2011;108(31-32):532-540.
- Williams TN, Weatherall DJ. World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2012;2(9):a011692.
- R. M. Schmidt. The ICSH Expert Panel on Abnormal Hemoglobins and Thalassemia: Its Structure and Function. *Hemoglobin.* 1977. 1:8, 741-745.
- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clinical Chemistry.* 2000;46(8 Pt 2):1284-90.
- Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, Levine ML. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. *Am J Clin Pathol* 1996;106:201-5.
- Eastman JW, Wong R, Liao C, Morales D. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. *Clinical Chemistry* 1996;42:704-10.
- Stephens, A.D. & Angastniotis, Michael & Baysal, Erol & Chan, Vivian & Fucharoen, Surak & Giordano, Piero & Hoyer, J.D. & Mosca, A.D. & Wild, B. (2012). ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin A2. *International journal of laboratory hematology.* 34. 1-13.