

---

---

## Ventajas de la Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC-CE) en el estudio de Hemoglobinopatías en Venezuela.

Martha Bravo-Urquiola<sup>1,2,3</sup>, Anabel Arends<sup>1,2</sup>, Silvia Montilla<sup>1,2</sup>, Dalia Velásquez<sup>1</sup>, Gloria García<sup>1</sup>, Maritza Álvarez<sup>1</sup>, José Guevara I.<sup>1</sup> y Omar Castillo<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Servicio de Hematología "Dr. Tulio Arends" Hospital Universitario de Caracas, <sup>2</sup>Instituto Anatómico "José Izquierdo" Facultad de Medicina Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas y

<sup>4</sup>Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

**Palabras clave:** Hemoglobinopatías, HPLC-CE.

**Resumen.** Las hemoglobinopatías comprenden un grupo heterogéneo de anemias congénitas, entre las que destacan: las variantes de hemoglobina, las talasemias y la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal. Con la técnica de cromatografía líquida de alta presión de intercambio catiónico (HPLC-CE) y utilizando el programa *β-thalassemia Short Program<sup>R</sup>* del equipo *Variant\* Bio Rad*, se estudió la frecuencia de hemoglobinopatías en un total de 4000 muestras de pacientes referidos al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales del Hospital Universitario de Caracas, por presentar problemas de anemia. Se encontró que el 26% de los pacientes con diagnóstico de anemia, obedece a la presencia de hemoglobinopatías. Entre las detectadas, la Hb S es la variante más frecuente, seguida de las variantes C y D. Además, se observó la presencia de Beta Talasemia y su asociación a las hemoglobinas S y C. Debido a la cuantificación del porcentaje de Hb A por el método de HPLC-CE fue posible clasificar a los pacientes doble heterocigotos Hb S-Beta Talasemia: en Hb S-β<sup>+</sup> Tal Tipo 1, Hb S-β<sup>+</sup> Tal Tipo 2, Hb S-β<sup>0</sup> Talasemia. De la misma manera, fueron clasificados los pacientes doble heterocigotos con Hb C-Beta Talasemia. La técnica de HPLC-CE es sensible y precisa en el estudio de un gran número de muestras, lo cual se logra en muy corto tiempo, tiene un alto poder de resolución y reproducibilidad de los resultados. En todo paciente con anemia hemolítica congénita, la detección de estas patologías es de suma importancia para lograr un adecuado monitoreo, establecer un tratamiento precoz, consejo genético y un manejo terapéutico multidisciplinario.

## **Advantages in the use of High Performance Liquid Chromatography Technique for screening hemoglobinopathies in Venezuela.**

*Invest Clin 2004; 45(4): 309 - 315*

**Key words:** Hemoglobinopathies, Thalassemia, CE-HPLC.

**Abstract.** The hemoglobinopathies are a very heterogeneous group of congenital hemolytic anemias, which includes hemoglobin (Hb) variants, thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). The aim of this study was to determine the frequency of hemoglobinopathies using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC-CE) technique with the  $\beta$ -thalassemia Short Program<sup>R</sup> of Variant\* Bio Rad. Four thousand blood samples from anemic patients from the Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Hospital Universitario de Caracas were studied. Twenty six percent of the anemia patients had hemoglobinopathies. The Hb S was the most frequent variant found, followed by the Hb C and Hb D. Also we observed the association of beta thalassemia with Hb S and Hb C. The quantification of the Hb A by HPLC-CE allowed us to classify the double heterozygote Hb S-Beta Thalassemia in Hb S- $\beta^+$  Tal Type 1, Hb S- $\beta^+$  Tal Type 2, Hb S- $\beta^0$  Thalassemia. The double heterozygote patients with Hb C-Beta thalassemia were also classified. The HPLC-CE is a rapid, reproducible and precise technique. The reliability of HbA<sub>2</sub> measurement by HPLC for the detection of beta thalassaemia without any false positive or false negative results is of great advantage. HPLC may be an appropriate method for rapid screening in population surveys for beta thalassemia and hemoglobin variants carriers. Due to the high incidence of cases, in our country this is very important for their clinical management and the genetic and anthropological impact of an early and precise diagnosis.

