

La electroforesis capilar en el estudio de las Hemoglobinopatías y Talasemias

Capillary electrophoresis for the diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemia syndromes

Sorroche P y Saez M S

Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires Sección Proteínas

patricia.sorroche@hospitalitaliano.org.ar

Fecha de recepción: 14/11/2014
Fecha de aprobación: 20/11/2014



LABORATORIO
EN HEMATOLOGÍA

HEMATOLOGÍA Volumen 18 n° 3: 272-276
Septiembre-Diciembre 2014

Introducción

Los trastornos de la síntesis de la cadena de globina, tanto talasemias como variantes de la hemoglobina, son comunes. Actualmente, se enumeran en las bases de datos más de 1.000 variantes de hemoglobinas (Hb), la mayoría de los cuales son variantes de la cadena beta.

Dos tipos de trastornos pueden afectar a las cadenas de globina: cualitativos y cuantitativos.

Los trastornos cualitativos, es decir, las hemoglobinopatías, son el resultado de cualquiera de las siguientes alteraciones:

- i) sustitución de un aminoácido por otro (como en Hb S y Hb C),
- ii) eliminación de una porción de la secuencia de aminoácidos (como en Hb Gun Hill),
- iii) hibridación anormal entre dos cadenas durante la meiosis (como se ven Hb Lepore),
- iv) alargamiento anormal de la cadena de globina (como en Hb Constant Spring).

Las talasemias son trastornos cuantitativos que afectan la tasa de la síntesis de la hemoglobina. La β -talasemia heterocigota es una condición benigna con anemia leve, hipocromía y microcitosis, y un elevado nivel de Hb A2. En comparación, la enfermedad grave (β -talasemia mayor) requiere transfusiones de sangre toda la vida y terapia de quelación de hierro. En el laboratorio, el estudio electroforético de las hemoglobinas es necesario fundamentalmente para:

- (i) confirmar un diagnóstico provisional, tal como la enfermedad de células falciformes o la β talasemia mayor.
- (ii) explicar una anomalía hematológica, como anemia o microcitosis
- (iii) identificar los fetos en riesgo de hemoglobinopatías y ofrecer a los padres asesoramiento genético.

Obviamente, cualquier alteración mencionada anteriormente conduce a cambios en la estructura de la molécula o en su carga, los que pueden ser detectados con la metodología adecuada.

Metodologías disponibles para el análisis de las hemoglobinopatías.

La electroforesis (EF) alcalina (pH 8.5) en gel de agarosa, debido a su simplicidad, es uno de los métodos más populares para el screening de Hb. Es costo-efectiva para laboratorios de bajo volumen de muestras, sin embargo, es relativamente laboriosa, requiriendo preparación manual de las muestras. Los glóbulos rojos deben ser lavados en solución salina para eliminar las proteínas plasmáticas y bandas diferentes a la hemoglobina en el gel. Permite la separación de las hemoglobinas importantes y un número de variantes menos comunes. La visualización de las bandas se realiza mediante la tinción del gel con negro amido y la medición de la concentración de las fracciones individuales por densitometría.

Debido a la baja precisión y exactitud de las Hb en bajas concentraciones, el Colegio Americano de Patólogos (CAP) ya no recomienda el uso de la exploración densitométrica para la cuantificación de HbA₂. Además, algunas variantes comunes de Hb co-migran, tales como Hb C, HbE, HbA₂ y Hb O-Arab, y Hb S, Hb D y Hb G. Con el fin de separar algunas de estas variantes, la muestra puede ser analizada sobre gel a un pH ácido (6,0). En estas condiciones, la carga molecular será diferente y los patrones de migración cambiarán. Como resultado, la Hb S puede diferenciarse de la Hb D y la Hb C de la Hb E.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC), considerada el método de diagnóstico inicial en laboratorios con una alta carga de trabajo, puede ser utilizada para la cuantificación de hemoglobinas S, A₂ y F y para la detección, identificación y cuantificación provisional de muchas variantes. Esta técnica por lo general proporciona una cuantificación precisa de Hb A₂ y es por lo tanto adecuada para el diagnóstico de beta talasemia. En comparación con la electroforesis en gel, en HPLC los analizadores están automatizados, pequeños volúmenes de muestra son suficientes para el análisis y nos permite realizar la identificación provisional de una mayor proporción de variantes de hemoglobina.

La HPLC por lo general separa hemoglobinas A, A₂, F, S, C, D-Punjab y G-Philadelphia. Sin embargo, la E y la Lepore co-eluyen junto a HbA₂ (al igual que algunas otras co-eluyen con A, S y F) y deben ser reconocidas por otras técnicas. Separa la HbA_{1C} y otros derivados lo que hace difícil la

interpretación.