*Recibido: 24-04-2003. Aceptado: 17-06-2004.*

### **INTRODUCCIÓN**

El estudio del gen beta globina ha proporcionado grandes hallazgos para el conocimiento de desórdenes genéticos hereditarios, tales como las hemoglobinopatías, las cuales comprenden: las variantes de hemoglobina, las talasemias y la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal.

Las variantes de hemoglobina son alteraciones de tipo cualitativo, producidas por mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o inserciones de nucleótidos en diferentes regiones de los genes globinas (1). Las

talasemias y la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH) son alteraciones de tipo cuantitativo las cuales afectan la tasa de expresión de los genes beta y gamma globinas, respectivamente. La beta talasemia se ha observado asociada a las variantes de hemoglobinas S, C y a niveles elevados de hemoglobina fetal, conduciendo esto a una alta variabilidad clínica en cada grupo de pacientes. Embury y col. en 1994 (2) propusieron clasificar los pacientes doble heterocigotos Hb S- $\beta$  talasemia de acuerdo al porcentaje de Hb A que presenten: pacientes Hb S- $\beta^+$  talasemia tipo 1, cuyos va-

lores de Hb A oscilan entre 5-15%, pacientes Hb S- $\beta^+$  talasemia tipo 2, cuyos valores de Hb A varían entre 20-25% y el grupo de pacientes Hb S- $\beta^0$  talasemia donde no hay producción de Hb A. Este criterio también puede ser aplicado en los casos doble heterocigotos Hb C- $\beta$  Talasemia.

Durante más de cuatro décadas Arends y col. (3-7) y Bravo y col. (8) estudiaron la distribución y frecuencia de las hemoglobinopatías en nuestro país, demostrando que las variantes de hemoglobina S, C y D y la beta talasemia tanto en su forma homocigota, como en la heterocigota compuesta, son las más frecuentes, representando algunas de ellas un problema de salud pública. Estos estudios fueron realizados utilizando técnicas bioquímicas convencionales, tales como la electroforesis sobre acetato de celulosa a pH alcalino y sobre citrato agar a pH ácido, cromatografía de intercambio iónico (9) y métodos de desnaturalización por álcalis (10).

Con el desarrollo de métodos alternativos para el estudio de hemoglobinopatías tales como la técnica de Isoelectroenfoque y la técnica de cromatografía líquida de alta presión de intercambio catiónico (HPLC-CE), esta última ha resultado ser un método sensible, específico y reproducible, convirtiéndose en una alternativa útil para el estudio y cuantificación de hemoglobinas de significancia clínica (11-13). Por tal motivo, en la presente investigación se introduce la técnica de cromatografía líquida de alta presión de intercambio Catiónico (HPLC-CE), desarrollada por Tan y col. en 1993 (14) como método de diagnóstico de variantes hemoglobínicas, siendo ésta la primera experiencia en nuestro país. Cabe recordar que la gran mayoría de los casos con hemoglobinopatías se presentan bajo la forma de emergencias médicas, por lo tanto su identificación rápida y precisa son esenciales para iniciar un tratamiento adecuado, con

el fin de disminuir la morbi-mortalidad de estos pacientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 4000 muestras de pacientes referidos al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales del Hospital Universitario de Caracas con problemas de anemia. A cada paciente se le extrajo, previa autorización, 10 mL de sangre periférica en un tubo con EDTA como anticoagulante. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas, siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki y del Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT.

La presencia de las distintas hemoglobinas: Hb A, Hb F, Hb A<sub>2</sub>, Hb S y Hb C y su cuantificación fue determinada utilizando la técnica de Cromatografía líquida de alta presión, de intercambio catiónico (HPLC-CE), de acuerdo a los procedimientos descritos por Tan y col. en 1993 (14) y utilizando el *Tal Short Program*<sup>®</sup> de BioRad. Este sistema consta de componentes analíticos individuales, entre los cuales se encuentran el sistema de bomba (2 bombas de doble pistón), el dispensador automático de muestras y el detector de longitud de ondas, 3 reservorios de reactivos y un tanque de desechos.