La electroforesis capilar (EC) es el método más recientemente desarrollado para la cuantificación y detección de hemoglobinas normales y anormales aprobado por la FDA y que constituye una ayuda en el diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias.

Fundamento de la Electroforesis Capilar en la detección de hemoglobinas

La EC utiliza el principio de electroforesis en solución libre, una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 µm lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.

En este sistema, la inyección de las muestras diluidas con solución hemolizante en los capilares se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. Las hemoglobinas son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas. La detección directa proporciona automáticamente una cuantificación relativa precisa de cada fracción individual de las hemoglobinas que presenta un interés particular, como la hemoglobina A₂ en el diagnóstico de las β talasemias.

El resultado, o electroferograma, se compone de 300 lecturas (puntos) consecutivas y se divide en 15 zonas. Para facilitar la interpretación, los resultados son automáticamente posicionados con respecto a la HbA. Hemoglobinas normales (y variantes) se muestran como picos y el sistema identifica automáticamente la zona (Z 1 a Z 15) a la que pertenece una variante. El instrumento posee una biblioteca de hemoglobinas a bordo en forma de una lista desplegable y enumera todas las hemoglobinas normales y variantes que pueden estar presentes dentro de una zona en particular (**Figura 1**). En el caso de muestras sin presencia de Hb A o Hb A₂, la caracterización a partir de las zonas de identificación se realiza utilizando una dilución de la muestra con control normal. La cuantificación en estos casos se obtiene analizando la muestra inicial (no mezclada con el control).

Consideraciones generales preanalíticas y analíticas

Algunas ventajas que ofrece la EC son:

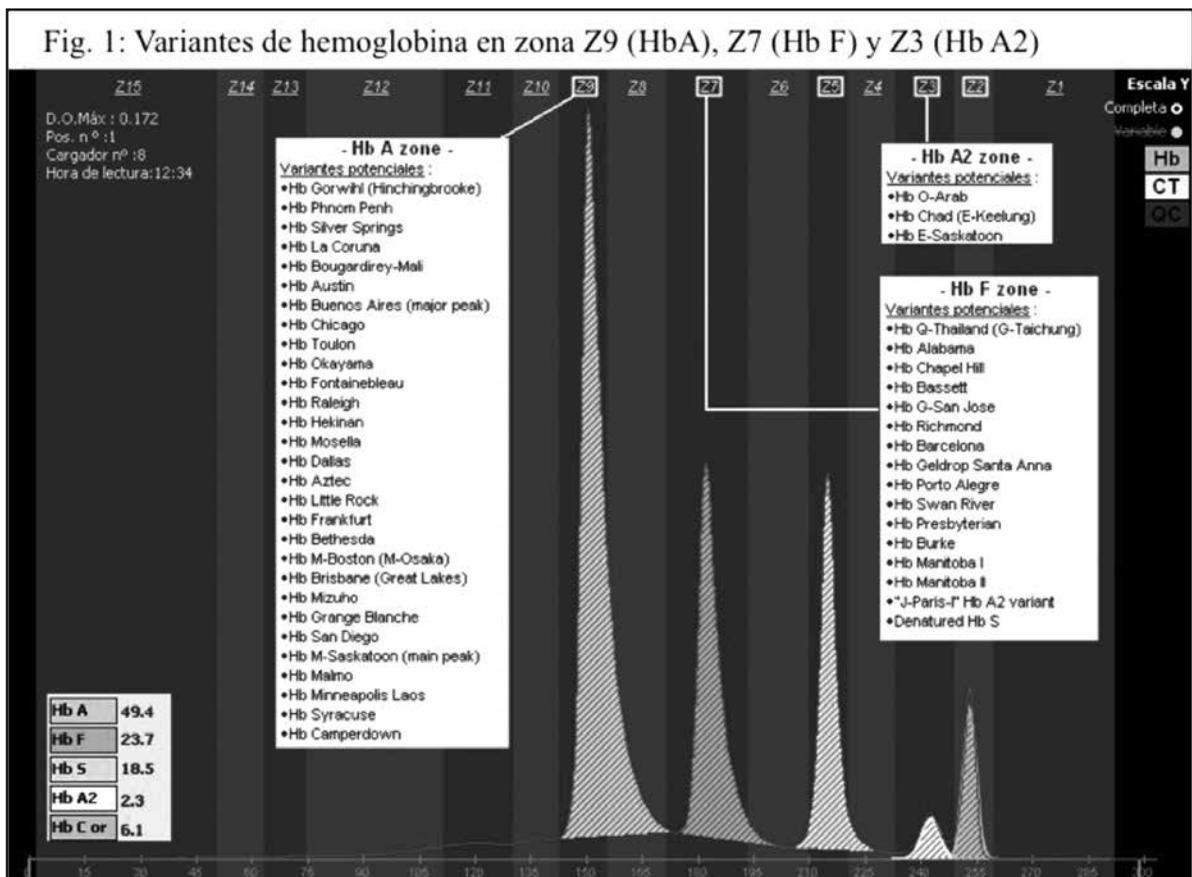
1. La separación de Hb S de Hb D, HbE deHb C (y de Hb A2).
2. La cuantificación precisa y rápida de Hb F y Hb A2, incluso en la presencia de Hb S, E y C (**Figuras 2 y 3**). Las variantes post traduccionales de Hb (como glicosilada HbS1c) no se separan de las fracciones principales.
3. Variantes de la cadena Delta, variantes de la cadena alfa, y otras fracciones menores de Hb son fácilmente visualizadas.
4. Hemoglobinas rápidas, como la Hb H y Hb Bart son más fácilmente detectadas y medidas por CE que por HPLC.
5. Mayor Automatización y rendimiento, haciéndola ideal para un programa de screening.
6. Volumen mínimo de 100 uL de muestra para realizar el estudio.