Las muestras fueron inicialmente sometidas a un hemolisado rápido, por parte del operador e incorporadas al flujo analítico mediante inyección automática, pasando a través de un cartucho que contiene una resina de intercambio catiónico. Entre cada inyección de las muestras, el dispensador automático fue lavado con una solución acuosa a fin de minimizar la posibilidad de mezclar las muestras entre sí. La elusión y separación de los diferentes componentes se realizó utilizando dos tampones fosfato de sodio, los cuales forman un gradiente de 4 g/L (tampón A) a 14 g/L (tampón B) a

pH 6.4. La separación de las hemoglobinas presentes se obtiene en tan sólo 6.5 minutos por muestra y los componentes separados pasan a través del detector de doble longitud de onda a 415 nm y 690 nm. Los datos de absorbancia son transmitidos desde una unidad de procesamiento central (CPU) y mostrados como un Cromatograma de tiempo real (gráfico de tiempo vs absorbancia).

## RESULTADOS

Por el método HPLC-CE se encontró que un 26% de los pacientes con diagnóstico de anemia estudiados, obedece a la presencia de hemoglobinopatías (Fig. 1). Los resultados obtenidos demuestran, una vez más, que la Hb S es la variante más frecuente en nuestro país, seguida de las variantes C y la D (Tabla I). La variante Hb S eluye entre la hemoglobina A y la hemoglobina A<sub>2</sub> (Fig. 2). Además, se observó la presencia de Beta Talasemia y su asociación a las hemoglobinas S y C. Por otro lado, por medio de la cuantificación del porcentaje de Hb A fue posible clasificar a los pacientes doble heterocigotos Hb S-Beta Talasemia: en Hb S- $\beta^+$  Tal Tipo 1, Hb S- $\beta^+$  Tal Tipo 2, Hb S- $\beta^0$  Talasemia. De la misma manera fueron clasificados los pacientes doble heterocigotos con Hb C-Beta Talasemia (Tabla II).

En todos los pacientes conocidos como beta Talasémicos, estudiados previamente mediante cromatografía no automatizada no se encontró ningún falso positivo o falso negativo mediante HPLC-CE.

Todos los individuos en control, portadores de variantes hemoglobínicas no endémicas como Hb Hoffu, Hb H, Hb J, diagnosticadas con anterioridad por los métodos convencionales, fueron igualmente detectadas mediante el método de HPLC-CE, a excepción de la Hb North Shore- Caracas, la cual no fue detectada por el equipo y su elusión a nivel de la Hb A.

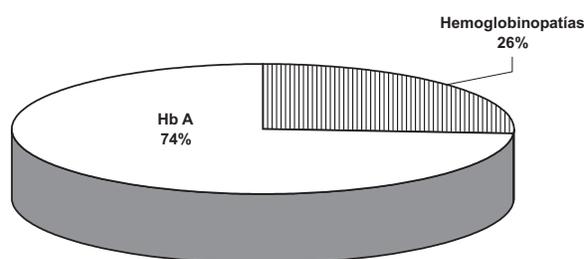


Fig. 1. Incidencia de Hemoglobinopatías detectadas por HPLC-CE.

**TABLA I**  
DIFERENTES HEMOGLOBINOPATÍAS  
DIAGNOSTICADAS POR HPLC-CE

Diagnóstico	Pacientes	Frecuencia
Portador de Hb S	506	51,5
Enfermedad Drepanocítica	173	17,6
$\beta$ -Talasemia	114	11,6
Portador de Hb C	68	6,9
Doble Heterocigoto Hb S/Hb C	40	4,1
Doble Heterocigoto Hb S/ $\beta$ -Tal	29	3,0
HPFH	24	2,4
Doble Heterocigoto Hb S/HPFH	9	0,9
$\Delta\beta$ Talasemia	8	0,8
Otras Hb's (J, D)	5	0,5
Doble Heterocigoto Hb C/ $\beta$ -Tal	4	0,4
Doble Heterocigoto Hb S/Hb D	2	0,2
Enfermedad por Hb C	1	0,1
<b>Total</b>	<b>983</b>	<b>100</b>

Se encontró un total de 60 casos con Hb F elevada de los cuales 8 casos fueron debido a la presencia de un doble heteroci-

```

***** Beta Thal Short *****
DATE:96/05/10      TIME:17:38:03

TECH ID#          0
VIAL#             3C
SAMPLE ID# 00000000000000000000

ANALYTE ID      %      TIME      AREA
F                0.3    1.10     9530
P2               3.7    1.33    106286
P3               2.9    1.74     83002
A0              57.4    2.35   1663792
A2               4.3    3.65     99173
S-WINDOW        31.4    4.50    910051

TOTAL AREA      2871834

F                0.3%      A2          4.3%

```

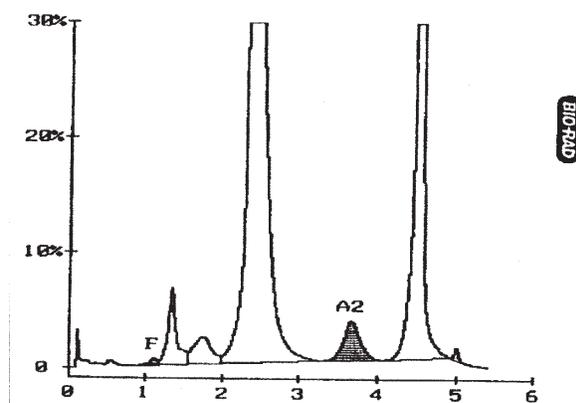


Fig. 2. Cromatograma donde se ilustra la presencia de un heterocigoto para la Hb AS.

**TABLA II**  
FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE  $\beta$  TALASEMIA.

Diagnóstico	Pacientes	Frecuencia (%)
$\beta$ Tal. Menor	108	73,5
S- $\beta^0$ Tal.	20	13,6
S- $\beta^+$ Tal- Tipo 2	6	4,1
$\beta$ Tal. Intermedia	4	2,7
S- $\beta^+$ Tal- Tipo 1	3	2,0
$\beta$ Tal Mayor	2	1,4
C- $\beta^+$ Tal- Tipo 2	2	1,4
C- $\beta^+$ Tal- Tipo 1	1	0,7
C- $\beta^0$ Tal.	1	0,7
Total	147	100

gato  $\delta\beta$  Talasemia, 28 casos por estrés y 24 casos por HPFH. Esta condición presentó niveles variables de Hb F, a pesar de que fue producida por una misma mutación, como pudo observarse en el estudio de los miembros de cuatro generaciones de una familia de indígenas Warao, provenientes de la población de Winiquina del Delta del Orinoco, cuyos valores de HbF cuantificados por HPLC-CE oscilaron entre 3,7-7,7%.

## DISCUSIÓN

El HPLC-CE es un método rápido, sensible y preciso para la detección de variantes de hemoglobinas y talasemias. Las ventajas de utilizar este método automatizado, propuesto en este trabajo, sobre los métodos convencionales de electroforesis, cromatografía en micro-columna y la técnica de desnaturalización por álcalis, son: 1) Permite analizar y cuantificar simultáneamente las Hb A, Hb A<sub>2</sub> y Hb F, así como alguna variante de hemoglobina, en una sola preparación, lo cual se traduce en un menor tiempo y mayor economía. 2) Permite el estudio de numerosas muestras en un corto período de tiempo manteniendo un alto nivel de reproducibilidad y precisión. 3) Es el único método que permite diferenciar a la Hb A<sub>2</sub> de la Hb C, obteniendo un patrón de resolución completamente diferente, debido a que con el método convencional de electroforesis a pH alcalino, éstas migran en la misma posición, lo que dificulta su detección. La separación, en un solo paso, de la Hb C y de la Hb A<sub>2</sub> es una gran ventaja, especialmente en poblaciones tan mezcladas como la nuestra donde tienen una alta incidencia (4). Este es el primer reporte en Venezuela donde se encontraron cuatro casos no relacionados de doble heterocigoto Hb C-Beta Talasemia, sin haber requerido del estudio familiar.