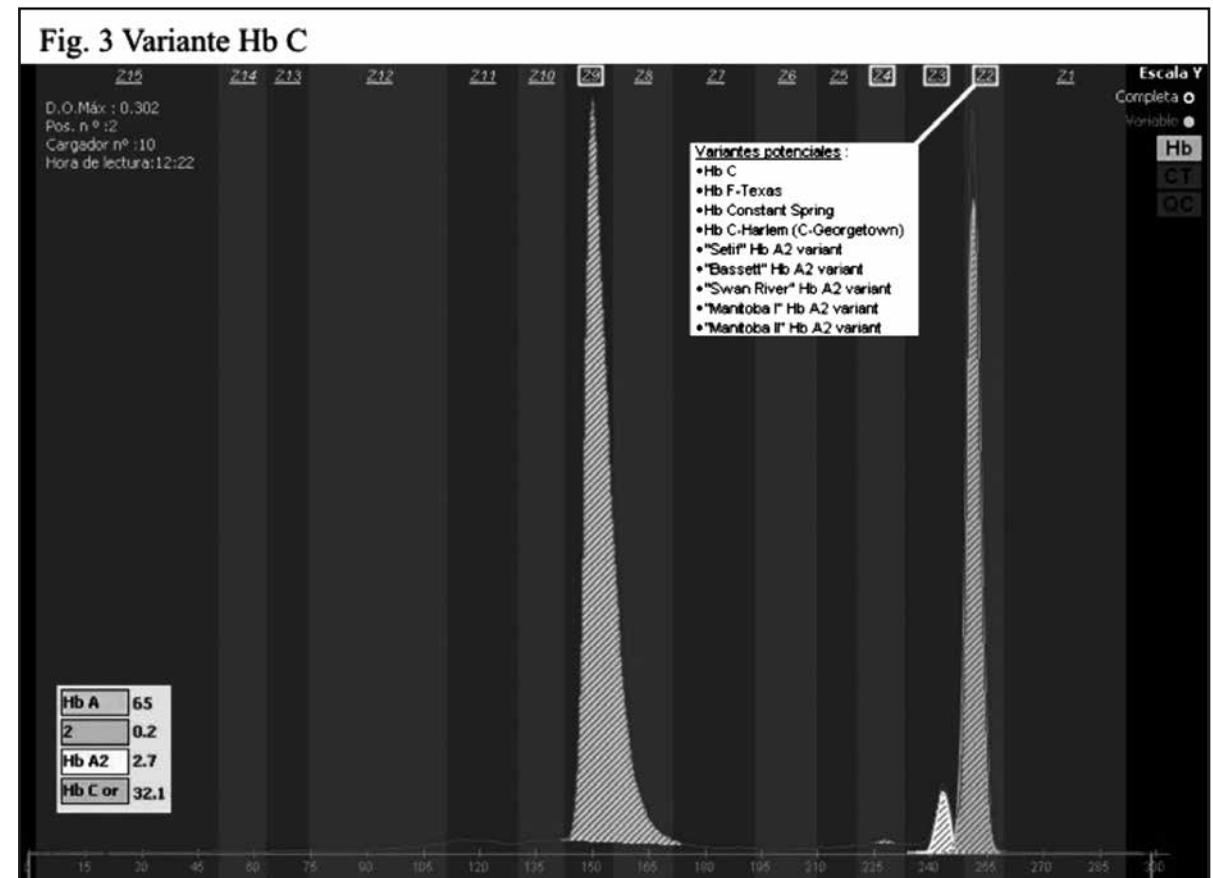
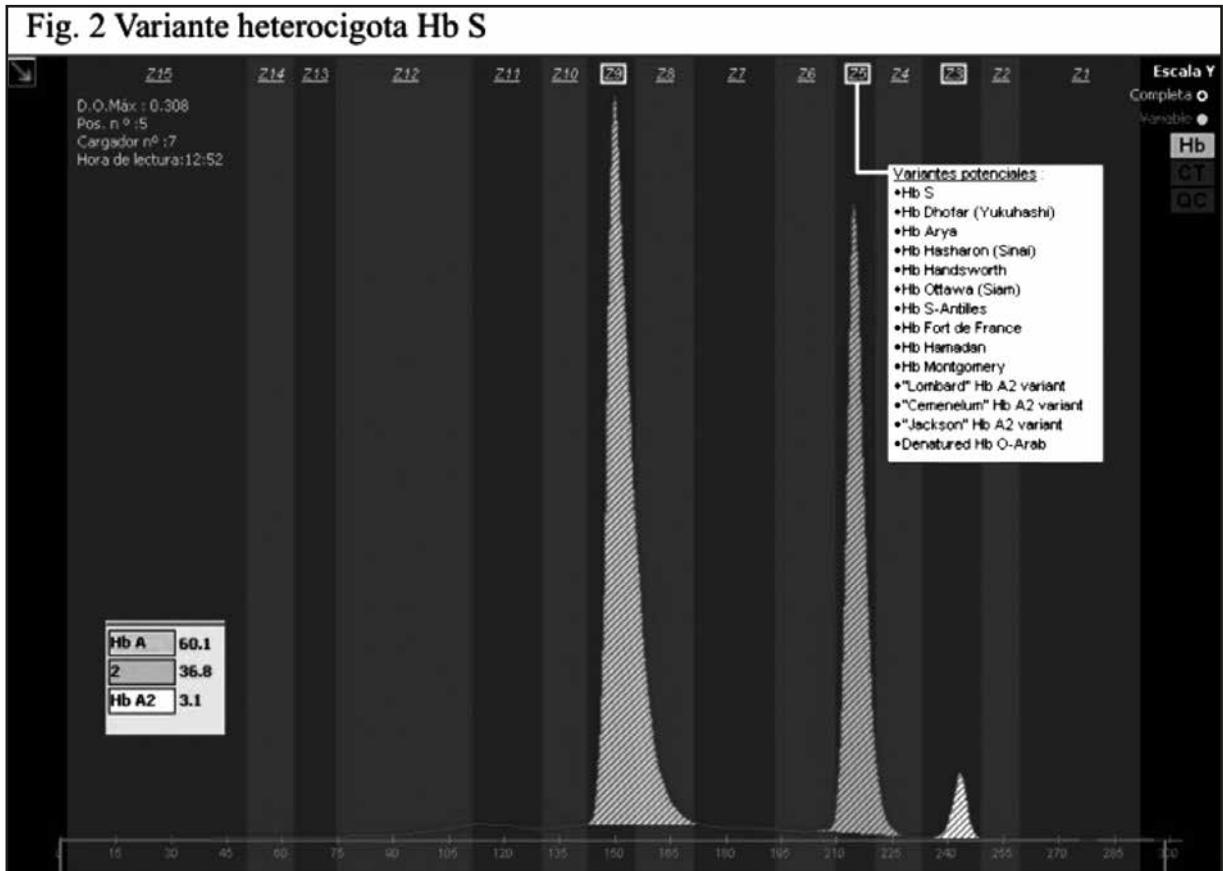
7. El sistema es apto para el estudio del recién nacido a partir de elución de muestras de sangre seca.