Los niveles de hemoglobina A<sub>2</sub> son variables de acuerdo a la mutación que oca-

sione este trastorno. La utilización de este método con medidas tan precisas, como las obtenidas, permite inferir cuál es la mutación presente lo cual facilita el diagnóstico molecular cuando éste puede ser realizado o ayuda para el consejo genético y asesoría al equipo multidisciplinario que maneja estos casos, permitiendo así establecer las clasificaciones de acuerdo a la severidad de la mutación en  $\beta^+$  o  $\beta^0$ .

En estudios poblacionales la técnica de HPLC tiene la ventaja de ser más rápida y permite el estudio de un mayor número de muestras, obteniendo resultados en pocos minutos, aún así no se deben excluir el uso de los métodos convencionales de electroforesis de hemoglobina en vista de que algunos casos ameritan estudios complementarios para su identificación y así poder utilizar la vasta experiencia que se tiene en esta metodología.

En todo paciente con anemia hemolítica congénita, el estudio de la beta talasemia y las variantes de hemoglobinas es sumamente importante para lograr un adecuado monitoreo, de manera de establecer un tratamiento precoz, consejo genético y un manejo multidisciplinario. Además, este diagnóstico es indispensable en los hospitales debido a la gran incidencia de estas enfermedades en la población, especialmente en los estratos sociales bajos y ciudades costeras más pobladas, lo cual conlleva a un alto costo hospitalario y humano. El Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, HUC es un centro de referencia para todo el país y es por ello que se requiere una metodología sencilla, rápida y precisa como se plantea en este estudio. En el manejo terapéutico de los regímenes de hipertransfusión en pacientes drepanocíticos, el HPLC-CE ha sido de gran utilidad ya que la cuantificación de Hb A y Hb S es inmediata, representando ésto un gran aporte para estos pacientes, pudiendo reemplazarse casi en su totalidad la Hb S presente,

tanto para intervenciones quirúrgicas como para el manejo de las crisis propias de la enfermedad.

El equipo de HPLC-CE (VARIANT *Hemoglobin Testing System*<sup>R</sup>) es tan versátil que no sólo dispone del programa  $\beta$  Tal Short Program<sup>R</sup>, sino también de otros programas, tales como el *Sickle Cell Short Program*<sup>R</sup>, el *Globin Chains Program*<sup>R</sup> y el *alfa Tal Short Program*<sup>R</sup>, los cuales son utilizados para el diagnóstico de hemoglobinopatías en neonatos, en muestras tomadas en el talón del pie sobre papel de filtro, para el análisis de las cadenas globinas y en el diagnóstico de alfa talasemia, respectivamente.

El equipo de HPLC-CE VARIANT tiene la desventaja de que componentes menores de la Hb S y otras variantes de hemoglobina, pueden co-eluir con la Hb A<sub>2</sub> y esto puede resultar en un valor de Hb A<sub>2</sub> falsamente elevado.

Previo a la utilización de la técnica de HPLC-CE, numerosos pacientes doble heterocigotos Hb S- $\beta$  talasemia no eran diagnosticados adecuadamente, especialmente aquellos que carecían de estudios familiares, siendo catalogados como Hb S homocigota.

En Venezuela, Arends y col. en 1998 (15) demostraron que la incidencia del doble heterocigoto Hb S- $\beta$  talasemia jugaba un papel muy importante como modulador del síndrome drepanocítico y determinaron la presencia de los tres diferentes fenotipos Hb S- $\beta$  talasemia en la población. Por este motivo, se hace indispensable realizar un diagnóstico diferencial entre pacientes drepanocíticos puros y pacientes con drepanocitosis- $\beta$  talasemia, los cuales habitualmente eran catalogados como "Tara drepanocítica sintomática", por la presencia de Hb A en estos casos. Con la implementación de la técnica de HPLC-CE este problema fue resuelto, debido a que la cuantificación de Hb A<sub>2</sub> se realiza automáticamente.