La combinación de metodologías, HPLC y CE, puede reducir significativamente el número de variantes de hemoglobina inusuales que pueden confundirse con hemoglobinas normales o variantes.

Cabe señalar que la identificación de hemoglobinas es a menudo presuntiva, basada en la movilidad electroforética u otras características de un individuo con historia familiar procedente. Se debe realizar un mínimo de dos técnicas basadas en diferentes principios. La identificación definitiva por lo general requiere el análisis de ADN, espectrometría de masas o secuenciación de proteínas.

Los laboratorios deben, ya sea disponer de métodos precisos para la cuantificación de HbA2 y detección de las variantes de hemoglobinas o remitir tales muestras a un laboratorio de referencia.





Declaración de conflictos de interés:

Las autoras declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

- 1- Wendt P., Durnick D., Swanson K., Herrick J., Hoyer J. 2009. Comparison of Systems Used for Identification of Hemoglobin Variants Including the Primus Ultra2 High Performance LiquidChromatography (HPLC) System And The Sebia CAPILLARYS 2 Capillary Electrophoresis (CE) Systems. *Int. Jnl. Lab Hem (Supplement) 31*: p.29
- 2- Bain B., Wild B., Stephens A., Phelan L. Variant Haemoglobins. A guide to identification. Ed Wiley-Blackwell. 2010