El uso del equipo automatizado de HPLC-CE para el estudio de variantes hemoglobínicas, es sumamente útil en estudios poblacionales, centros de tratamiento de pacientes drepanocíticos y en pesquisa neonatal y los métodos convencionales siguen jugando un papel importante especialmente en el diagnóstico de variantes no endémicas.

#### AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el FONACIT, Proyecto S1-95000696 y CODECIH-UC2000-005. Los autores desean manifestar su agradecimiento a la gestión realizada por LOGINCA, CA en lograr que el equipo *Variant\* Bio Rad* fuese utilizado en calidad de préstamo, facilitado por la casa BioRad división América Latina.

#### REFERENCIAS

1. **Weatherall DJ, Clegg JB.** Thalassaemia Syndromes. 3a Ed. Blackwell Scientific Publications. London. 1981. p 875.
2. **Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steimberg MH.** Sickle Cell disease. Basic principles and clinical practices. New York: Raven Press, Ltd. 1994. p 213-215.
3. **Arends T.** Frecuencia de hemoglobinas anormales en poblaciones humanas suramericanas. Acta Cient Venezuel 1963; 1: 46-57.
4. **Arends T.** Hemoglobinopathies and enzymes deficiencies in Latin American population. In: The ongoing evolution of Latin American populations. Copyright by Charles C. Thomas, publishers. 1971. p 509-559.
5. **Arends T, Lehman H, Powman D, Stathopoulou R.** Hemoglobin North Shore-Caracas  $\beta$  134 (H12) Valine-Glutamic Acid. FEBS Letters 1977; 80: 261-265.
6. **Arends T, Castillo O, Garlin G, Maleh J, Anchustegui M, Salazar R.** Hemoglobin Alamo 191. Asn -Asp in a Venezuela family. Hemoglobin 1987; 11: 135-138.
7. **Arends T, Salazar R, Anchustegui M, Garlin G.** Hemoglobin variant in the northeastern region of Venezuela. Inter-ciencia 1990; 15: 36-41.
8. **Bravo M, Salazar R, Arends A, Alvarez M, Velázquez D, Guevara JM, Castillo O.** Detección de  $\beta$  Talasemia mediante la técnica de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones. Invest Clin 1999; 40: 203-213.
9. **Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AN, Mayson SAM, Jakway J.** Microchromatography of hemoglobins. III. A simplified procedure for the determination of hemoglobin A2. J Lab Clin Med 1975; 86: 700-702.
10. **Betke K, Marti H, Schlichli I.** Station of small percentage of fetal hemoglobin. Nature 1959; 184: 1870-1878.
11. **Ou CN, Rognerud CL.** Rapid Analysis of hemoglobin variants by cation-exchange chromatography. Clin Chem 1993; 39: 820-824.
12. **Wilson JB, Headlee ME, Huisman THJ.** A new high performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantitation of various hemoglobin variants in adults and newborn babies. J Lab Clin Med 1983; 102:174-86.
13. **Rogers BB, Wessels RA, Ou CN, Buffone CJ.** High performance liquid chromatography in the diagnosis of hemoglobinopathies and thalasseмии. Am J Clin Pathol 1985; 84: 671-4.
14. **Tan GB, AW TC, Dunstan RA, Lee SH.** Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A<sub>2</sub> and F. J Clin Pathol 1993; 46: 852-856.
15. **Arends A, Bravo M, Alvarez M, Velásquez D, Salazar R, Guevara JM, Castillo O.** Origin and Prevalence of  $\beta$  thalassemia in Venezuela (Resumen). 27<sup>th</sup> Congress of the International Society of Hematology and the 3er Congress of the European Hematology Association Amsterdam, Netherland. Br J Hematol 102(1):48B, 1998.